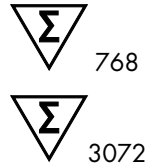


Heinäkuu 2021

artus[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan käyttöohje (käsikirja)



Versio 1



In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM- ja ABI[®] 7500 Fast Dx
-instrumenttien kanssa



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA

R2

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	4
Kuvaus ja toimintaperiaate.....	5
Patogeenitiedot.....	5
Yhteenveto ja selitykset.....	6
Toimitetut materiaalit.....	9
Sarjan sisältö.....	9
Tarvikesarjan osat.....	10
Alustat ja ohjelmisto.....	11
Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	12
Tarvikkeet.....	12
Välineet.....	12
Varoitukset ja varotoimet.....	13
Turvallisuustiedot.....	13
Varotoimet.....	14
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	15
Näytteiden kuljetus, säilytys ja käsittely.....	15
Näytteenotto, kuljetus ja säilytys.....	15
Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus RGQ MDx 5plex HRM -laitteella.....	16
Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus ABI 7500 Fast Dx -laitteella.....	22
Tulokset.....	27

Tulosten tulkitseminen	29
Rajoitukset	32
Suorituskyky	33
Analyttinen herkkyys (havaitsemisraja).....	33
Analyttisen spesifisyyden tutkimukset (inklusiivisuus ja eksklusiivisuus/ristireaktiiviteetti)	33
Häiritsevät aineet	39
Tarkkuus	40
Kliininen suorituskyky	41
Lähdeviitteet	45
Vianmääritysopas	46
Symbolit	48
Yhteystiedot	49
Tilautiedot	50
Asiakirjan muutoshistoria	51

Käyttötarkoitus

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarja on real-time RT-PCR-testi, joka on tarkoitettu SARS-CoV-2-viruksen nukleiinihappojen kvalitatiiviseen havaitsemiseen nenänielunäytepuikoista (Nasopharyngeal Swab, NPS), nenänäytepuikoista ja suunielunäytepuikoista, joihin on kerätty näyte henkilöiltä, joilla on COVID-19-taudin merkkejä ja oireita, tai henkilöiltä, joilla ei ole oireita tai muita syitä epäillä COVID-19-tartuntaa.

Se on tarkoitettu avuksi COVID-19-taudin diagnosointiin infektion akuutissa vaiheessa kliinisten havaintojen, potilashistorian ja epidemiologisten tietojen valossa.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarja on tarkoitettu ammattikäyttäjien, kuten koulutetun ja erityisesti real-time PCR- ja *in vitro*-diagnostisista toimenpiteissä koulutusta saaneen kliinisen laboratoriohenkilöstön, käyttöön molekyylibiologisessa laboratorioympäristössä.

Negatiiviset tulokset eivät sulje pois SARS-CoV-2-infektiota, eikä niitä tule käyttää ainoana perusteena potilasta koskevissa hoitopäätöksissä.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kanssa käytetään Rotor-Gene Q (RGQ) MDx System -järjestelmää tai ABI 7500 Fast Dx -alustaa real-time PCR-järjestelmänä.

Kuvaus ja toimintaperiaate

Patogeenitiedot

Koronavirukset, *Coronaviridae*-heimon alaheimo, ovat suuria vaipallisia positiivissäikeisiä RNA-viruksia, jotka aiheuttavat erittäin virulenttia sairautta ihmisissä ja kotieläimissä (1). Koronavirusten tiedetään aiheuttavan kolmannes ihmisten flunssainfektioista, ja ne ovat tunnettu nosokomialaisen ylähengitystieinfektion aiheuttaja keskosilla (2).

Uusi koronavirusheimon laji aiheutti hengitystiesairausepidemian Kiinassa Wuhanissa (1, 3). Ensin uudeksi koronavirukseksi (2019-nCoV) nimetty SARS-CoV-2-virus eroaa SARS-CoV-viruksesta (1, 3), joka aiheutti epidemian vuonna 2003, sekä MERS-CoV-viruksesta, joka on kiertänyt Lähi-idässä vuodesta 2012 alkaen. SARS-CoV-2 on COVID-19-taudin aiheuttaja. SARS-CoV-2-viruksen RNA on havaittavissa infektion aikaisessa vaiheessa ja akuutissa vaiheessa useista erilaisista ylähengitystienäyhteistä (näytepuikkonäyte nenästä, suunielusta ja nenänielusta) (3).

RT-PCR-määrityksistä on tullut SARS-CoV-2-diagnosoinnin kultastandardi potilashistorian ja SARS-CoV-2-epidemiologian arvioinnin lisänä. Euroopan tautien ehkäisy- ja valvontakeskus (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) on ehdottanut RT-PCR-perusteista analyysiä yhdessä immuunimäärityksen kanssa infektiotilan valvontaan ja epidemian hallintaan liittyvien rajoitustoimenpiteiden tehon arviointiin (4, 5).

SARS-CoV-2 Prep&Amp UM -määrityksen kohteina ovat kaksi virusgeeniä (N1- ja N2-geenit), jotka havaitaan samalla fluoresenssikanavalla. Näitä kahta geenikohdetta ei erotella toisistaan, vaan fluoresenssisignaali syntyy kumman tahansa tai kummankin geenikohteen monistumisesta. Positiiviset tulokset viittaavat SARS-CoV-2-viruksen läsnäoloon, mutta eivät sulje pois muiden patogeenien aiheuttamaa samanaikaista infektiota. Toisaalta negatiiviset RT-PCR-tulokset eivät sulje pois infektion mahdollisuutta.

Yhteenveto ja selitykset

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarja koostuu käyttövalmiista järjestelmästä, johon kuuluu yksinkertainen näytteenvalmisteluvaihe, jota seuraa SARS-CoV-2-viruksen RNA:n havaitseminen RT-PCR-menetelmällä joko RGQ MDx -järjestelmän tai ABI 7500 Fast Dx -alustojen avulla (kuva 1). SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri sisältää tarvittavat reagenssit ja entsyymit SARS-CoV-2-viruksen RNA-genomin 72 emäsparin (base pair, bp) ja 67 emäsparialueen spesifiin monistamiseen ja suoraan havaitsemiseen RGQ MDx -laitteiden Green-fluoresenssikanavalla ja ABI 7500 Fast Dx -alustan fluoresenssisuodattimella A/1.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan Primers-alukeseokset ja Probes-koetinseokset sisältävät RNAasi P -monistuksiin tarvittavat oligonukleotidit. Kun amplikoneja havaitaan RGQ MDx -laitteen Yellow-fluoresenssikanavalla tai ABI 7500 Fast Dx -alustan fluoresenssisuodattimella B/2, tiedetään näytepuikossa olevan biologisen näytteen määrän olevan riittävä. Tämä kontrolli on tärkeä biologisten näytteiden olemassaolon varmistamisessa SARS-CoV-2-negatiivisissa näytteissä. Monistamisen on aina oltava havaittavissa, muuten näytteen laatu on kyseenalainen.

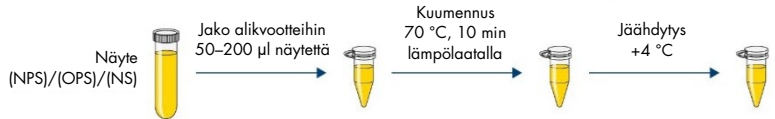
artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarja sisältää myös kolmannen rinnakkaisen monistusjärjestelmän, jonka avulla voidaan havaita mahdollinen RT-PCR-estäjä. Sen osoittaa sisäinen RNA-kontrolli (Internal Control, IC) RGQ MDx -laitteiden Red-fluoresenssikanavalla tai ABI 7500 Fast Dx -alustan fluoresenssisuodattimella E/5. Koska SARS-CoV-2 Amp Primers Mix -alukeseokseen kuuluu sisäinen kontrolli, sen monistuksen pitäisi olla tasainen, ellei näytteessä tai RT-PCR-reaktiossa ole monistuksen estävää tai sitä viivästyttävää RT-PCR-estäjää.

Ulkoiset positiiviset ja negatiiviset kontrollit (mallittomina kontrolleina [No Template Control, NTC] SARS-CoV-2 Positive Control -kontrolli ja nukleasiton vesi) toimitetaan osana *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjaa PCR-vaiheen suorituskyvyn tarkistamista varten. Eristämättömyyskontrollin käyttämistä (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria käytetään eristämättömyyskontrollina [No Extraction Control, NEC]) suositellaan voimakkaasti, jotta voidaan varmistaa, että valmistelupuskurissa ei ole RT-PCR-estäjiä.

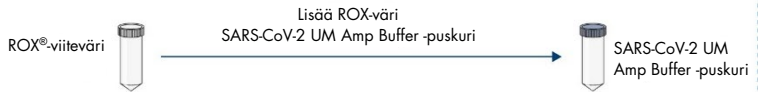
Näiden kontrollien yhdistelmällä valvotaan käänteisen transkription ja PCR-vaiheiden tehoa.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan työnkulku

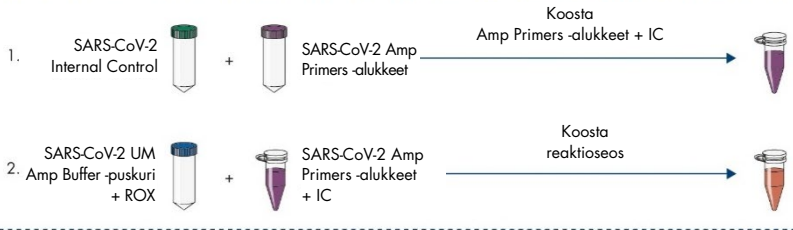
Näytteen/näytteen valmistelu



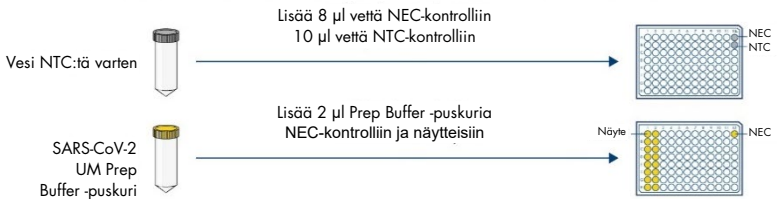
Pääseoksen valmistelu (vain ensimmäinen käyttökerta)



Reaktioseoksen valmistelu

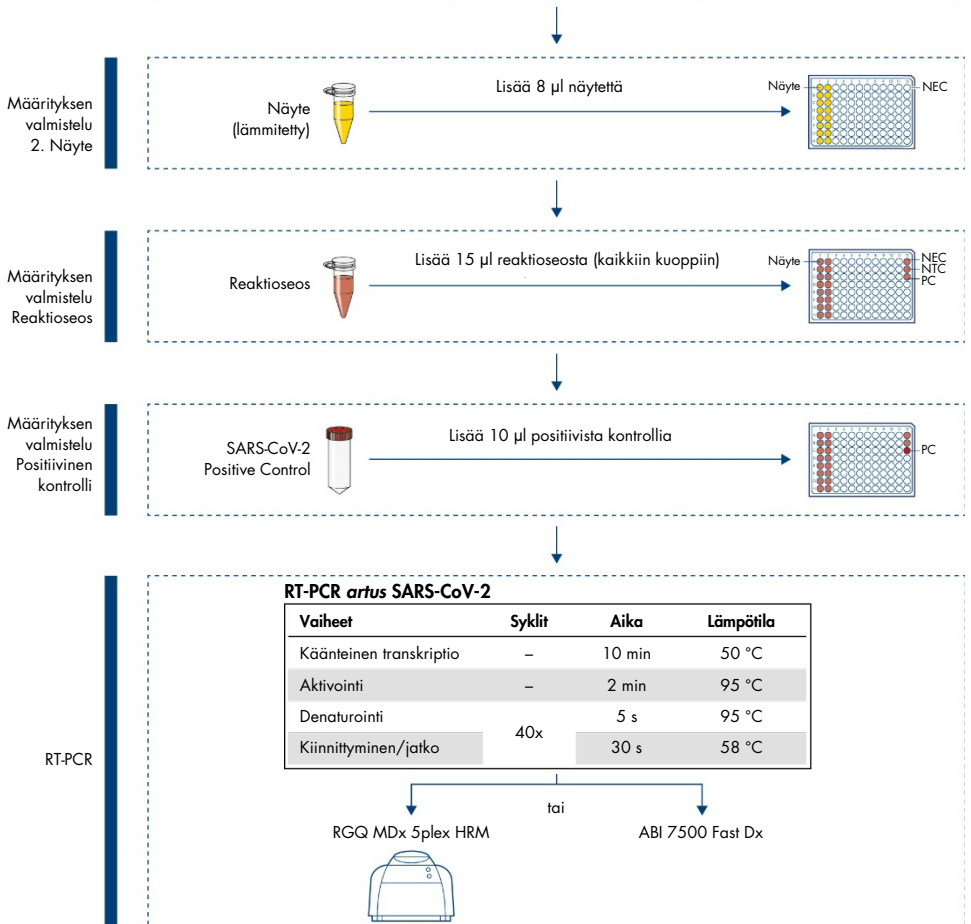


Määrittämisen valmistelu 1. Prep Buffer -puskuri



(jatkuu seuraavalla sivulla)

(jatkuu edelliseltä sivulta)



Kuva 1 artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan työnkulku

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit					
Tuotenumero				4511460	4511469
Reaktioiden määrä				768	3 072
Putken väri	Kannen väri	Nimi	Putken tunnus	Määrä (µl)	Määrä (µl)
Kirkas	Keltainen	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri	Preparation Buffer (Valmistelupuskuri)	2 x 930	8 x 930
Kirkas	Sininen	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri	Master Mix (Pääseos)	4 x 1440	16 x 1440
Kirkas	Violetti	SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet	Primers and Probes (Alukkeet ja koettimet)	4 x 1680	16 x 1680
Kirkas	Vihreä	SARS-CoV-2 Internal Control (Sisäinen SARS-CoV-2-kontrolli)	Internal Control (IC) (Sisäinen kontrolli (IC))	1 x 1390	4 x 1390
Kirkas	Punainen	SARS-CoV-2 Positive Control (Positiivinen SARS-CoV-2-kontrolli)	Positive Control (Positiivinen kontrolli)	1 x 220	4 x 220
Kirkas	Kirkas	Water for NTC (NTC-vesi)	Water (NTC) (Vesi [NTC])	1 x 1900	4 x 1900
Kirkas	Kirkas	ROX Reference Dye -viiteväri	ROX Dye (ROX-väri)	1 x 210	4 x 210

Tarvikesarjan osat

Reagenssit

Jokaisen putken reagenssimäärät on optimoitu kahdeksalle 96 näytteen erälle (768 reaktion sarja) tai kolmellekymmenellekahdelle (32) 96 reaktion erälle (3 072 reaktion sarja), mukaan lukien positiivinen kontrolli (Positive Control, PC), malliton kontrolli (No Template Control, NTC) ja eristämättömyyskontrolli (No Extraction Control, NEC).

Näytteitä voidaan käsitellä ajossa enemmän tai vähemmän, mutta tällöin reagenssien käyttö ei ole tehokasta. Useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämistä suositellaan. Reagensseista voidaan muodostaa alikvootteja, jotta useita pakastus-sulatusjaksoja voidaan välttää.

Alukkeet ja koettimet

SARS-CoV-2-sekvensseihin kohdennetut alukkeet ja koettimet perustuvat Yhdysvaltain tautikeskuksen (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) suunnittelemiin alukkeisiin ja koettiin.

Kontrollit ja kalibraattorit

Määrittys sisältää 5 kontrollia, joilla valvotaan RT-PCR-reaktion tehoa.

Sisäinen kontrolli (Internal Control, IC): Sisäinen kontrolli on yksisäikeinen IVT-RNA, joka vahvistaa käänteisen transkription mahdollisesti estävien kontaminanttien läsnäolon. Sisäinen kontrolli valvoo myös käänteisen transkription tehoa mallittomassa kontrollissa (No Template Control, NTC) ja eristämättömyyskontrollissa (No Extraction Control, NEC).

Malliton kontrolli (No Template Control, NTC): Malliton kontrolli on nukleasitonta vettä. Lisäämällä sitä PCR-levyyn voidaan varmistaa, ettei PCR-levyn valmistelun aikana näytteisiin pääse kontaminanteja, jotka voisivat vääristää SARS-CoV-2-kohteiden tulkintaa.

Positiivinen kontrolli (Positive Control, PC): Positiivinen kontrolli on kaksoiskierteinen DNA, joka on monistettu SARS-CoV-2-alukkeilla ja -koettimilla (P&P-seos). Sen havaitseminen vahvistaa PCR-monistusvaiheessa käytettävän reagenssin toimivuuden.

Eristämättömyyskontrolli (No Extraction Control, NEC): Eristämättömyyskontrolli koostuu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurista. Käsittelemällä se kliinisten näytteiden rinnalla voidaan varmistaa, ettei näytteen valmistelun aikana näytteisiin pääse kontaminantteja, jotka voisivat vääristää SARS-CoV-2-kohteiden tulkintaa.

Näytteenoton kontrolli: Näytteenoton kontrolli havaitsee RNAasi P -geenin ja on tärkeä biologisen näytteen olemassaolon varmistamisessa SARS-CoV-2-negatiivissa näytteissä. Näytteenoton kontrollin monistuksen pitää aina olla havaittavissa, muuten näytteen laatu on kyseenalainen.

Alustat ja ohjelmisto

Varmista ennen käyttöä, että laitteet on huollettu ja kalibroitu valmistajan suositusten mukaan. Tätä sarjaa voi käyttää kahdella työnkululla, joihin tarvitaan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- tai ABI 7500 Fast Dx -laite ja laitteeseen liittyvä ohjelmisto:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3.1 tai uudempi
- ABI 7500 Fast Dx: SDS-ohjelmistoversio 1.4.1 tai uudempi.

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Tarvikkeet

- Kertakäyttöiset, puuterittomat käsiineet
- Steriilejä ja nukleasittomia suodattimellisia pipettikärkiä
- 1,5 ml:n tai 2 ml:n putkia (ei PCR)
- 0,1 ml:n PCR-putket käytettäväksi Rotor-Gene® Q MDx -laitteessa (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, tuotenro 981103)
- 96-kuoppainen MicroAmp™ käytettäväksi ABI 7500 Fast Dx qPCR -alustalla (Applied Biosystems 96-well plate, tuotenro N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive Film -kalvo käytettäväksi ABI 7500 Fast Dx qPCR -alustalla (Applied Biosystems, tuotenro 4360954)

Välineet*

- Pöytämallinen sentrifugi, jossa on roottori 2 ml:n reaktioputkille
- Pipettejä (säädettäviä)
- Vortex-sekoitin
- Laattalämmitin
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (tuotenro 9002032) ja Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3.1 tai uudempi
- Rotor-Disc 72 Rotor (tuotenro 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (tuotenro 9018900)
- 72-kuoppainen latauslohko (QIAGEN Loading Block 72 x 0.1 ml tubes, tuotenro 9018901)
- Vaihtoehtoisesti: ABI 7500 Fast Dx qPCR -alusta (Thermo Fisher Scientific®, tuotenro 4406985) ja ohjelmistoversio 1.4.1 tai uudempi ja sentrifugi, jossa 96-kuoppainen levy

* Varmista ennen käyttöä ja tarvittaessa, että laitteet on tarkistettu ja kalibroitu valmistajan suositusten mukaan.

Varoitukset ja varotoimet

Huomaa, että saatat joutua tarkistamaan paikalliset määräykset laitteeseen liittyvien vakavien vaaratilanteiden raportoinnista valmistajalle ja käyttäjän ja/tai potilaan oleskelumaan toimivaltaiselle viranomaiselle.

Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (Safety Data Sheets, SDS). Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina osoitteessa **www.qiagen.com/safety**. Voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjojen ja niiden osien käyttöturvallisuustiedotteet.

Käytä aina asianmukaisia suojavarusteita, mukaan lukien kertakäyttöiset, puuterittomat käsineet, laboratoriotakki ja suojalasit. Suojaa iho, silmät ja limakalvot. Vaihda käsineitä usein käsitellessäsi näytteitä.

Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina. Noudata aina varotoimia, jotka on kuvattu sovellettavissa ohjeistuksissa, kuten Clinical and Laboratory Standards Institute® *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guidelines (M29)*, tai muissa soveltuviissa asiakirjoissa.

Näytteet voivat olla tartuntavaarallisia. Hävitä näyte- ja määritysäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

Varotoimet

- Noudata vakiomuotoisia laboratorio-ohjeita työalueen puhtaana ja kontaminoitumattomana pitämisestä. Osoita RNA:n käsittelylle erillinen alue välineineen.
- Vältä ristikontaminaatiota noudattamalla hyviä laboratorioskäytäntöjä.
- Pyri huolellisesti välttämään RNAasi-kontaminaatio tutkimuksen aikana ja käytä RNAasittomia astioita.
- Varmista tietojen, erityisesti näytetunnisteiden, hyvä jäljitettävyys.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivämäärää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjaa voidaan säilyttää $-30...-15$ °C:ssa 6 kuukautta tai viimeiseen käyttöpäivään asti.

Näytteiden kuljetus, säilytys ja käsittely

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit on tarkoitettu käytettäväksi nenänielu-, nenä- ja suunielunäytepuikkojen kanssa. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.

Yhdysvaltain tautikeskus (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) sekä Public Health England -viranomaiset ovat antaneet ohjeistuksen kliinisten näytteiden ottamisesta, käsittelystä ja testauksesta. Katso lisäohjeita näistä ohjeista tai muista soveltuvista kansallisista ohjeistavista laboratorioprotokollista.

Näytteenotto, kuljetus ja säilytys

Katso tavarantoimittajan suositukset puikkonäytteiden ottamisesta, säilytyksestä ja kuljetuksesta. Puikot on upotettava kokonaan kuljetusaineeseen, jotta näyte on luotettava.

Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus RGQ MDx 5plex HRM -laitteella

Tässä protokollassa kuvataan näytteen ja RT-PCR-toimenpiteen valmistelua SARS-CoV-2-kohteiden tunnistamisessa ihmisen nenästä, nenänielusta tai suunielusta otetuista, kuljetusaineessa säilytetyistä puikkonäytteistä RGQ MDx 5plex HRM -laitteen avulla.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tarkista, että pakkaukseen ja kaikkien osien etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäiviä ja säilytysolosuhteita on noudatettu. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Käytä hyvin huollettuja ja kalibroituja laitteita.
- Varo RNAasi-kontaminaatiota kokeen aikana ja käytä nukleaasittomia muovitarvikkeita.

Ennen kuin aloitat

- Näytteitä voi pitää huoneenlämmössä valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Anna ennen käyttöä SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden, SARS-CoV-2 IC -sisäisen kontrollin, veden mallitonta kontrollia varten ja positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin sulaa kokonaan huoneenlämmössä (15–25 °C). Säilytä putkia huoneenlämmössä ennen käyttöä ja suoja ne valolta.
- Homogenisoi SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri ja SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ennen käyttöä kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja (älä käytä vortex-laitetta) pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti. Kaikki muut yksittäiset reagenssit voidaan homogenisoida pulssivorteksoimalla niitä 3–5 sekunnin ajan tai kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri estää havaitsemisvaiheessa kliinisissä näytteissä olevat RNAasit, mutta se ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.

- Varmista, että qPCR-alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen RT-PCR-levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

Toimenpide

1. Näytteen valmistelu
 - 1a. Vorteksoi näytteen sisältävää näytepuikkoa voimakkaasti.
 - 1b. Jaa 50–200 µl näytettä alikvooteiksi 1,5 ml:n ei-PCR-putkiin.
 - 1c. Lämmitä laattalämmittimellä 70 °C:ssa 10 minuuttia. Jäähdytä näytteitä jäällä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Valmistele ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX-viitevärillä.
 - 2a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä yhteen SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
 - 2b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
 - 2c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
3. Valmistele täyttää RGQ MDx -levyä (72 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja sisäisen SARS-CoV-2 Internal Control -kontrollin alikvoottiseos.
 - 3a. Siirrä vaaditut määrät SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäistä kontrollia taulukon 1 mukaan uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
 - 3b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
 - 3c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältävät SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet putken pohjalle.

Taulukko 1. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seoksen valmistelu

SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos				Reaktioiden lukumäärä Määrä (µl)
Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	1 rxn	72 rxn (+22 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet	3,45x	1x	7,25	638
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopiota/µl	10 kopiota/µl	1,5	132
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos yhteensä			8,75	770

* **Huomautus:** Säädä SARS-CoV-2 UM Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin määrät testattavien näytteiden lukumäärän mukaan. Lisätilavuus kompensoi tyhjän tilavuuden.

4. Valmista reaktioseos taulukon 2 mukaan ja sekoita perusteellisesti.

Taulukko 2. Reaktioseoksen valmistelu

RT-PCR-reaktioseos				Reaktioiden lukumäärä Määrä (µl)
Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	1 rxn	72 rxn (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri†	4x	1x	6,25	540
SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet‡	2,9x	1x	8,75	756
Reaktioseoksen kokonaismäärä	–		15,00	1296

* **Huomautus:** Säädä SARS-CoV-2 UM Amp -puskurin ja SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden määrät testattavien näytteiden lukumäärän mukaan. Lisätilavuus kompensoi tyhjän tilavuuden.

† ROX-viiteväriillä valmistettu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri.

‡ Sisäisellä SARS-CoV-2 Internal Control -kontrollilla valmistellut SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet.

- Annostele 8 µl nukleasitonta vettä NEC-kontrollin PCR-putkeen.
- Lisää 10 µl nukleasitonta vettä NTC-kontrollin PCR-putkeen.
- Annostele 2 µl of SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria jokaiseen NEC-kontrollille ja valmistetuille näytteille määritettyyn PCR-putkeen.
- Lisää 8 µl valmistettua näytettä PCR-putkeen, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.

9. Lisää 15 µl vaiheessa 4 valmistettua reaktioseosta näytteiden ja kontrollien putkiin (esimerkki kuvassa 2). Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa ja sulje sitten PCR-putkien korkit, paitsi positiiviseksi SARS-CoV-2 Positive Control -kontrolliksi varatun putken korkki.

Huomautus: sulje putket tiukasti, jotta ristikontaminaatiota ei pääse tapahtumaan.

10. Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun PCR-putkeen. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.

11. Aseta RGQ MDx 5plex HRM -laitteen RT-PCR-ohjelma taulukon 3 ohjeiden mukaisesti.

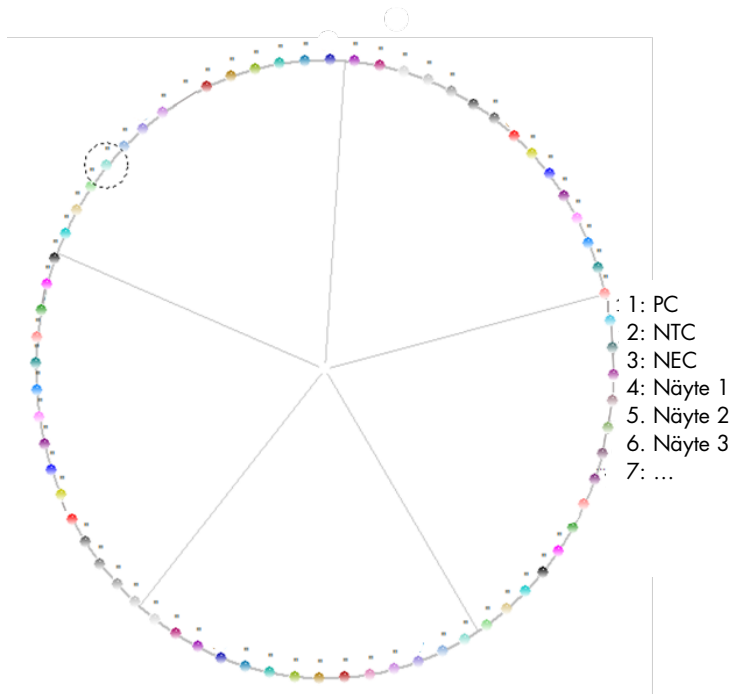
Huomautus: tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

12. Aseta putket reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen (esimerkki putkien asetelusta on kuvassa 2) ja käynnistä ohjelma taulukon 3 ohjeiden mukaisesti.

Huomautus: noudata huolellisesti samaa putkien sijoittamista ja järjestystä määrittämisen ja reaaliaikaisen jaksotuksen aikana.

Taulukko 3. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM -ohjelma

Vaiheet	Aika	Lämpötila (°C)	Jaksojen määrä	Keruu
Käänteinen transkriptio	10 min	50	1	Ei
PCR:n alun lämpöaktivointi	2 min	95	1	Ei
2-vaiheinen jaksotus				
Denaturointi	5 s	95	40	Ei
Kiinnittyminen/ laajeneminen	30 s	58		Green (FAM), Yellow (HEX) ja Red (Atto)



Kuva 2. Esimerkki putkien asettelusta RGQ MDx 5plex HRM -alustaan

13. Valitse New Run Wizard (Ohjattu uusi ajo) -valintaikkunasta **Gain Optimisation** (Vahvistuksen optimointi) ja avaa **Auto-Gain Optimisation Setup** (Automaattisen vahvistuksen optimoinnin asetukset).

14. Tarkista, että keräyskanavat on asetettu taulukon 4 mukaisesti.

Taulukko 4. RGQ MDx 5plex HRM -laitteen konfigurointi

Nimi	PC-putken paikka	Vähimmäislukema (FI)	Enimmäislukema (FI)	Vähimmäisvahvistus	Enimmäisvahvistus
Green	1 *	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1 *	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1 *	5 FI	10 FI	-10	10

* **Huomautus:** asetettava positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin putken paikan mukaan.

15. Valitse **Perform optimization before the first acquisition** (Suorita optimointi ennen ensimmäistä keruuta).

16. Aloita ajo.

17. Analysoi tulokset ajon lopussa (katso kohta Tulokset).

Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus ABI 7500 Fast Dx -laitteella

Tämä on protokolla SARS-CoV-2-kohteiden valmisteluun ja tunnistamiseen ihmisen nenästä, nenänielusta tai suuanielusta otetuista, kuljetusaineessa säilytetyistä puikkonäytteistä ABI 7500 Fast Dx qPCR -instrumentin avulla.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tarkista, että pakkaukseen ja kaikkien osien etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäiviä ja säilytysolosuhteita on noudatettu. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Käytä hyvin huollettuja ja kalibroituja laitteita.
- Varo RNAasi-kontaminaatiota kokeen aikana ja käytä nukleaasittomia muovitarvikkeita.
- ABI 7500 Fast Dx -laitetta käytettäessä ROX-väri on lisättävä pääseosputkeen ennen ensimmäistä käyttökertaa.

Ennen kuin aloitat

- Näytteitä voi pitää huoneenlämmössä valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- ROX-värin käyttö on pakollista ABI 7500 Fast Dx -laitetta käytettäessä.
- **Tiedonkeruussa on käytettävä passiivisen ROX-värin asetusta.**
- Anna ennen käyttöä SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden, SARS-CoV-2 IC -sisäisen kontrollin, veden mallitonta kontrollia varten ja positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin sulaa kokonaan huoneenlämmössä (15–25 °C). Säilytä putkia huoneenlämmössä ennen käyttöä ja suoja ne valolta.

- Homogenisoi SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri ja SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ennen käyttöä kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja (älä käytä vortex-laitetta) pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti. Kaikki muut yksittäiset reagenssit voidaan homogenisoida pulssivorteksoimalla niitä 3–5 sekunnin ajan tai kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri estää havaitsemisvaiheessa kliinisissä näytteissä olevat RNAasit, mutta se ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että qPCR-alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen RT-PCR-levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

Toimenpide

1. Näytteen valmistelu
 - 1a. Vorteksoi näytteen sisältävää näytepuikkoa voimakkaasti.
 - 1b. Jaa 50–200 µl näytettä alikvooteiksi 1,5 ml:n ei-PCR-putkiin.
 - 1c. Lämmitä laattalämmittimellä 70 °C:ssa 10 minuuttia. Jäähdytä näytteitä jäällä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Valmistele ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX-viitevärillä.
 - 2a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
 - 2b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
 - 2c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
3. Valmistele täyttää ABI 7500 Fast Dx -levyä (96 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja sisäisen SARS-CoV-2 Internal Control -kontrollin alikvoottiseos.
 - 3a. Siirrä tarvittava määrä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja sisäistä SARS-CoV-2 Internal Control -kontrollia taulukon 5 mukaisesti uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
 - 3b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.

- 3c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältävät SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet, jotta liuos laskeutuu putken pohjalle.

Taulukko 5. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seoksen valmistelu

SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos				Reaktioiden lukumäärä Määrä (µl)
Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	1 rxn	96 rxn (+21 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	841
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopiota/µl	10 kopiota/µl	1,5	174
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos yhteensä			8,75	1015

* **Huomautus:** Säädä SARS-CoV-2 UM Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin määrät testattavien näytteiden lukumäärän mukaan. Lisätilavuus kompensoi tyhjän tilavuuden.

4. Valmista reaktioseos taulukon 6 mukaan ja sekoita perusteellisesti.

Taulukko 6. Reaktioseoksen valmistelu

RT-PCR-reaktioseos				Reaktioiden lukumäärä Määrä (µl)
Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	1 rxn	96 rxn (+20%:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri†	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet‡	2,9x	1x	8,75	1008
Reaktioseoksen kokonaismäärä	–		15,00	1728

* **Huomautus:** Mukauta SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden määrää testattavien näytteiden määrän mukaan. Lisätilavuus kompensoi tyhjän tilavuuden.

† ROX-viitevärillä valmistettu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri

‡ Sisäisellä SARS-CoV-2 Internal Control -kontrollilla valmistellut SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet

5. Annostele 8 µl nukleasitonta vettä NEC-kontrollin kuoppaan.
6. Lisää 10 µl nukleasitonta vettä NTC-kontrollin kuoppaan.
7. Annostele 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria sekä NEC-kontrollin että valmisteltujen näytteiden kuoppiin.

8. Lisää 8 µl valmisteltua näytettä kuoppaan, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
9. Lisää 15 µl vaiheessa 4 valmisteltua reaktioseosta näytteiden ja kontrollien kuoppiin (esimerkki kuvassa 3). Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
10. Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun kuoppaan. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
11. Sulje PCR-levy tiiviisti, jotta ristikontaminaatiota ei pääse tapahtumaan. Painele tasaisesti koko levyn alueelta, jotta myös kuoppien välit sulkeutuvat tiiviisti.
12. Sentrifugoi PCR-levy lyhyesti, jotta neste laskeutuu kuoppien pohjalle.
13. Valmistele RT-PCR-ohjelma ABI 7500 Fast Dx -laitteen Standard 7500 -ajotilassa taulukon 7 ohjeiden mukaan.
Huomautus: tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.
Huomautus: katso lisätietoja *ABI 7500 Fast Dx -käyttöohjeesta*.
14. Aseta levy reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen (esimerkki putkien asettelusta PCR-levyssä on kuvassa 3) ja käynnistä ohjelma taulukon 7 ohjeiden mukaisesti.
15. Valitse käytössä olevat kuopat ja käytä FAM-, VIC- ja Cy5-raportointeja. Tiedonkeruussa passiivisen ROX-värin asetuksen on oltava **ON** (Käytössä).
16. Tarkista, että ABI 7500 Fast Dx -laitteessa Standard Curve (Standardikäyrä) -asetuksena on Absolute Quantitation (Absoluuttinen kvantitointi).
17. Aloita ajo.
18. Analysoi tulokset ajon lopussa (katso kohta Tulokset).

Taulukko 7. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM -ohjelma

Vaiheet	Aika	Lämpötila (°C)	Jaksojen määrä	Keruu
Käänteinen transkriptio	10 min	50	1	Ei
PCR:n alun lämpöaktivointi	2 min	95	1	Ei
2-vaiheinen jaksotus				
Denaturointi	5 s	95	40	Ei
Kiinnittyminen/ laajeneminen	30 s	58		Green (FAM), Yellow (VIC) ja Red (Cy5)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											
B	NTC											
C	NEG											
D	Sample 1											
E	Sample 2											
F	Sample 3											
G	---											
H												

Kuva 3. Esimerkki levyn asettelusta ABI 7500 Fast Dx -laitteessa

Tulokset

RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa tiedot analysoidaan Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3.1 (tai uudemman) avulla valmistajan ohjeiden mukaan (Rotor-Gene Q MDx -käyttöopas, versio 7, syyskuu 2018). Eri analyysien yhdenmukaisuus varmistetaan seuraavilla testiparametreilla (taulukko 8).

Taulukko 8. RGQ MDx 5plex HRM -laitteen testiparametrit

Kanavat	Green	Red	Yellow
Fluoresenssikynnys	0,03	0,03	0,03
Kulmakertoimen korjaus	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Dynaaminen putki	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Mittauspiste	Ei	10-20	10-20
Poikkeavan arvon poisto Reaktion tehokkuuden kynnysarvo	Kyllä Käytössä: 0 %	Ei	Ei
Rajatut aloitusykli	5	5	5
Katkaistut sykli	Ct > 38,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ei	Ct > 35,00 tulkitaan arvoksi 40,00

RGQ-ohjelmistossa ajon tulokset näkyvät analyysin aikana aukeavassa kvantitointitulostaulukossa. Valittujen näytteiden tiedot kootaan taulukkoon, joka voidaan viedä Excel®-tiedostona napsauttamalla ruudukkoa hiiren kakkospainikkeella ja valitsemalla **Export to Excel** (Vie Excel-tiedostoon). Varmista, että kaikki näytteet ovat valittuina, ennen kuin viet tulokset.

ABI-laitteessa tiedot analysoidaan 7500 Fast System Software -versiolla 1.4.1 (tai uudemmalla) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Eri analyysien yhdenmukaisuus varmistetaan seuraavilla parametreilla (taulukko 9).

Taulukko 9. ABI 7500 Fast Dx -laitteen testiparametrit

Kanavat	FAM*	VIC/HEX*	Cy5/Atto*
Passiivinen väri	ROX	ROX	ROX
Fluoresenssikynnys	0,13	0,05	0,025
Perustaso	Automaattinen	Automaattinen	Automaattinen
Katkaistut syklit	Ct > 39,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ei	Ct > 35,00 tulkitaan arvoksi 40,00

* FAM = suodatin A/1 ABI-alustassa, VIC/HEX = suodatin B/2 ABI-alustassa, Cy5/Atto = suodatin E/5 ABI-alustassa

ABI SDS -ohjelmistossa valitun kuopparyhmän tai koko levyn Ct-arvot ovat saatavilla **Results** (Tulokset) -pääosion **Report** (Raportti) -lehdessä. Tiedot voidaan viedä pilkulla erotettuna arvotekstinä csv-muodossa (suositeltu): Valitse SDS-ohjelmistoikkunassa **File** (Tiedosto) > **Export** (Vie) > **Results** (Tulokset) (myös valikkokohdan **Ct** voi valita). Valitse vientitiedoston muodoksi csv.

Tulosten tulkitseminen

Positiivinen kontrolli (Positive Control, PC) sekä N1- ja N2-geenit havaitaan Green-fluoresenssikanavassa RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa (tai FAM-fluoresenssikanavassa ABI-alustassa).

Näytteenoton kontrolli, joka koostuu RNAasi P:stä, havaitaan Yellow-fluoresenssikanavassa RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa (tai VIC/HEX-fluoresenssikanavassa ABI-alustassa). Jokaisessa kliinisessä näytteessä pitäisi näkyä näytteen kontrollin monistuminen. Positiivisessa kontrollissa keltainen monistuminen voi näkyä, vaikka ihmisperäisiä sekvenssejä ei olisi. Tässä tapauksessa positiivisen kontrollin signaali keltaisessa kanavassa voidaan jättää huomiotta, koska vihreän kanavan vahva fluoresenssignaali voi vuotaa keltaiseen kanavaan.

Sisäinen kontrolli (Internal Control, IC) sisältyy SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeisiin. Se havaitaan mallittomassa kontrollissa (No Template Control, NTC), eristämättömyyskontrollissa (No Extraction Control, NEC), positiivisessa kontrollissa (Positive Control, PC) ja kliinisissä näytteissä Red-fluoresenssikanavassa RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa (tai Cy5/Atto-fluoresenssikanavassa ABI-alustassa).

Jotta RT-PCR-ajojen kelvollisuus voidaan todeta, PC-, NTC- ja NEC-kontrollien on monistuttava ja ne on havaittava odotetusti.

Taulukko 10. Ajon kelvollisuuden kriteerit ja tulosten tulkitseminen RGQ MDx 5plex HRM -laitteella

Kontrolli	Havainto Green-kanavalla	Havainto Yellow-kanavalla	Havainto Red-kanavalla	Tulkinta
Positiivinen kontrolli (PC)	Ct ≤ 38,00	Merkityksetön	Merkityksetön	Ajo on kelvollinen.
	Ct > 38,00 tai ei Ct:tä	Merkityksetön	Merkityksetön	Ajo ei ole kelvollinen.
Malliton kontrolli (NTC) tai eristämättömyyskontrolli (NEC)	Ct > 38,00 tai ei Ct:tä	Ct > 35,00 tai ei Ct:tä	Kyllä	Ajo on kelvollinen.
	Mikä tahansa muu vihreän tai keltaisen monistumisen yhdistelmä		Merkityksetön	Ajo ei ole kelvollinen.

Taulukko 11. Ajon kelvollisuuden kriteerit ja tulosten tulkitseminen ABI 7500 Fast Dx -laitteella

Kontrolli	Havainto FAM-värissä*	Havainto VIC/HEX-värissä*	Havainto Cy5/Atto-värissä*	Tulkinta
Positiivinen kontrolli (PC)	Ct ≤ 39,00	Merkityksetön	Merkityksetön	Ajo on kelvollinen.
	Ct > 39,00 tai ei Ct:tä	Merkityksetön	Merkityksetön	Ajo ei ole kelvollinen.
Malliton kontrolli (NTC) tai eristämättömyyskontrolli (NEC)	Ct > 39,00 tai ei Ct:tä	Ct > 35,00 tai ei Ct:tä	Kyllä	Ajo on kelvollinen.
	Mikä tahansa muu FAM- tai VIC/HEX-kanavan monistumisen yhdistelmä		Merkityksetön	Ajo ei ole kelvollinen.

* FAM = suodatin A/1 ABI-alustassa, VIC/HEX = suodatin B/2 ABI-alustassa, Cy5/Atto = suodatin E/5 ABI-alustassa

Jotta testatut näytteet voidaan hyväksyä, näytteiden täytyy monistua ja olla havaittavissa odotetulla tavalla.

Taulukko 12. Näytteen kelvollisuuden kriteerit ja tulosten tulkitseminen RGQ MDx 5plex HRM -laitteella

Havainto Green-kanavalla	Havainto Yellow-kanavalla	Havainto Red-kanavalla	Tulkinta
Ct ≤ 38,00	Merkityksetön	Merkityksetön	Näyte on positiivinen SARS-CoV-2:n RNA:lle.
Ct > 38,00 tai ei Ct:tä	Ct ≤ 35,00	Merkityksetön	Näyte on negatiivinen, SARS-CoV-2:n RNA:ta ei havaittu.
Ct > 38,00 tai ei Ct:tä	Ct > 35,00 tai ei Ct:tä	Kyllä	Virheellinen näyte. Ihmisperäistä ainesta ei havaittu, tai sitä on liian vähän. Näyte on otettava uudelleen.
Ct > 38,00 tai ei Ct:tä	Ct > 35,00 tai ei Ct:tä	Ei	Virheellinen näyte. RT-qPCR-reaktio on estynyt. Testi on tehtävä uudelleen.

Taulukko 13. Näytteen kelvollisuuden kriteerit ja tulosten tulkitseminen ABI 7500 Fast Dx -laitteella

Havainto FAM-värissä*	Havainto VIC/HEX-värissä*	Havainto Cy5/Atto-värissä*	Tulkinta
Ct ≤ 39,00	Merkityksetön	Merkityksetön	Näyte on positiivinen.
Ct > 39,00 tai ei Ct:tä	Ct ≤ 35,00	Merkityksetön	Näyte on negatiivinen, SARS-CoV-2:ta ei havaittu.
Ct > 39,00 tai ei Ct:tä	Ct > 35,00 tai ei Ct:tä	Kyllä	Virheellinen näyte. Ihmisperäistä ainesta ei havaittu. Näyte on otettava uudelleen.
Ct > 39,00 tai ei Ct:tä	Ct > 35,00 tai ei Ct:tä	Ei	Virheellinen näyte. RT-qPCR-reaktio on estynyt. Testi on tehtävä uudelleen.

* FAM = suodatoin A/1 ABI-alustassa, VIC/HEX = suodatoin B/2 ABI-alustassa, Cy5/Atto = suodatoin E/5 ABI-alustassa

Rajoitukset

- Vain *in vitro* -diagnostiikkaan.
- *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan tuloksia ei ole tarkoitettu käytettäväksi ainoana perusteena diagnoosille, hoidolle tai muille potilaan hoitopäätöksille. Negatiiviset tulokset eivät sulje pois SARS-CoV-2-infektiota, eikä niitä saa käyttää potilasta koskevien hoitopäätösten ainoana perusteena.
- Tätä tuotetta saavat käyttää ainoastaan henkilöt, jotka ovat saaneet erityisopastuksen ja -koulutuksen *in vitro* -diagnostisiin toimenpiteisiin.
- Hyvät PCR-tulokset edellyttävät qPCR-alustan käyttöoppaan (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx tai ABI 7500 Fast Dx) tarkkaa noudattamista.
- Kaikkien komponenttien pakkauksiin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

Suorituskyky

Analyttinen herkkyys (havaitsemisraja)

Analyttinen herkkyys eli havaitsemisraja määritetään pienimmäksi pitoisuudeksi, jossa testatuista näytteistä $\geq 95\%$ tuottaa positiivisen tunnistuksen.

Havaitsemisraja (Limit of Detection, LoD) arvioitiin analysoimalla sarjalaimennokset negatiivisista nenänielunäytteistä, jotka oli valmisteltu kaupallisilta hankkijoilta (ZeptoMetrix®) hankituista korkean titterin varastoiduista, inaktivoituista viruspartikkeleista. Jotta aikaansaatu LoD-pitoisuus olisi vahvistettu, kaikkien replikaattien havaitsemisasteen on oltava $\geq 95\%$ (vähintään 19/20 replikaatin on luotava positiivinen signaali). LoD-pitoisuus vahvistettiin molemmilla ilmoitetuilla real-time PCR-alustoilla kahdella eri reagenssierällä.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan molempien real-time PCR-alustojen väitetty havaitsemisraja on 950 cp/ml.

Analyttisen spesifisyyden tutkimukset (inklusiivisuus ja eksklusiivisuus/ristireaktiiviteetti)

Inklusiivisuus

artus SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja Probes -koetinten inklusiivisuus arvioitiin GISAID-tietokannassa (www.gisaid.org) saatavilla olevien sekvenssien *in silico* -analyysin avulla. Yhteensä 722 488 sekvenssiä (saatavilla 23/03/2021) analysoitiin COVID CG -työkalulla (<https://covidcg.org>), ja analyysissä käytettiin GISAID-metatietoja. Sekvenssit sovitettiin WIV04-viitesekvenssiin (100-prosenttisesti identtinen Wuhan-Hu-1/NC_045512.2 -sekvenssin kanssa poly-A-häntää lukuun ottamatta) ja yksittäiset nukleotidivariaatiot (Single Nucleotide Variation, SNV) analysoitiin genomisella alueella, jonka kohteet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan alukkeet ja koettimet määrittävät. Tunnistettujen SNV-variaatioiden esiintyvyyksi pysyi alle 1 %:n, samoin kuin yhtäaikaisten mutaatioiden esiintymistiheys.

SNV-variaatioita ei havaittu vähintään 1–3 nukleotidin alueella kyseisten oligonukleotidien 3'-päästä, minkä olisi odotettu vaikuttavan tulokseen. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjaa pidetään kyvykkäänä havaitsemaan 100 % julkaistuista sekvensseistä.

Eksklusiivisuus/ristireaktiivisuus

In silico -analyysi

artus SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja Probes -koettinten eksklusiivisuus arvioitiin NCBI-tietokantaan tallennettujen sekvenssien *in silico* -analyysin avulla. *In silico* -analyysi osoitti, että joidenkin testattujen patogeenien homologisuus on yli 80 % jonkin *artus* SARS-CoV-2 -alukkeen tai -koettimen kanssa. Tällaisia patogeenejä ovat mm. *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* ja *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin homologisuus oli alle 80 % yhden SARS-CoV-2-määrittelyn alukkeen/koettimen kanssa. Kuitenkaan *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet ja Probes -koettimet eivät osoittaneet mahdollista monistumista NCBI nr/nt-tietokantaan tallennettujen erilaisten sekvenssien kanssa.

Yhteensä 36 bakteri-, virus- ja sienikantaa analysoitiin *in silico* PCR-menetelmällä, kun rajoitettu mahdollinen amplikonikoko oli 500 bp. Patogeenisekvenssit koottiin NCBI-tietokannasta, mutta mikään näistä patogeeneistä ei osoittanut monistumista *in silico*.

Taulukko 14. Luettelo *in silico* -testatuista patogeeneistä.

Patogeenit	Kanta/tyyppi	Taksonominen tunnus	<i>In silico</i> PCR -tulokset
<i>Adenovirus 3</i>	Tyyppi 3	45659	Ei vastaavuutta
<i>Adenovirus 4</i>	Tyyppi 4	28280	Ei vastaavuutta
<i>Adenovirus 5</i>	Tyyppi 5	28285	Ei vastaavuutta
<i>Adenovirus 7A</i>	Tyyppi 7A	85755	Ei vastaavuutta
<i>Adenovirus 14</i>	Tyyppi 14	10521	Ei vastaavuutta
<i>Adenovirus 31</i>	Tyyppi 31	10529	Ei vastaavuutta
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Ei vastaavuutta
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Ei mahdollista monistumista*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Ei vastaavuutta
Enterovirus	Tyyppi 68	42789	Ei vastaavuutta

* Sekvenssivastaavuus yhden alukkeen/koettimen kanssa osoitti < 80 %:n homologisuuden.

† Sekvenssivastaavuus yhden alukkeen/koettimen kanssa osoitti ≥ 80 %:n homologisuuden.

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 14 (jatkuu edelliseltä sivulta)

Patogeenit	Kanta/tyyppi	Taksonominen tunnus	<i>In silico</i> PCR -tulokset
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Ei vastaavuutta
Ihmisen koronavirus	229E	11137	Ei vastaavuutta
Ihmisen koronavirus	NL63	277944	Ei vastaavuutta
Ihmisen koronavirus	HKU-1	290028	Ei vastaavuutta
Ihmisen koronavirus OC43	OC43	31631	Ei vastaavuutta
Ihmisen koronavirus	MERS-CoV	1335626	Ei vastaavuutta
Ihmisen metapneumovirus	–	162145	Ei vastaavuutta
Influenssa A	H1N1	114727	Ei vastaavuutta
Influenssa A	H3N2	119210	Ei vastaavuutta
Influenssa B	–	11520	Ei vastaavuutta
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Ei vastaavuutta
Parainfluenssavirus	Tyyppi 1	12730	Ei vastaavuutta
Parainfluenssavirus	Tyyppi 2	2560525	Ei vastaavuutta
Parainfluenssavirus	Tyyppi 3	11216	Ei vastaavuutta
Parainfluenssavirus	Tyyppi 4	2560526	Ei vastaavuutta
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Ei vastaavuutta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Ei mahdollista monistumista*
Respiratorinen syntyiaalivirus	Tyyppi A (RSV-A)	208893	Ei vastaavuutta
Respiratorinen syntyiaalivirus	Tyyppi B (RSV-B)	208895	Ei vastaavuutta
Rinovirus	Tyyppi A	147711	Ei vastaavuutta
Rinovirus	Tyyppi B	147712	Ei vastaavuutta
SARS-koronavirus	Tor2	694009	Ei mahdollista monistumista [†]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	1282	Ei vastaavuutta
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	1314	Ei mahdollista monistumista [†]
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Ei mahdollista monistumista [†]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Ei vastaavuutta

* Sekvenssivastaavuus yhden alukkeen/koettimen kanssa osoitti < 80 %:n homologisuuden.

[†] Sekvenssivastaavuus yhden alukkeen/koettimen kanssa osoitti ≥ 80 %:n homologisuuden.

In vitro -analyysi

Ristireaktiivisuus vahvistettiin in vitro patogeeneille, joiden homologisuus SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden kanssa oli ollut $\geq 80\%$ in silico -analyysissä. Näytteet valmisteltiin lisäämällä mahdollisesti ristireaktiivisia organismeja nenänielunäytepuikkomatriisiin pitoisuudella 10^6 cp/ml, lukuun ottamatta SARS-CoV-1-virusta, joka testattiin laimentamattomana toimittajan suositusten mukaisesti. Mikään näistä patogeeneistä ei osoittanut in vitro -ristireaktiivisuutta.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -määrityksen mikrobialinen häiriönkesto testattiin in vitro suositelluista patogeeneistä muodostetulla paneelilla. Näytteet valmisteltiin lisäämällä enintään 5 patogeeniä – viruskohteet pitoisuudella 105 TCID₅₀/ml, bakteeri- ja sienikohteet pitoisuudella 10^6 cp/ml tai varastopitoisuuden mukaisella mahdollisimman korkealla pitoisuudella – negatiivisiin nenänielunäytepuikkonäytteisiin, joihin oli lisätty 2,87 x LoD inaktivoituja SARS-CoV-2-partikkeleita (Zeptomatrix). NATrol™-paneelit ja SARS-CoV-1 lisättiin suoraan yhdessä inaktivoitujen SARS-CoV-2-viruspartikkelien (Zeptomatrix) kanssa pitoisuudella 2,87 x LoD. Alla on yhteenveto kaikista testatuista mikro-organismiyhdistelmistä ja niiden pitoisuuksista.

Taulukko 15. Luettelo mikrobialisen häiriön tutkimuksessa in vitro -testatuista patogeeneistä.

Yhdistelmän tunnus / näydetunnus	Mikro-organismi	Lähde	Lopullinen pitoisuus	Yksikkö	Tulos
Yhdistelmä 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Ihmisen koronavirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID ₅₀ /ml	
	Ihmisen koronavirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID ₅₀ /ml	
	Ihmisen koronavirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID ₅₀ /ml	
	Adenovirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID ₅₀ /ml	
	Parainfluensavirus 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID ₅₀ /ml	
Yhdistelmä 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Adenovirus T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID ₅₀ /ml	
	Parainfluensavirus 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID ₅₀ /ml	
	Influenssa B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID ₅₀ /ml	
	Rinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID ₅₀ /ml	

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 15 (jatkuu edelliseltä sivulta)

Yhdistelmän tunnus / näytetunnus	Mikro-organismi	Lähde	Lopullinen pitoisuus	Yksikkö	Tulos
Yhdistelmä 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Parainfluensavirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3,30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4,60E+06	CFU/ml	
Yhdistelmä 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Adenovirus T7A	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1,02E+06	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1,00E+08	CFU/ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
Yhdistelmä 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Respiratorinen syntyiaalivirus RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenssa A H1N1 Kalifornia	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterovirus, tyyppi 68 pääryhmä	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
Adenovirus T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml		
Yhdistelmä 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	MERS-koronavirus	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Adenovirus T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ihmissen metapneumovirus (hMPV) B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Respiratorinen syntyiaalivirus tyyppi B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 15 (jatkuu edelliseltä sivulta)

Yhdistelmän tunnus / näytetunnus	Mikro-organismi	Lähde	Lopullinen pitoisuus	Yksikkö	Tulos
Yhdistelmä 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHII)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Parainfluenssavirus 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenssa A H3N2 Sveitsi/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Yhdistelmä 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	NATrol-paneeli RP1 (influenssa A H3N2 (Brisbane/10/07), influenssa A H1N1 (NY/02/2009), rinovirus (tyyppi 1A), adenovirus T3, parainfluenssa T1, parainfluenssavirus T4, metapneumovirus (Peru 6-2003), <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), coxsackievirus (tyyppi A1))	Zeptomatrix (MDZ001)	Tuntematon*	–	
Yhdistelmä 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	NATrol-paneeli RP2 (influenssa A H1 (Uusi-Kaledonia/20/99), influenssa B (Florida/02/06), RSV-A, parainfluenssa T2, parainfluenssa T3, HKU-rekombinantti koronavirus, koronaviruset (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639))	Zeptomatrix (MDZ001)	Tuntematon*	–	
Yhdistelmä 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Tuntematon*	–	

* Toimittaja ei ilmoittanut pitoisuutta.

Häiritsevät aineet

Luultujen häiritsevien aineiden (taulukossa 16 mainitut aineet) vaikutus *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskykyyn arvioitiin. Testit suoritettiin 3 yhdistelmässä negatiivisia nenänielunäytepuikkonäytteitä ja 3 yhdistelmässä positiivisia nenänielunäytepuikkonäytteitä, joihin oli lisätty 4 x LoD inaktivoituja SARS-CoV-2-viruspartikkeleita (Zeptomatrix). Tutkimuksissa käytettiin RGQ MDx 5plex HRM -alustaa (4 eri laitetta), joita käytti 1 käyttäjä 1 pilottisarjan avulla.

Jokainen yhdistelmä jaettiin kahtia ja näillä osilla testattiin joko liuottimeen (testinäyte) liuenneita häiritseviä aineita tai pelkästään liuotinta (kontrollinäyte). Vihreän ja punaisen fluoresenssikanavan osumatarkkuutta verrattiin testien välillä sekä vastaaviin kontrollinäytteisiin. Jos häiriötä ei ollut, testin ja sitä vastaavan kontrollinäytteen osumatarkkuus on sama.

Taulukossa 16 näkyy, että mikään testatuista aineista ei aiheuttanut häiriötä *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskykyyn vihreässä fluoresenssikanavassa.

Taulukko 16. Luettelo häiritsevistä aineista.

Häiritsevät aineet	Toiminto	Testattu pitoisuus	Tulokset negatiivisissa nenänielunäytepuikkonäytteissä	Tulokset positiivisissa (4 x LoD) nenänielunäytepuikkonäytteissä
Tobramysiini	Systeeminen antibiootti	1 mg/ml	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 0/15
Mupirosiini	Nenän kautta annettava antibioottinen voide	6,6 mg/ml	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 0/15
Flutikasoni	Nenän kautta annettavat kortikosteroidit	5 % (v/v)	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 0/15
Mentoli (imeskeltävä)	Suun kautta annettavat puuduttavat ja analgeettiset aineet	0,5 mg/ml	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 0/15

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 16. (jatkuu edelliseltä sivulta)

Häiritsevät aineet	Toiminto	Testattu pitoisuus	Tulokset negatiivisissa nenänielunäytepuikkonäytteissä	Tulokset positiivisissa (4 x LoD) nenänielunäytepuikkonäytteissä
Oksimetatsoliini	Nenäsuihke	10 % (v/v)	Ei häiriötä (0/15)	Ei häiriötä (0/15)
Oseltamiviiri	Viruslääke	3,3 mg/ml	Ei häiriötä (0/15)	Ei häiriötä (0/15)
Musiini (naudan leuanalussylikirauhanen tyyppi I-S)		2,5 mg/ml	Ei häiriötä (0/15)	Ei häiriötä (0/15)
Kokoveri		4 % (v/v)	Ei häiriötä (1/15*)	Ei häiriötä (0/15)

* Artefaktia vastaava monistuminen havaittiin.

Tarkkuus

Tarkkuustutkimuksessa arvioitiin uusittavuutta (sama näyte toistettiin eri ajoissa ja olosuhteissa: 5 päivänä, 3 eri erän sarjoilla, 3 käyttäjän toimesta ja 2 laitteella) ja toistettavuutta (sama näyte toistettiin samassa ajossa ja samoissa olosuhteissa). Testit tehtiin negatiivisille nenänielunäytteille ja nenänielunäytteille, joihin oli lisätty 5 x LoD, ja ajot tehtiin RGQ MDx -laitteella.

Jokaisesta laimennuspitoisuudesta kerättiin 204 tietopistettä. Toistettavuus- ja uusittavuustietoja käytettiin keskihajonnan (Standard Deviation, SD) sekä variaatiokertoimen (Coefficient of Variation, %CV) määrittämiseen SARS-CoV-2-kohteille vihreässä, keltaisessa ja punaisessa kanavassa. Taulukko 17 osoittaa, että *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan yleinen tarkkuus on 0,63 SD (2,03 %CV) vihreässä kanavassa, 0,54 SD (2,22 %CV) keltaisessa kanavassa ja 1,28 SD (4,10 %CV) punaisessa kanavassa.

Taulukko 17. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan keskihajonta ja variaatiokerroin

Näytteet ja havainnointikanava	Yhteensä	Päivien välillä	Erien välillä	Käyttäjien välillä	Laitteiden välillä	Ajojen välillä	Ajon sisällä
Keskihajonta (Standard Deviation, SD) (Variaatiokerroin [Coefficient of Variation, %CV])							
Negatiivinen NPS Yellow-kanava	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
Negatiivinen NPS Red-kanava	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
Lisätty NPS Green-kanava	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
Lisätty NPS Yellow-kanava	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
Lisätty NPS Red-kanava	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

Kliininen suorituskyky

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp -määrityksen kliininen suorituskyky arvioitiin käyttämällä kuljetusaineeseen säilöttyjä, puikolla otettuja retrospektiivisiä nenänielunäytteitä, joihin kuului

- 98 SARS-CoV-2:n RNA-negatiivista näytettä
- 52 SARS-CoV-2:n RNA-positiivista näytettä

Kaikki näytteet kerättiin potilailta, joilla oli COVID-19-infektion merkkejä ja oireita. Näytteitä säilytettiin jäädytettynä käyttöön asti.

Kliininen kelpoisuus testattiin ABI 7500 Fast Dx -laitteella. Taulukko 18 esittää tiedot *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskyvystä verrattuna vertailumenetelmään, mikä on ilmoitettu positiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Positive Percent Agreement, PPA) ja negatiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Negative Percent Agreement, NPA).

Taulukko 18. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky verrattuna vertailumenetelmään

Näytetyyppi	N	Positiivisten prosentiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosentiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	5,1 (5/98)	
Negatiivinen	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7–97,8

Ristiriitaiset tulokset arvioitiin kolmannella menetelmällä ja analysoitiin uudelleen yhtäpitävyystaulukon avulla. Yleiset kliinisen suorituskyvyn tulokset on ilmoitettu positiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Positive Percent Agreement, PPA) ja negatiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Negative Percent Agreement, NPA), ja ne ovat nähtävissä taulukossa 19.

Taulukko 19. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky

Näytetyyppi	N	Positiivisten prosentiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosentiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	5,1 (5/98)	
Negatiivinen	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7–97,8

Alla on lueteltu näyteosuuksien positiiviset ja negatiiviset prosentuaaliset yhtäpitävyydet (Positive Percent Agreement, PPA, ja Negative Percent Agreement, NPA) sekä odotetut näytteiden tilat:

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

(Positive Percent Agreement, PPA%): $51/52 = 98,1\%$ (95 %:n CI: 89,9–99,7 %)

Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

(Negative Percent Agreement, NPA%): $93/98 = 94,9\%$ (95 %:n CI: 88,6–97,8 %)

Kliininen suorituskyky, mukaan lukien oireettomat henkilöt

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp -määrityksen kliininen suorituskyky arvioitiin käyttämällä kuljetusaineeseen säilöttyjä, puikolla otettuja retrospektiivisiä nenänielunäytteitä, joihin kuului

- 100 SARS-CoV-2:n RNA-negatiivista näytettä
- 53 SARS-CoV-2:n RNA-positiivista näytettä

Kaikki näytteet kerättiin potilailta, joilla ei ollut COVID-19-infektion oireita tai muita syitä epäillä tartuntaa.

Kliininen kelpoisuus testattiin ABI 7500 Fast Dx -laitteella. 16 näytettä jätettiin analyysin ulkopuolelle *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan testauksen jälkeen, sillä niiden tila oli kelvoton näytteen kelvollisuuskriteerien mukaan (Taulukko 13).

Taulukossa 20 on tiedot *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskyvystä verrattuna vertailumenetelmään, mikä on ilmaistu positiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Positive Percent Agreement, PPA) ja negatiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Negative Percent Agreement, NPA).

Taulukko 20. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky verrattuna vertailumenetelmään

Näytetyyppi	N	Positiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	1,15 (1/87)	–
Negatiivinen	87	36,0 (18/50)	–	98,85 (86/87)	93,8–99,8

19 ristiriitaista tulosta arvioitiin kolmannella menetelmällä ja analysoitiin uudelleen yhtäpitävyystaulukon avulla. Yleiset kliinisen suorituskyvyn tulokset on ilmoitettu positiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Positive Percent Agreement, PPA) ja negatiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Negative Percent Agreement, NPA), ja ne ovat nähtävissä Taulukossa 21.

Taulukko 21. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky

Näytetyyppi	N	Positiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0,95 (1/105)	-
Negatiivinen	105	-	-	99,05 (104/105)	94,8–99,8

18 virheellistä negatiivista näytettä luokiteltiin uudelleen oikeiksi negatiivisiksi, ja yksi virheellinen positiivinen pysyi virheellisenä positiivisena.

Alla on lueteltu näyteosuuksien positiiviset ja negatiiviset prosentuaaliset yhtäpitävyydet (Positive Percent Agreement, PPA, ja Negative Percent Agreement, NPA) sekä odotetut näytteiden tilat:

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

(Positive Percent Agreement, PPA): $32/32 = 100,0\%$ (95 %:n CI: 89,3 %–100,0 %)

Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

(Negative Percent Agreement, NPA): $104/105 = 99,05\%$ (95 %:n CI: 94,8 %–99,8 %)

Lähdeviitteet

1. CUI J *et al.* (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **17**, 181-192
2. Gagneur *et al.* (2002) Infections nosocomiales à coronavirus humains chez le nouveau-né. *Arch Pédiatr* **9**, 61-69
3. HU *et al.* (2020) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **6**:1-14.
4. Mackay IM. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol. Infect* **10**(3), 190–212
5. European Commission. (2020) Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria. 16 April 2020. <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/40805/attachments/1/translations/en/renditions/native>

Vianmääritysopas

Tämä vianmääritysopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustostamme usein kysytyjen kysymysten (Frequently Asked Questions, FAQ) osiosta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Positiivisen kontrollin (Positive Control, PC) Green-signaali (FAM) on heikko tai sitä ei ole

- | | |
|---|---|
| a) RT-PCR-tietojen analysointia varten valittu fluoresenssikanava ei ole yhdenmukainen protokollan kanssa. | Valitse tietojen analysointia varten fluoresenssikanava FAM (vihreä) RT-PCR-analyysin SARS-CoV-2-kohteille, fluoresenssikanava HEX/VIC/JOE (keltainen) näytteen kontrollille ja Cy5/Atto (punainen) sisäiselle kontrollille. |
| b) Lämpötilaprofiilin virheellinen ohjelmointi. | Vertaa RT-PCR-ohjelmaa protokollaan. |
| c) PCR-reaktio on konfiguroitu väärin. | Vertaa työskentelyvaiheitasi pipetointijärjestykseen ja toista PCR tarvittaessa. |
| d) Tarvikesarjan yhden tai useamman komponentin säilytysolosuhteet eivät vastanneet ohjeita tai <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit -sarjan viimeinen käyttöpäivä on mennyt. | Noudata säilytysohjeita ja tarkista reagenssien viimeinen käyttöpäivä. Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |
| e) qPCR-alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa. | Käytä tässä oppaassa suositeltua, käyttämäsi qPCR-alustaa koskevaa konfiguraatiota. |
| f) PCR inhiboitui. | Vältä kontaminaatio noudattamalla hyviä molekyylibiologian laboratorioita koskevia käytäntöjä.
Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. Noudata tässä oppaassa esitettyä protokollaa. Tarkista reagenssin viimeinen käyttöpäivä ja käytä tarvittaessa uutta sarjaa. Toista määrittäminen toisella näytteellä. |

Vihreä signaali (FAM) mallittomassa kontrollissa tai eristämättömyyskontrollissa

SARS-CoV-2-sekvenssit ovat kontaminoituneet RT-PCR-levyn valmistelun aikana.

Toista RT-PCR uusilla reagensseilla.

Vältä kontaminaatio noudattamalla hyviä molekyylibiologian laboratorioita koskevia käytäntöjä. Noudata tässä käsikirjassa esitettyä protokollaa.

Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Sisäisen kontrollin punainen signaali (Cy5/Atto) on heikko tai sitä ei ole
















- a) RT-PCR-reaktioon on päässyt häiritsevä aine. PCR on inhiboitu. Vältä kontaminaatio noudattamalla hyviä molekyylibiologian laboratorioita koskevia käytäntöjä. Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. Noudata tässä oppaassa esitettyä protokollaa. Toista koe uudella vasta kerätyllä näytteellä.
- b) Sisäinen kontrolli on heikentynyt. Vältä RNAasiin pääsy noudattamalla hyviä molekyylibiologian laboratorioita koskevia käytäntöjä. Noudata tässä oppaassa annettuja suosituksia. Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. Noudata säilytysohjeita ja tarkista reagenssien viimeinen käyttöpäivä. Käytä tarvittaessa uutta sarjaa.
- c) qPCR-alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa. Käytä tässä oppaassa suositeltua, käyttämäsi qPCR-alustaa koskevaa konfiguraatiota.

Näytteen kontrollin keltainen signaali (VIC/HEX) on heikko tai sitä ei ole

- a) Kliininen näyte on heikentynyt. Noudata näytteenottolaitteen toimittajan antamia suosituksia säilytyksestä, käsittelystä ja kuljetuksesta. Noudata tässä oppaassa esitettyä protokollaa, mukaan lukien näytteen valmisteluvaiheet SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurilla. Noudata säilytysohjeita ja tarkista reagenssien, kuten SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, viimeinen käyttöpäivä. Käytä tarvittaessa uutta sarjaa.
- b) Näyte on otettu väärin. Näytepuikkoon ei ole saatu tai kuljetusaineeseen ei ole siirretty riittävästi soluja. Noudata näytteenottolaitteen toimittajan antamia suosituksia näytteenotosta ja näytteiden käsittelystä.
- c) qPCR-alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa. Käytä tässä oppaassa esitettyä, käyttämäsi qPCR-alustaa koskevaa konfiguraatiota.

Symbolit

Käyttöohjeessa tai pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Selitys
	Sisältää reagensseja, jotka riittävät 768 tai 3072 reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaite
	Tuotenumero
	Eränumero
	Komponentit
	Sisältö
	Numero
	GTIN-numero
	R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota ja n on versio numero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Katso käyttöohjeet
	Säilytettävä auringonvalolta suojattuna
	Varoitus/huomio

Yhteystiedot

Teknistä tukea ja lisätietoja saa ottamalla yhteyttä QIAGENin tekniseen palveluun osoitteessa **support.qiagen.com**.

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	768 reaktioon: valmistelupuskuri, ROX-väri, pääseos, alukkeet ja koettimet, sisäinen kontrolli, vesi (NTC) ja positiivinen kontrolli	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	3072 reaktioon: valmistelupuskuri, ROX-väri, pääseos, alukkeet ja koettimet, sisäinen kontrolli, vesi (NTC) ja positiivinen kontrolli	4511469
Laitteet ja lisätarvikkeet		
0,1 ml:n PCR-putket Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx -laitteelle	Käytettäväksi 72 kuoppaisessa roottorissa, Strip tubes and caps	981103
Rotor-Gene Q -ohjelmisto	Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3.1 (tai uudempi)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Real-time PCR -laite, jossa 5 kanavaa, HRM-analysaattori, ohjelmisto, kannettava tietokone ja lisätarvikkeet; 1 vuoden takuu osien rikkoutumisen ja asennus- ja valmistusvirheiden varalta	9002032
Loading Block	72 x 0,1 ml:n putkea	9018901

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteessa www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

Versio	Kuvaus
R1, huhtikuu 2021	Ensimmäinen versio.
R2, heinäkuu 2021	Ilmoituksen jatko: Testi on tehty oireettomille henkilöille. Käyttötarkoitus päivitettiin sisältämään henkilöt, joilla ei ollut oireita tai muita syitä epäillä COVID-19-infektiota. Kohta Kliininen suorituskyky, mukaan lukien oireettomat henkilöt lisättiin Suorituskyky tietoihin. Poistettiin väite ”Tämän testin toimivuutta potilailla, joilla ei ole hengitystieinfektion merkkejä tai oireita, ei ole määritetty” kohdasta Rajoitukset. Vähäisiä editointi- ja muotoilumuutoksia.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan rajoitettu käyttöoikeussopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

- Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä immateriaalioikeuksien lisäisiä tarkoituksia käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laotimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
- Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
- Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
- QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
- Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN saattaa vedota tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kieltoihin tuomioistuimessa. QIAGEN perii kaikki tutkinta- ja oikeuskulut asianajajan palkkiot mukaan lukien, jotka aiheutuvat tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sen henkistä omaisuutta koskevien oikeuksien toimeenpanemisesta paneelin ja/tai sen osien osalta.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zepmetrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Excel® (Microsoft Corporation); ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific tai sen tytäryhtiöt). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com