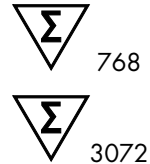


Juli 2021

Gebruiksaanwijzing (handleiding) *artus*[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



Versie 1



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik in Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM- en ABI[®] 7500 Fast Dx-instrumenten



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

R2

Inhoud

Beoogd gebruik.....	4
Beschrijving en principe	5
Informatie met betrekking tot het pathogeen.....	5
Samenvatting en uitleg	6
Meegeleverde materialen	9
Inhoud van de kit.....	9
Componenten van de kit	10
Platformen en software.....	11
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	12
Verbruiksartikelen	12
Uitrusting.....	12
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	13
Veiligheidsinformatie	13
Voorzorgsmaatregelen.....	14
Opslag en verwerking van reagentia	15
Transporteren, bewaren en hanteren van specimen	15
Afname, transport en opslag van specimen	15
Protocol: monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in de RGQ MDx 5plex HRM.....	16
Protocol: monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in ABI 7500 Fast Dx.....	22
Resultaten	27
Interpretatie van de resultaten	29
Beperkingen.....	31

Prestaties	32
Analytische gevoeligheid (detectielimiet)	32
Onderzoeken naar analytische specificiteit (Inclusiviteit en exclusiviteit/kruisreactiviteit).....	32
Interfererende stoffen	38
Precisie	40
Klinische prestaties	41
Referenties	44
Probleemoplossingsgids.....	45
Symbolen	47
Contactgegevens.....	48
Bestelgegevens.....	49
Revisiegeschiedenis van document.....	50

Beoogd gebruik

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is een real-time RT-PCR-test voor de kwalitatieve detectie van nucleïnezuur van SARS-CoV-2 in nasofaryngeale uitstrijkjes (Nasopharyngeal Swab, NPS), nasale en orofaryngeale uitstrijkjes bij personen zonder symptomen of andere redenen om COVID-19 infectie te vermoeden.

Ze is bestemd als hulpmiddel bij de diagnose van COVID-19 in de acute fase van infectie in combinatie met klinische observaties, voorgeschiedenis van de patiënt en epidemiologische informatie.

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit moet worden gebruikt in een laboratoriumomgeving van moleculaire biologie door professionele gebruikers, zoals getraind klinisch laboratoriumpersoneel dat specifieke instructies heeft gekregen over de technieken van real-time PCR en *in-vitro*diagnostische procedures.

Negatieve resultaten sluiten infectie met SARS-CoV-2 niet uit en mogen niet worden gebruikt als enige onderbouwing voor behandeling van de patiënt.

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is bestemd voor gebruik met het Rotor-Gene Q (RGQ) MDx System of de ABI 7500 Fast Dx als real-time PCR-systemen.

Beschrijving en principe

Informatie met betrekking tot het pathogeen

Coronavirussen, een onderfamilie van de *Coronaviridae*, zijn grote omhulde virussen met positief enkelstrengig RNA die zeer virulente reacties veroorzaken bij mensen en huisdieren (1). Het is aangetoond dat coronavirussen verantwoordelijk zijn voor een derde van de infecties van een gewone verkoudheid en ze zijn ook een bekende oorzaak van nosocomiale infecties van de bovenste luchtwegen bij premature baby's (2).

Een nieuw lid van de familie van coronavirussen leidde tot een uitbraak van een luchtweginfectie in de Chinese stad Wuhan (1, 3). SARS-CoV-2 werd eerst nieuw coronavirus genoemd (2019-nCoV) en verschilt van SARS-CoV (1, 3), verantwoordelijk voor de uitbraak in 2003, en van MERS-CoV, dat sinds 2012 circuleerde in het Midden-Oosten. SARS-CoV-2 is de ziekteverwekker van COVID-19. Het RNA van SARS-CoV-2 kan worden gedetecteerd tijdens de vroege en acute fasen van de infectie in diverse specimen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes) van de bovenste luchtwegen (3).

In combinatie met de voorgeschiedenis van de patiënt en de epidemiologie van SARS-CoV-2 zijn RT-PCR-assays de gouden standaard geworden voor de diagnose van SARS-CoV-2. Het Europees Centrum voor ziektepreventie en -bestrijding (European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC) heeft voorgesteld om assays op basis van RT-PCR te combineren met immunoassays om de infectiestatus te controleren en de doeltreffendheid te evalueren van beperkende maatregelen die zijn getroffen om de uitbraak te beheersen (4, 5).

De SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-assay richt zich op 2 virale genen (N1 en N2) die worden gedetecteerd met hetzelfde fluorescentiekanaal. De twee gendoelen worden niet onderscheiden en de amplificatie van één of beide doelen leidt tot een fluorescentiesignaal. Positieve resultaten wijzen op de aanwezigheid van het SARS-CoV-2-virus, maar sluiten een gelijktijdige infectie met andere pathogenen niet uit. Aan de andere kant sluiten negatieve RT-PCR-resultaten een mogelijke infectie niet uit.

Samenvatting en uitleg

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is een gebruiksklaar systeem met een eenvoudige stap van monsterbereiding, gevolgd door de detectie van SARS-CoV-2-RNA met behulp van RT-PCR in het RGQ MDx-systeem of ABI 7500 Fast Dx-platformen (afbeelding 1). De SARS-CoV-2 UM Amp Buffer bevat reagentia en enzymen voor de specifieke amplificatie van een gebied met 72 basenparen (bp) en een gebied met 67 basenparen (bp) van het RNA-genoom van SARS-CoV-2 en voor hun rechtstreekse detectie in het fluorescentiekanaal 'Green' van de RGQ MDx-instrumenten en met het fluorescentiefilter A/1 van de ABI 7500 Fast Dx.

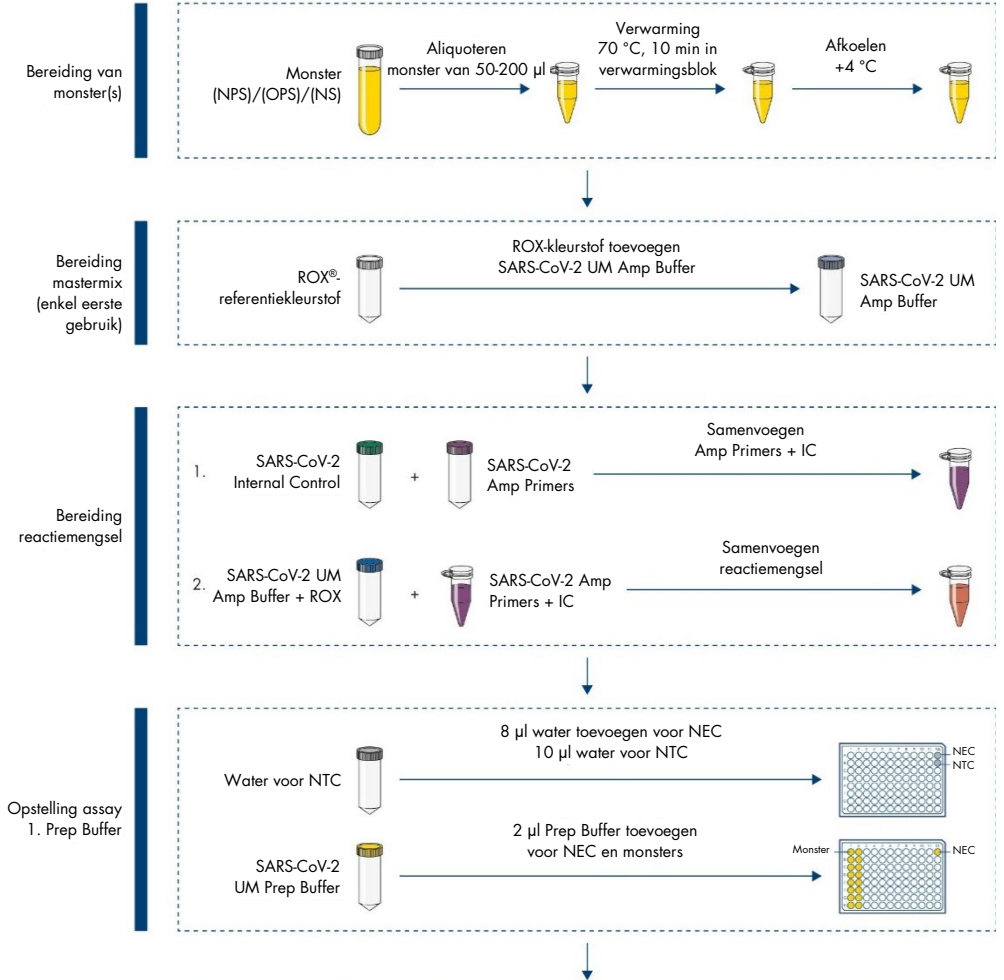
Het mengsel van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, bestaande uit primers en probes, bevat tevens de oligonucleotiden die nodig zijn voor de RNase P-amplificaties. Bij detectie in het fluorescentiekanaal 'Yellow' van het RGQ MDx-instrument of met het fluorescentiefilter B/2 van de ABI 7500 Fast Dx, zorgen deze amplicons ervoor dat voldoende biologisch monster is verzameld op het uitstrijkje. Deze controle is cruciaal om de aanwezigheid van biologische monsters in SARS-CoV-2-negatieve monsters te waarborgen. Een amplificatie moet altijd detecteerbaar zijn; anders bestaat er twijfel over de kwaliteit van het monster.

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit bevat ook een derde heteroloog amplificatiesysteem om mogelijke RT-PCR-remming aan het licht te brengen. Dit wordt gedetecteerd als een interne RNA-controle (Internal Control; IC) in het fluorescentiekanaal 'Red' van de RGQ MDx-instrumenten en met het fluorescentiefilter E/5 van de ABI 7500 Fast Dx. Omdat de IC is opgenomen in de SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, moet de amplificatie constant zijn tenzij RT-PCR aanwezig is in het monster of in de RT-PCR-reactie, hetgeen de amplificatie vertraagt of voorkomt.

Externe positieve en negatieve controles (SARS-CoV-2 Positive Control en nucleasevrij water dat wordt gebruikt als NTC, respectievelijk) zijn inbegrepen in de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit om de prestatie van de PCR-stap te bevestigen. Een controle zonder extractie (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer gebruikt als NEC) wordt sterk aanbevolen om de afwezigheid van RT-PCR-remmers in de bereidingsbuffer te verifiëren.

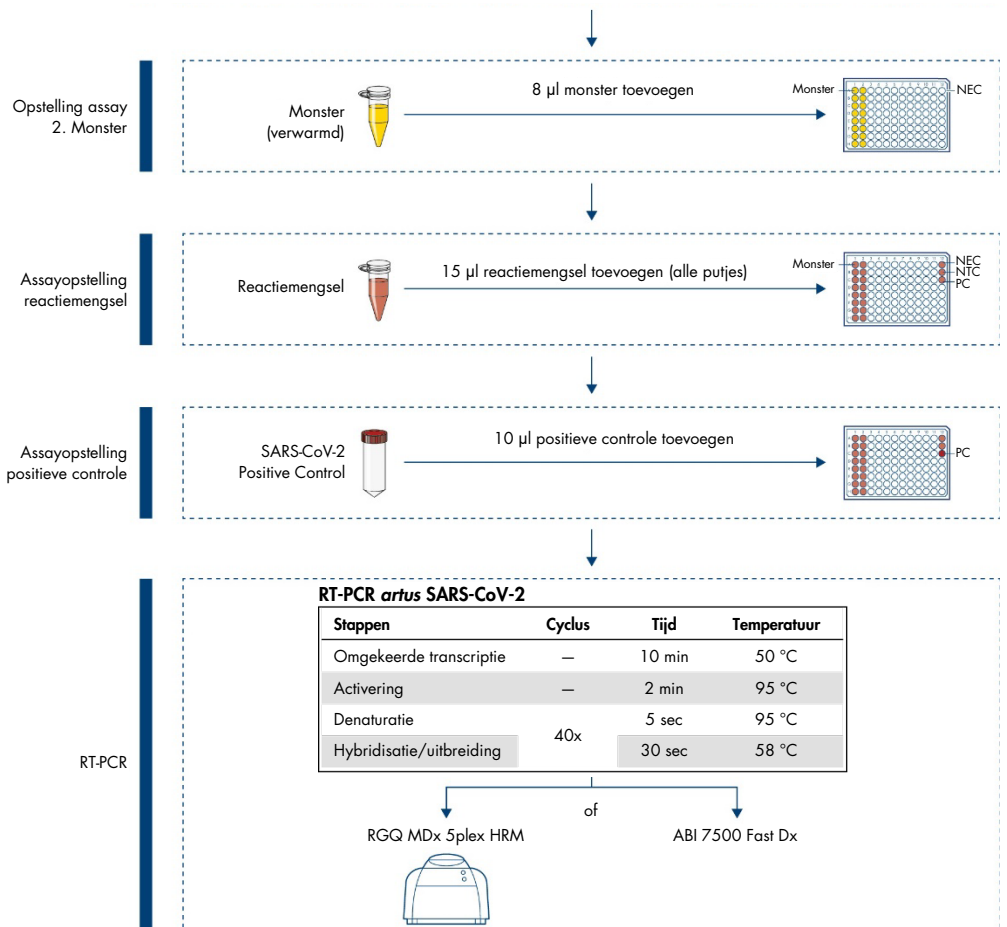
Deze controles monitoren samen de efficiëntie van de omgekeerde transcriptie- en de PCR-stappen.

Workflow *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



(Vervolgd op de volgende pagina)

(Vervolg tabel van vorige pagina)



Afbeelding 1 Workflow artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit					
Catalogusnr.				4511460	4511469
Aantal reacties				768	3072
Buiskleur	Dekselkleur	Identiteit	ID op buis	Volume (µl)	Volume (µl)
Transparant	Geel	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	Preparation Buffer (Bereidingsbuffer)	2 x 930	8 x 930
Transparant	Blauw	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	Master Mix	4 x 1440	16 x 1440
Transparant	Paars	SARS-CoV-2 Amp Primers	Primers and Probes (Primers en probes)	4 x 1680	16 x 1680
Transparant	Groen	SARS-CoV-2 Internal Control	Internal Control (Interne controle) (IC)	1 x 1390	4 x 1390
Transparant	Rood	SARS-CoV-2 Positive Control	Positive Control (Positieve controle)	1 x 220	4 x 220
Transparant	Transparant	Water for NTC (Water voor NTC)	Water (NTC)	1 x 1900	4 x 1900
Transparant	Transparant	ROX Reference Dye (ROX-referentiekleurstof)	ROX Dye (ROX-kleurstof)	1 x 210	4 x 210

Componenten van de kit

Reagentia

In elke buis zijn de reagensvolumes geoptimaliseerd voor 8 batches van 96 monsters (voor de kit met 768 reacties) of 32 batches van 96 reacties (voor de kit met 3072 reacties), met inbegrip van een positieve controle (PC), een controle zonder template (No Template Control; NTC) en een controle zonder extractie (No Extraction Control; NEC).

Minder of meer monsters kunnen verwerkt worden, maar dit houdt een suboptimaal gebruik van reagentia in. Het wordt aanbevolen om meerdere cycli van bevroren-ontdooien te vermijden. Reagentia kunnen in aliquots worden verdeeld om opeenvolgende cycli van bevroren-ontdooien te vermijden.

Primers en probes

Primers en probes die zich op de SARS-CoV-2-sequenties richten, zijn gebaseerd op de primers en probes die door Amerikaanse Centra voor ziektebestrijding en -preventie (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) zijn ontwikkeld.

Controles en kalibrators

De assay bevat 5 controles om de efficiëntie van RT-PCR te monitoren.

Interne controle (IC): de interne controle is een enkelstrengs IVT-RNA dat de aanwezigheid nagaat van verontreinigingen die de omgekeerde transcriptie kunnen remmen. De interne controle monitort ook de efficiëntie van omgekeerde transcriptie in de controle zonder template (No Template Control; NTC) en de controle zonder extractie (No Extraction Control; NEC).

Controle zonder template (No Template Control; NTC): de controle zonder template bestaat uit nucleasevrij water. Ze wordt toegevoegd aan de PCR-plaat om de introductie van verontreinigingen na te gaan tijdens de voorbereiding van de PCR-plaat, hetgeen kan leiden tot een verkeerde interpretatie van SARS-CoV-2-doelen.

Positieve controle (PC): De positieve controle is een dubbelstrengs DNA geamplificeerd met de primers en probes van SARS-CoV-2 (P&P-mengsel). Haar detectie verifieert de efficiëntie van het gebruikte reagens in de PCR-amplificatiestap.

Stap zonder extractie (No Extraction Control; NEC): de controle zonder extractie bestaat uit de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Ze wordt parallel met de klinische monsters verwerkt om de introductie van verontreinigingen na te gaan tijdens de monsterbereiding, hetgeen kan leiden tot een verkeerde interpretatie van SARS-CoV-2-doelen.

Bemonsteringscontrole: deze bemonsteringscontrole detecteert het RNAse P-gen en is cruciaal om de aanwezigheid van biologische monsters in SARS-CoV-2-negatieve monsters te waarborgen. Amplificatie van de bemonsteringscontrole moet altijd detecteerbaar zijn; anders bestaat er twijfel over de kwaliteit van het monster.

Platformen en software

Verzeker u er voor gebruik van dat de apparaten zijn onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant. Deze kit kan worden gebruikt in twee workflows, waarvoor de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- of de ABI 7500 Fast Dx-instrumenten en hun software nodig zijn:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Rotor-Gene Q-software versie 2.3.1 of hoger
- ABI 7500 Fast Dx: SDS-software versie 1.4.1 of hoger

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Verbruiksartikelen

- Poedervrije wegwerphandschoenen
- Steriele en nucleasevrije pipetpunten met filters
- PCR-vrije buisjes van 1,5 ml of 2 ml
- PCR-buisjes van 0,1 ml voor gebruik met de Rotor-Gene® Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, cat.nr. 981103)
- 96-Well MicroAmp™ voor gebruik met het ABI 7500 Fast Dx qPCR-platform (Applied Biosystems 96-well plate, cat.nr. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive Film voor gebruik met het ABI 7500 Fast Dx qPCR-platform (Applied Biosystems, cat.nr. 4360954)

Uitrusting*

- Tafelcentrifuge met rotor voor reageerbuisjes van 2 ml
- Pipetten (afstelbaar)
- Vortexmixer
- Verwarmingsblok
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (cat.nr. 9002032) met Rotor-Gene Q-software versie 2.3.1 of hoger
- Rotor-Disc 72 Rotor (cat.nr. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (cat.nr. 9018900)
- Laadblok met 72 putjes (QIAGEN Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, cat.nr. 9018901)
- Alternatief: ABI 7500 Fast Dx qPCR-platform (Thermo Fisher Scientific®, cat.nr. 4406985) met software versie 1.4.1 of hoger en een centrifuge voor plaat met 96 putjes

* Verzeker u er voor gebruik en wanneer nodig van dat de apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Onthoud dat u volgens de plaatselijke voorschriften verplicht kunt zijn om ernstige incidenten die hebben plaatsgevonden in verband met gebruik van het hulpmiddel te melden bij de fabrikant en de regelgevende instantie van de locatie waar de gebruiker en/of de patiënt zich bevindt.

Veiligheidsinformatie

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB). Ze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier kunt u de VIB van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN vinden, bekijken en afdrukken.

Draag altijd geschikte persoonlijke beschermingsmiddelen, waaronder, maar niet beperkt tot, poedervrije wegwerphandschoenen, een labjas en oogbescherming. Bescherm de huid, ogen en slijmvliezen. Trek bij het werken met monsters regelmatig nieuwe handschoenen aan.

Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk. Neem altijd de veiligheidsmaatregelen in acht die in de betreffende richtlijnen staan, zoals goedgekeurde richtlijn M29 betreffende *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* van het Amerikaanse Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI), of andere relevante documenten.

Specimens en monsters kunnen besmettelijk zijn. Gooi afval van het monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.

Voorzorgsmaatregelen

- Volg standaard laboratoriumwerkwijzen om de werkomgeving schoon en vrij van contaminatie te houden. Houd een ruimte vrij met specifieke apparatuur voor de behandeling van RNA.
- Volg de goede laboratoriumpraktijken (Good Laboratory Practices, GLP) om kruisbesmetting tot een minimum te beperken.
- Let erop dat u verontreiniging met RNAse tijdens het experiment vermijdt en gebruik kunststof artikelen zonder RNAse.
- Zorg voor een gedocumenteerde traceerbaarheid, met name voor de identificatie van de monsters.

Opslag en verwerking van reagentia

Er moet worden gelet op de uiterste gebruiksdata en opslagomstandigheden die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld. Gebruik geen componenten na de uiterste gebruiksdatum of die op de verkeerde manier zijn bewaard.

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit kan gedurende 6 maanden worden bewaard tussen -30 °C en -15 °C of tot de uiterste gebruiksdatum is verstreken.

Transporteren, bewaren en hanteren van specimens

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is bestemd voor gebruik met nasofaryngeale, nasale en orofaryngeale uitstrijkjes. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.

De Amerikaanse Centra voor ziektebestrijding en -preventie (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) en de Engelse volksgezondheid (Public Health England; PHE) hebben richtlijnen verstrekt voor het verzamelen, behandelen en testen van klinische specimens. Raadpleeg deze richtlijnen of andere relevante referentieprotocollen van nationale laboratoria voor aanvullende informatie.

Afname, transport en opslag van specimens

Raadpleeg de aanbevelingen van de leverancier voor het verzamelen, opslaan en transporteren van uitstrijkjes. Uitstrijkjes moeten volledig zijn ondergedompeld in transportmedia om de integriteit van specimens te garanderen.

Protocol: monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in de RGQ MDx 5plex HRM

Dit protocol beschrijft de bereiding van monsters en RT-PCR om SARS-CoV-2-doelen in menselijke nasale, nasofaryngeale of orofaryngeale uitstrijkjes die zijn bewaard in transportmedia te detecteren in de RGQ MDx 5plex HRM.

Wat u moet weten voor u begint

- Verifieer dat de uiterste gebruiksdatums en opslagvoorwaarden die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld, worden nageleefd. Gebruik geen componenten na de uiterste gebruiksdatum of die op de verkeerde manier zijn bewaard.
- Gebruik goed onderhouden en gekalibreerde apparatuur.
- Let erop dat u verontreiniging met RNAsen tijdens het experiment vermijdt en gebruik kunststof artikelen zonder nuclease.

Wat u moet doen voor u begint

- Monsters kunnen op kamertemperatuur worden bewaard tijdens de bereiding en de opstelling van de reactie; het wordt echter aanbevolen om ze op ijs of bij 4 °C in een koelrek te bewaren.
- Laat de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, water voor NTC en SARS-CoV-2 Positive Control voor gebruik volledig ontdooien op kamertemperatuur (15–25 °C). Houd de buisjes op kamertemperatuur en beschermd tegen licht tot het gebruik.
- Homogeniseer de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer voorafgaand aan gebruik door ze 2-3 maal om te keren (niet vortexen) en daarna even snel te draaien. Alle andere individuele reagentia kunnen gehomogeniseerd worden door middel van puls-vortexen gedurende 3-5 seconden of door ze 2-3 maal om te keren en daarna even snel te draaien.

- De SARS-CoV-2 UM Prep Buffer remt RNAsen in de klinische monsters voor de detectiestap, maar is geen oplossing die virussen inactieveert. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.
- Verifieer dat de cyclusvoorwaarden van het qPCR-platform overeenkomen met de specificaties in dit protocol.
- Reagentia kunnen in aliquots worden verdeeld om opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien te vermijden.
- Bereid het verse reactiemengsel (<2 u voor de start van de RT-PCR-plaat).
- Om de verontreiniging te beperken, moeten de bereidingen van het monster en de RT-PCR in gescheiden zones plaatsvinden.

Procedure

1. Monsterbereiding

- 1a. Vortex het uitstrijkje met het monster krachtig.
- 1b. Aliquoteer 50-200 µl van het monster in PCR-vrije buisjes van 1,5 ml.
- 1c. Verwarm op 70 °C gedurende 10 minuten in een verwarmingsblok. Koel de monsters af op ijs gedurende minstens 5 minuten, bewaar ze dan op ijs of bij 4 °C.

2. Vul de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer na het eerste gebruik aan met de ROX-referentiekleurstof.

- 2a. Voeg 32,8 µl van de ROX-kleurstof toe aan 1 buis SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 2b. Sluit het deksel met de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en de ROX-kleurstof, en draai de buis 3 maal om.
- 2c. Draai de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer met ROX-kleurstof af op de bodem van de buis.

3. Voor een volledige RGQ MDx-plaat (72 putjes), bereidt u een aliquotmengsel van de SARS-CoV-2 Amp Primers met de SARS-CoV-2 Internal Control voor.

- 3a. Breng de vereiste volumes SARS-CoV-2 Amp Primers en SARS-CoV-2 Internal Control volgens tabel 1 over naar een nieuwe PCR-vrije buis van 1,5 ml.
- 3b. Sluit het deksel en keer de buis 3 maal om, of pulse-vortex de buis gedurende 3-5 s.
- 3c. Draai de SARS-CoV-2 Amp Primers met IC af op de bodem van de buis.

Tabel 1. Opstelling mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Aantal reacties volume (µl)	
Reagentia	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	72 rxns (+22% extra volume*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	638
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	132
Totaal mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	770

* **Opmerking:** Pas de volumes van SARS-CoV-2 UM Amp Primers en van SARS-CoV-2 Internal Control aan volgens het aantal te testen monsters. Overweeg extra volume om het dode volume te compenseren.

4. Bereid een reactiemengsel volgens tabel 2 en meng grondig.

Tabel 2. Opstelling van reactiemengsel

Reactiemengsel RT-PCR			Aantal reacties volume (µl)	
Reagentia	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	72 rxns (+20% extra volume*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer [†]	4x	1x	6,25	540
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	2,9x	1x	8,75	756
Totaal reactievolume	–		15,00	1296

* **Opmerking:** Pas de volumes van SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en SARS-CoV-2 Amp Primers aan volgens het aantal te testen monsters. Overweeg extra volume om het dode volume te compenseren.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer aangevuld met de ROX-referentiekleurstof.

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers aangevuld met de SARS-CoV-2 Internal Control.

- Breng 8 µl nucleasevrij water over naar de PCR-buis die is toegewezen aan de NEC.
- Laad 10 µl nucleasevrij water in de PCR-buis die is toegewezen aan de NTC.
- Verdeel 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer over elke PCR-buis die is toegewezen aan de NEC en de bereide monsters.
- Voeg 8 µl van het bereide monster toe aan een PCR-buis die SARS-CoV-2 UM Prep Buffer bevat. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
- Voeg 15 µl van het reactiemengsel bereid in stap 4 toe aan de buizen voor monsters en controles (afbeelding 2 dient als voorbeeld). Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen. Sluit dan de deksels van de PCR-buizen, behalve voor de SARS-CoV-2 Positive Control.

Opmerking: verifieer dat alle buizen goed gesloten zijn om kruisbesmetting te voorkomen.

10. Laad 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control in de betreffende PCR-buis. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.

11. Stel het RT-PCR-programma van de RGQ MDx 5plex HRM in volgens de specificaties in tabel 3.

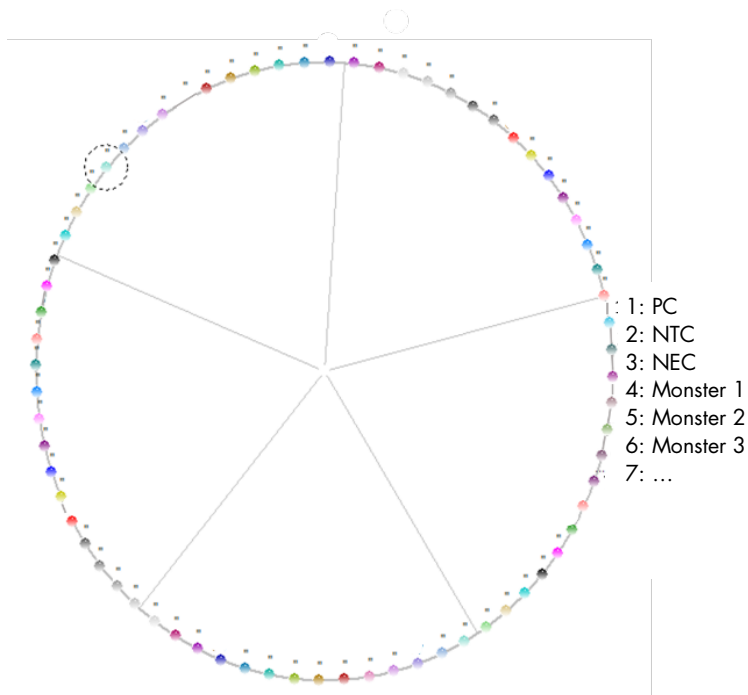
Opmerking: de gegevensacquisitie moet plaatsvinden tijdens de stap van hybridisatie/uitbreiding.

12. Plaats de buizen in de realtime cyclus (een voorbeeld voor indeling van de buisjes wordt voorgesteld in afbeelding 2), en start het cyclusprogramma zoals beschreven in tabel 3.

Opmerking: zorg dat u dezelfde buisjespositie en -volgorde aanhoudt tussen de assayopstelling en de stappen van de realtime cyclus.

Tabel 3. Programma SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Stappen	Tijd	Temperatuur (°C)	Aantal cycli	Acquisitie
Omgekeerde transcriptie	10 min	50	1	Nee
Initiële warmte-activering PCR	2 min	95	1	Nee
2-stapscyclus				
Denaturatie hybridisatie/ uitbreiding	5 s	95	40	Nee
	30 s	58		Green (FAM), Yellow (HEX) en Red (Atto)



Afbeelding 2. Voorbeeld van indeling van buisjes op het RGQ MDx 5plex HRM-platform

13. Klik op **Gain optimization** (Versterkingsoptimalisatie) in de 'New Run Wizard' (Nieuwe run instellen) en open **Auto-gain Optimization Setup** (Instelling automatische versterkingsoptimalisatie).

14. Verifieer dat de acquisitiekanalen zijn ingesteld zoals beschreven in tabel 4.

Tabel 4. Configuratie RGQ MDx 5plex HRM

Naam	Positie PC-buis	Minimumwaarde (FI)	Maximumwaarde (FI)	Minimale versterking	Maximale versterking
Green	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

* **Opmerking:** dit moet gewijzigd worden volgens de buispositie van SARS-CoV-2 Positive Control.

-
15. Selecteer **Perform optimization before the first acquisition** (Optimalisatie uitvoeren voor eerste acquisitie).
 16. Start de run.
 17. Analyseer de resultaten op het einde van de run (zie paragraaf Resultaten).

Protocol: monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in ABI 7500 Fast Dx

Dit protocol is bestemd voor het bereiden en detecteren van SARS-CoV-2 in menselijke nasale, nasofaryngeale of orofaryngeale uitstrijkjes die zijn bewaard in transportmedia met het ABI 7500 Fast Dx qPCR-instrument.

Wat u moet weten voor u begint

- Verifieer dat de uiterste gebruiksdatums en opslagvoorwaarden die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld, worden nageleefd. Gebruik geen componenten na de uiterste gebruiksdatum of die op de verkeerde manier zijn bewaard.
- Gebruik goed onderhouden en gekalibreerde apparatuur.
- Let erop dat u verontreiniging met RNAsen tijdens het experiment vermijdt en gebruik kunststof artikelen zonder nuclease.
- Bij gebruik van ABI 7500 Fast Dx moet ROX-kleurstof worden toegevoegd aan de buis met mastermix voor het eerste gebruik.

Wat u moet doen voor u begint

- Monsters kunnen op kamertemperatuur worden bewaard tijdens de bereiding en de opstelling van de reactie; het wordt echter aanbevolen om ze op ijs of bij 4 °C in een koelrek te bewaren.
- De ROX-kleurstof is nodig bij gebruik van de ABI 7500 Fast Dx.
- **De acquisitie van gegevens moet plaatsvinden met instelling van passieve ROX-kleurstof.**
- Laat de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, water voor NTC en SARS-CoV-2 Positive Control voor gebruik volledig ontdooien op kamertemperatuur (15–25 °C). Houd de buisjes op kamertemperatuur en beschermd tegen licht tot het gebruik.
- Homogeniseer de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer voorafgaand aan gebruik door ze 2-3 maal om te keren (niet vortexen) en daarna even snel te draaien. Alle andere individuele reagentia kunnen gehomogeniseerd worden door middel van puls-vortexen gedurende 3-5 seconden of door ze 2-3 maal om te keren en daarna even snel te draaien.

- De SARS-CoV-2 UM Prep Buffer remt RNAsen in de klinische monsters voor de detectiestap, maar is geen oplossing die virussen inactieveert. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.
- Verifieer dat de cyclusvoorwaarden van het qPCR-platform overeenkomen met de specificaties in dit protocol.
- Reagentia kunnen in aliquots worden verdeeld om opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien te vermijden.
- Bereid het verse reactiemengsel (<2 u voor de start van de RT-PCR-plaat).
- Om de verontreiniging te beperken, moeten de bereidingen van het monster en de RT-PCR in gescheiden zones plaatsvinden.

Procedure

1. Monsterbereiding

- 1a. Vortex het uitstrijkje met het monster krachtig.
- 1b. Aliquoteer 50-200 µl van het monster in PCR-vrije buisjes van 1,5 ml.
- 1c. Verwarm op 70 °C gedurende 10 minuten in een verwarmingsblok. Koel de monsters af op ijs gedurende minstens 5 minuten, bewaar ze dan op ijs of bij 4 °C.

2. Vul de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer na het eerste gebruik aan met de ROX-referentiekleurstof.

- 2a. Voeg 32,8 µl van de ROX-kleurstof toe aan een buis SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 2b. Sluit het deksel met de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en de ROX-kleurstof, en draai de buis 3 maal om.
- 2c. Draai de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer met ROX-kleurstof af op de bodem van de buis.

3. Voor een volledige ABI 7500 Fast Dx-plaat (96 putjes), bereidt u een aliquotmengsel van de SARS-CoV-2 Amp Primers met de SARS-CoV-2 Internal Control voor.

- 3a. Breng het vereiste volume SARS-CoV-2 Amp Primers en SARS-CoV-2 Internal Control volgens tabel 5 over naar een nieuwe PCR-vrije buis van 1,5 ml.
- 3b. Sluit het deksel en keer de buis 3 maal om, of pulse-vortex de buis gedurende 3-5 s.
- 3c. Draai de SARS-CoV-2 Amp Primers met IC af om de oplossing naar de bodem van de buis te brengen.

Tabel 5. Opstelling mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Aantal reacties volume (µl)	
Reagentia	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	96 rxns (+21% extra volume*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	841
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	174
Totaal mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1015

* **Opmerking:** Pas de volumes van SARS-CoV-2 UM Amp Primers en van SARS-CoV-2 Internal Control aan volgens het aantal te testen monsters. Overweeg extra volume om het dode volume te compenseren.

4. Bereid een reactiemengsel volgens tabel 6 en meng grondig.

Tabel 6. Opstelling van reactiemengsel

Reactiemengsel RT-PCR			Aantal reacties volume (µl)	
Reagentia	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	96 rxns (+20% extra volume*)
SARS-CoV-2 UM Amp buffer [†]	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	2,9x	1x	8,75	1008
Totaal reactievolume	–		15,00	1728

* **Opmerking:** pas het volume van SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en SARS-CoV-2 Amp Primers aan volgens het aantal te testen monsters. Overweeg extra volume om het dode volume te compenseren.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer aangevuld met de ROX-referentiekleurstof.

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers aangevuld met de SARS-CoV-2 Internal Control.

- Breng 8 µl nucleasevrij water over naar het putje dat is toegewezen aan de NEC.
- Laad 10 µl nucleasevrij water in het putje dat is toegewezen aan de NTC.
- Verdeel 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer over elke putje dat is toegewezen aan de NEC en aan de bereide monsters.
- Voeg 8 µl van het bereide monster toe aan een putje dat SARS-CoV-2 UM Prep Buffer bevat. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
- Voeg 15 µl van het reactiemengsel bereid in stap 4 toe aan de putjes voor monsters en controles (zie voorbeeld in afbeelding 3). Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.

10. Laad 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control in het betreffende putje. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
11. Sluit de PCR-plaat af om kruisbesmetting te voorkomen. Oefen gelijkmatig druk uit over de volledige plaat om een hechte afsluiting over individuele putjes te krijgen.
12. Centrifugeer kort de PCR-plaat om vloeistof op de bodem van het putje te verzamelen.
13. Stel het RT-PCR-programma van de 'Standard 7500' Run Mode van de ABI 7500 Fast Dx in volgens tabel 7.

Opmerking: de gegevensacquisitie moet plaatsvinden tijdens de stap van hybridisatie/uitbreiding.

Opmerking: raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing ABI 7500 Fast Dx* voor meer informatie.
14. Zet de plaat in de realtime cyclus (een voorbeeld voor indeling van de PCR-plaat wordt weergegeven in afbeelding 3), en start het cyclusprogramma zoals beschreven in tabel 7.
15. Selecteer de gebruikte putjes en pas de FAM-, VIC- en Cy5-reporters toe. De acquisitie van gegevens moet plaatsvinden met passieve ROX-kleurstof op **ON** (AAN).
16. Verifieer dat de Standard Curve (Standaardcurve) van de ABI 7500 Fast Dx is geconfigureerd als Absolute Quantitation (Absolute kwantificering).
17. Start de run.
18. Analyseer de resultaten op het einde van de run (zie paragraaf Resultaten).

Tabel 7. Programma SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Stappen	Tijd	Temperatuur (°C)	Aantal cycli	Acquisitie
Omgekeerde transcriptie	10 min	50	1	Nee
Initiële warmte-activering PCR	2 min	95	1	Nee
2-stapscyclus				
Denaturatie hybridisatie/uitbreiding	5 s 30 s	95 58	40	Nee Green (FAM), Yellow (VIC) en Red (Cy5)

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

Afbeelding 3. Voorbeeld van plaatindeling in ABI 7500 Fast Dx

Resultaten

In de RGQ MDx 5plex HRM worden de gegevens geanalyseerd met de Rotor-Gene Q-software versie 2.3.1 (of hoger) volgens de instructies van de fabrikant (gebruikershandleiding Rotor-Gene Q MDx, revisie 7, september 2018). De volgende analyseparameters zijn nodig voor consistentie tussen verschillende analyses (tabel 8).

Tabel 8. Analyseparameters voor de RGQ MDx 5plex HRM

Kanalen	Green	Red	Yellow
Fluorescentiedrempel	0,03	0,03	0,03
Hellingcorrectie	Ja	Ja	Ja
Dynamische buis	Ja	Ja	Ja
Ijfpunt	Nee	10-20	10-20
Verwijdering van afwijkingen: drempel reactie-efficiëntie	Ja Ingeschakeld 0%	Nee	Nee
Afgesneden startcycli	5	5	5
Grenscycli	Ct > 38,00 wordt beschouwd als 40,00	Nee	Ct > 35,00 wordt beschouwd als 40,00

In de RGQ-software zijn resultaten van de verwerking beschikbaar in het rooster van kwantificeringsresultaten dat is geopend tijdens de analyse. Gegevens van geselecteerde monsters worden samengevat in de tabel en kunnen worden geëxporteerd als Excel®-bestand door op de rechtermuisknop te klikken en 'Export to Excel' (Exporteren naar Excel) te selecteren. Zorg dat alle monsters zijn geselecteerd voordat u de resultaten exporteert.

In de ABI worden de gegevens geanalyseerd met de 7500 Fast System-software versie 1.4.1 (of hoger) volgens de instructies van de fabrikant. De volgende parameters zijn nodig voor consistentie tussen verschillende analyses (tabel 9).

Tabel 9. Analyseparameters voor de ABI 7500 Fast Dx

Kanalen	FAM*	VIC/HEX*	Cy5/Atto*
Passieve kleurstof	ROX	ROX	ROX
Fluorescentiedrempel	0,13	0,05	0,025
Instelling baseline	Auto	Auto	Auto
Grenscycli	Ct > 39,00 wordt beschouwd als 40,00	Nee	Ct > 35,00 wordt beschouwd als 40,00

* FAM = Filter A/1 in ABI-platform, VIC/HEX = Filter B/2 in ABI-platform, Cy5/Atto = Filter E/5 in ABI-platform

In de ABI SDS-software zijn Ct-waarden van een geselecteerde groep putjes of de volledige plaat beschikbaar in het blad **Report** (Rapport) van de hoofdsectie **Results** (Resultaten). Gegevens kunnen worden geëxporteerd als een bestand met door komma's gescheiden waarden (.csv, aanbevolen): In het venster van de SDS-software selecteert u **File** (Bestand) > **Export** (Exporteren) > **Results** (Resultaten) (ook de optie **Ct** kan gekozen worden). Selecteer voor de bestandsindeling van het geëxporteerde bestand .csv.

Interpretatie van de resultaten

De positieve controle (PC), de N1- en de N2-genen worden gedetecteerd in het fluorescentiekanaal Green met de RGQ MDx 5plex HRM (of in het fluorescentiekanaal FAM in de ABI).

De bemonsteringscontrole, die bestaat uit het RNAse P, wordt gedetecteerd in het fluorescentiekanaal Yellow met de RGQ MDx 5plex HRM (of in de fluorescentie VIC/HEX met de ABI). Elk klinisch monster moet een amplificatie van de bemonsteringscontrole weergeven. In de PC kan een gele amplificatie zichtbaar zijn zonder dat menselijke sequenties aanwezig zijn. In dit geval kan een signaal in het gele kanaal van de PC genegeerd worden, omdat het sterke fluorescentiesignaal in het groene kanaal kan overlopen in het gele kanaal.

De interne controle (IC) is opgenomen in de SARS-CoV-2 Amp Primers. Ze wordt gedetecteerd in de controle zonder template (No Template Control; NTC), de controle zonder extractie (No Extraction Control; NEC), de positieve controle (PC) en de klinische monsters met het fluorescentiekanaal Red met de RGQ MDx 5plex HRM (of in het fluorescentiekanaal Cy5/Atto met de ABI).

Om de RT-PCR-runs te valideren, moeten de PC-, NTC- en NEC-controles worden geamplificeerd en gedetecteerd volgens de verwachting.

Tabel 10. Criteria voor runvaliditeit en interpretatie van de resultaten voor de RGQ MDx 5plex HRM

Controle	Detectie in Green kanaal	Detectie in Yellow kanaal	Detectie in Red kanaal	Interpretatie
Positieve controle (PC)	Ct ≤ 38,00	Onverschillig	Onverschillig	Run is gevalideerd.
	Ct > 38,00 of Geen Ct	Onverschillig	Onverschillig	Run is geïnvalideerd.
Controle zonder template (NTC) of Controle zonder extractie (NEC)	Ct > 38,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Ja	Run is gevalideerd.
	Andere combinaties met amplificatie in groen of geel		Onverschillig	Run is geïnvalideerd.

Tabel 11. Criteria voor runvaliditeit en interpretatie van de resultaten voor de ABI 7500 Fast Dx

Controle	Detectie in FAM-kleurstof*	Detectie in VIC/HEX-kleurstof*	Detectie in Cy5/Atto-kleurstof*	Interpretatie
Positieve controle (PC)	Ct ≤ 39,00	Onverschillig	Onverschillig	Run is gevalideerd.
	Ct > 39,00 of Geen Ct	Onverschillig	Onverschillig	Run is geïnvalideerd.
Controle zonder template (NTC) of Controle zonder extractie (NEC)	Ct > 39,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Ja	Run is gevalideerd.
	Andere combinaties met amplificatie in FAM of VIC/HEX		Onverschillig	Run is geïnvalideerd.

* FAM = Filter A/1 in ABI-platform, VIC/HEX = Filter B/2 in ABI-platform, Cy5/Atto = Filter E/5 in ABI-platform

Om de geteste monsters te valideren, moeten de monsters worden geamplificeerd en gedetecteerd volgens de verwachting.

Tabel 12. Criteria voor monstervaliditeit en interpretatie van de resultaten voor de RGQ MDx 5plex HRM

Detectie in Groen kanaal	Detectie in Yellow kanaal	Detectie in Red kanaal	Interpretatie
Ct ≤ 38,00	Onverschillig	Onverschillig	Monster is positief op SARS-CoV-2-RNA.
Ct > 38,00 of Geen Ct	Ct ≤ 35,00	Onverschillig	Monster is negatief, SARS-CoV-2-RNA is niet gedetecteerd.
Ct > 38,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Ja	Ongeldig monster. Geen of onvoldoende menselijk materiaal gedetecteerd. Nieuwe bemonstering vereist.
Ct > 38,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Nee	Ongeldig monster. RT-qPCR-reactie is geremd. Een nieuwe test is vereist.

Tabel 13. Criteria voor monstervaliditeit en interpretatie van de resultaten voor de ABI 7500 Fast Dx

Detectie in FAM-kleurstof*	Detectie in VIC/HEX-kleurstof*	Detectie in Cy5/Atto-kleurstof*	Interpretatie
Ct ≤ 39,00	Onverschillig	Onverschillig	Monster is positief.
Ct > 39,00 of Geen Ct	Ct ≤ 35,00	Onverschillig	Monster is negatief, SARS-CoV-2 niet gedetecteerd.
Ct > 39,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Ja	Ongeldig monster. Geen menselijk materiaal gedetecteerd. Nieuwe bemonstering vereist.
Ct > 39,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Nee	Ongeldig monster. RT-qPCR-reactie is geremd. Een nieuwe test is vereist.

* FAM = Filter A/1 in ABI-platform, VIC/HEX = Filter B/2 in ABI-platform, Cy5/Atto = Filter E/5 in ABI-platform

Beperkingen

- Uitsluitend voor *in-vitro*diagnostisch gebruik.
- Resultaten van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zijn niet bedoeld om te worden gebruikt als de enige basis voor de diagnose, behandeling of andere beslissingen over de behandeling van de patiënt. Negatieve resultaten sluiten infectie met SARS-CoV-2 niet uit en mogen niet worden gebruikt als enige onderbouwing voor behandelingsbesluiten voor de patiënt.
- Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat speciale instructies en training heeft gekregen in de procedures voor *in-vitro*diagnostiek.
- Een strikte naleving van de gebruikershandleiding van het qPCR-platform (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx of ABI 7500 Fast Dx) is vereist voor optimale PCR-resultaten.
- Let goed op de uiterste gebruiksdatum op het etiket van de doos en op de etiketten van alle onderdelen. Gebruik geen componenten waarvan de uiterste gebruiksdatum is verstreken.

Prestaties

Analytische gevoeligheid (detectielimiet)

De analytische gevoeligheid of detectielimiet (Limit of Detection; LoD) is gedefinieerd als de laagste concentratie waarbij bij $\geq 95\%$ van de geteste monsters een positief resultaat wordt gevonden.

De LoD werd geëvalueerd door de analyse van seriële verdunningen van negatieve nasofaryngeale monsters die zijn bereid met voorraden met hoge titer van geïnactiveerde virusdeeltjes verkregen van commerciële leveranciers (ZeptoMetrix®). Om de vastgelegde LoD-concentratie te bevestigen, moet het detectiepercentage van alle replicaten $\geq 95\%$ zijn (minstens 19/20 van de replicaten moeten een positief signaal genereren). De LoD-concentratie werd bepaald op beide geclaimde real-time PCR-platformen, met twee verschillende partijen reagentia.

De geclaimde detectielimiet voor beide real-time PCR-platformen voor de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is 950 cp/ml.

Onderzoeken naar analytische specificiteit (Inclusiviteit en exclusiviteit/kruisreactiviteit)

Inclusiviteit

De inclusiviteit van de *artus* SARS-CoV-2 Amp-primers en -probes werd geëvalueerd aan de hand van een *in-silico* analyse op sequenties die beschikbaar zijn in de GISAID-database (www.gisaid.org). In totaal werden 722.488 sequenties (beschikbaar via 23/03/2021) geanalyseerd op COVID CG (<https://covidcg.org>), op basis van GISAID-metadata. Sequenties werden afgestemd op de WIV04-referentiesequentie (100% identiek aan Wuhan-Hu-1/NC_045512.2, met uitzondering van de lengte van de poly-A-staart) en de enkelvoudige nucleotidevariaties (Single Nucleotide Variations; SNV's) werden geanalyseerd in de genomische gebieden waarop de primers en probes van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zich richtten.

De prevalentie van de geïdentificeerde SNV's bleef onder de 1%, evenals de frequentie van de mutaties die zich tegelijkertijd voordeden. Er bevond zich geen SNV op de achterste 1 tot 3 nucleotiden op het 3'-uiteinde van de respectieve oligonucleotiden, waarvan zou worden verwacht dat ze invloed zouden hebben op de prestaties. Van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wordt beschouwd dat deze 100% van de gepubliceerde sequenties detecteert.

Exclusiviteit/kruisreactiviteit

In-silico analyse

De exclusiviteit van de *artus* SARS-CoV-2 Amp-primers en -probes werd geëvalueerd aan de hand van een *in-silico* analyse op sequenties die zijn opgeslagen in de NCBI-databank. De *in-silico* analyse wees uit dat sommige van de geteste pathogenen meer dan 80% homologie vertonen met één van de primers of probes van de *artus* SARS-CoV-2. Hiertoe behoren onder andere *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* en *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* vertoonde minder dan 80% homologie met één van de primers/probes van de SARS-CoV-2-assay. De primers en probes van *artus* SARS-CoV-2 Amp vertoonden echter geen mogelijke amplificatie met de verschillende sequenties die zijn opgeslagen in de NCBI nr/nt-database.

In totaal zijn 36 bacterie-, virus- en schimmelstammen geanalyseerd met *in-silico* PCR, met een beperkte potentiële amplicongrootte van 500 bp. Pathogeensequenties werden opgenomen uit de NCBI-database, maar geen van deze pathogenen vertoonde amplificatie *in silico*.

Tabel 14. Lijst met *in-silico* geteste pathogenen.

Pathogenen	Stam/type	Taxonomie-ID	<i>In-silico</i> PCR-resultaten
<i>Adenovirus type 3</i>	Type 3	45659	Geen overeenkomst
<i>Adenovirus type 4</i>	Type 4	28280	Geen overeenkomst
<i>Adenovirus type 5</i>	Type 5	28285	Geen overeenkomst
<i>Adenovirus type 7A</i>	Type 7A	85755	Geen overeenkomst
<i>Adenovirus type 14</i>	Type 14	10521	Geen overeenkomst
<i>Adenovirus type 31</i>	Type 31	10529	Geen overeenkomst
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Geen overeenkomst
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Geen mogelijke amplificatie*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Geen overeenkomst
Enterovirus	Type 68	42789	Geen overeenkomst
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus	229E	11137	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus	NL63	277944	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus	HKU-1	290028	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus OC43	OC43	31631	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus	MERS-CoV	1335626	Geen overeenkomst
Humaan metapneumovirus	n.v.t.	162145	Geen overeenkomst
Influenza A	H1N1	114727	Geen overeenkomst
Influenza A	H3N2	119210	Geen overeenkomst
Influenza B	n.v.t.	11520	Geen overeenkomst
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Geen overeenkomst
Para-influenzavirus	Type 1	12730	Geen overeenkomst
Para-influenzavirus	Type 2	2560525	Geen overeenkomst
Para-influenzavirus	Type 3	11216	Geen overeenkomst
Para-influenzavirus	Type 4	2560526	Geen overeenkomst
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Geen overeenkomst

* Sequentieovereenkomst met één van de primers/probes die < 80% homologie vertoonden.

† Sequentieovereenkomst met één van de primers/probes die ≥ 80% homologie vertoonden.

(Vervolg op de volgende pagina)

Tabel 14 (vervolg van vorige pagina)

Pathogenen	Stam/type	Taxonomie-ID	<i>In-silico</i> PCR-resultaten
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Geen mogelijke amplificatie*
Respiratoir syncytieel virus	Type A (RSV-A)	208893	Geen overeenkomst
Respiratoir syncytieel virus	Type B (RSV-B)	208895	Geen overeenkomst
Rhinovirus	Type A	147711	Geen overeenkomst
Rhinovirus	Type B	147712	Geen overeenkomst
SARS-coronavirus	Tor2	694009	Geen mogelijke amplificatie†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	n.v.t.	1282	Geen overeenkomst
<i>Streptococcus pyogenes</i>	n.v.t.	1314	Geen mogelijke amplificatie†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Geen mogelijke amplificatie†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Geen overeenkomst

* Sequentieovereenkomst met één van de primers/probes die < 80% homologie vertoonden.

† Sequentieovereenkomst met één van de primers/probes die ≥ 80% homologie vertoonden.

In-vitro analyse

De kruisreactiviteit werd in-vitro geverifieerd met pathogenen die ≥ 80% homologie met de SARS-CoV-2 Amp Primers vertoonden in de in-silico analyse. Monsters werden bereid door potentieel kruisreactieve organismen toe te voegen aan een nasofaryngeale uitstrijkmatrix bij 10⁶ cp/ml, met uitzondering van SARS-CoV-1, welke onverdund werd getest in overeenstemming met de aanbevelingen van de leverancier. Geen van deze pathogenen vertoonde in-vitro kruisreactiviteit.

De microbiële interferentie van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit-assay is in-vitro geëvalueerd op een panel van aanbevolen pathogenen. Monsters werden bereid door maximaal 5 pathogenen toe te voegen (bij 10⁵ TCID₅₀/ml voor virusdoelen, 10⁶ cp/ml voor bacterie- en schimmeldoelen, of bij de hoogst mogelijke concentratie op basis van de concentratie van de voorraad) in negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes waaraan geïnactiveerde SARS-CoV-2-deeltjes (Zeptomatrix) waren toegevoegd bij 2,87 x LoD. De NATrol™-panelen en de SARS-CoV-1 waren rechtstreeks verrijkt met geïnactiveerde SARS-CoV-2-virusdeeltjes (Zeptomatrix) bij 2,87 x LoD. De resultaten voor alle geteste micro-organismepools en de bijbehorende concentraties zijn hieronder samengevat.

Tabel 15. Lijst met *in-vitro* geteste pathogenen in microbiële interferentie.

Pool-ID/ monster-ID	Micro-organisme	Bron	Uiteindelijke concentratie	Eenheid	Resultaat
Pool 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Humaan coronavirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Humaan coronavirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/ml	
	Humaan coronavirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID50/ml	
	Adenovirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Para-influenzavirus 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID50/ml	
Pool 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Adenovirus T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/ml	
	Para-influenzavirus 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/ml	
	Influenza B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Rhinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Pool 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Para-influenzavirus 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	
Pool 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	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	

(Vervolg op de volgende pagina)

Tabel 15 (vervolg van vorige pagina)

Pool-ID/ monster-ID	Micro-organisme	Bron	Uiteindelijke concentratie	Eenheid	Resultaat
Pool 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Respiratoir syncytieel virus RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H1N1 California	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterovirus type 68 hoofdgroep	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Adenovirus T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Pool 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	MERS-coronavirus	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	AdenoVirus T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Humaan Metapneumovirus (hMPV) type B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Respiratoir syncytieel virus type B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	
Pool 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Para-influenzavirus 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H3N2 Switzerland/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Pool 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
NATrol Panel RP1 (Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY/02/ 2009), Rhinovirus (type 1A), Adenovirus T3, Para-influenza T1, Para-influenzavirus T4, Metapneumovirus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Coxsackievirus (Type A1)	Zeptomatrix (MDZ001)	Onbekend*	N.v.t.		

(Vervolg op de volgende pagina)

Tabel 15 (vervolg van vorige pagina)

Pool-ID/ monster- ID	Micro-organisme	Bron	Uiteindelijke concentratie	Eenheid	Resultaat
Pool 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)- ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	NATrol Panel RP2 (Influenza A H1 (New Caledonia/20/99), Influenza B (Florida/02/06), RSV-A, Para- influenza T2, Para-influenza T3, Coronavirus HKU recombinant, Coronavirussen (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639)	Zeptomatrix (MDZ001)	Onbekend*	N.v.t.	
Pool 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)- ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Onbekend*	N.v.t.	

* Concentratie niet doorgegeven door de leverancier.

Interfererende stoffen

Het effect van vermeende interfererende stoffen (voor de stoffen die in tabel 16 staan vermeld) op de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is geëvalueerd. Tests werden uitgevoerd in 3 pools van negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes en in 3 pools van positieve nasofaryngeale uitstrijkjes, verrijkt bij 4 x LoD met geïnactiveerde SARS-CoV-2-virusdeeltjes (Zeptomatrix). De experimenten werden uitgevoerd op het RGQ MDx 5plex HRM-platform (met 4 instrumenten) door 1 operator met 1 pilotkit.

Elke pool werd in tweeën verdeeld om ofwel de interfererende stof in een oplosmiddel (testmonster) of alleen het oplosmiddel (controlemonster) te testen. De slagingspercentages in het groene en het rode fluorescentiekanaal werden vergeleken tussen de test en de bijbehorende controlemonsters. Bij afwezigheid van een storende werking hebben de test en de bijbehorende controlemonsters hetzelfde slagingspercentage.

Uit tabel 16 blijkt dat geen van de geteste stoffen een storende werking had op de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit in het groene fluorescentiekanal.

Tabel 16. Lijst van interfererende stoffen.

Interfererende stoffen	Functie	Geteste concentratie	Resultaten in een negatief nasofaryngeaal uitstrijkje	Resultaten in een positief (4 x LoD) nasofaryngeaal uitstrijkje
Tobramycine	Systemisch antibioticum	1 mg/ml	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 0/15
Mupirocine	Antibiotische neuszalf	6,6 mg/ml	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 0/15
Fluticasone	Nasale corticosteroïde	5% (vol.)	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 0/15
Menthol (keelpastilles)	Oraal verdovingsmiddel en pijnstillers	0,5 mg/ml	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 0/15
Oxymetazoline	Neusspray	10% (vol.)	Geen interferentie (0/15)	Geen interferentie (0/15)
Oseltamivir	Antiviraal geneesmiddel	3,3 mg/ml	Geen interferentie (0/15)	Geen interferentie (0/15)
Mucine (boviene submaxillaire klier, type I-S)		2,5 mg/ml	Geen interferentie (0/15)	Geen interferentie (0/15)
Volbloed		4% (vol.)	Geen interferentie (1/15*)	Geen interferentie (0/15)

* Een amplificatie die overeenkomt met een artefact is gedetecteerd.

Precisie

Tijdens het precisieonderzoek zijn de reproduceerbaarheid (hetzelfde monster wordt in verschillende runs en omstandigheden gebruikt: 5 dagen, 3 partijen kits, 3 operators en 2 instrumenten) en de herhaalbaarheid (hetzelfde monster wordt gebruikt in dezelfde run en dezelfde omstandigheden) geëvalueerd. De tests werden uitgevoerd op negatieve nasofaryngeale monsters en negatieve nasofaryngeale monsters die zijn verrijkt op 5 x LoD in de RGQ MDx.

Voor elk verdunningsniveau werden 204 datapunten verzameld. De gegevens van de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid werden gebruikt om de standaardafwijking (Standard Deviation, SD) en variatiecoëfficiënt (Coefficient of Variation, %CV) voor de SARS-CoV-2-doelen in het groene, gele en rode kanaal te bepalen. Tabel 17 toont aan dat de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit een algehele precisie van 0,63 SD (2,03% CV) in het groene kanaal, 0,54 SD (2,22% CV) in het gele kanaal en 1,28 SD (4,10% CV) in het rode kanaal heeft.

Tabel 17. Standaardafwijking en variatiecoëfficiënt van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Monsters en detectiekanaal	Totaal	Dag-tot-dag	Batch-tot-batch	Operator-tot-operator	Instrument-tot-instrument	Run-tot-run	Binnen een run
Standaardafwijking (Standard deviation, SD) (Variatecoëfficiënt (Coefficient of variation, %CV))							
Negatieve NPS	0,54	0,09	0,10	0,06	0,11	0,09	0,50
Yellow kanaal	(2,22)	(0,37)	(0,42)	(0,27)	(0,47)	(0,36)	(2,05)
Negatieve NPS	1,15	0,0	0,55	0,00	0,12	0,39	0,92
Red kanaal	(3,68)	(0,00)	(1,76)	(0,00)	(0,40)	(1,26)	(2,96)
Verrijkte NPS	0,63	0,18	0,31	0,00	0,08	0,00	0,51
Green kanaal	(2,03)	(0,59)	(1,00)	(0,00)	(0,25)	(0,00)	(1,64)
Verrijkte NPS	0,47	0,13	0,24	0,05	0,18	0,00	0,33
Yellow kanaal	(1,93)	(0,53)	(0,98)	(0,20)	(0,73)	(0,00)	(1,38)
Verrijkte NPS	1,28	0,12	0,58	0,11	0,00	0,49	1,02
Red kanaal	(4,10)	(0,37)	(1,84)	(0,34)	(0,00)	(1,57)	(3,27)

Klinische prestaties

De klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-assay werd geëvalueerd met retrospectieve specimens van nasofaryngeale uitstrijkjes in transportmedium, bestaande uit:

- 98 SARS-CoV-2-RNA negatieve specimens
- 52 SARS-CoV-2-RNA positieve specimens

Alle specimens werden afgenomen bij patiënten met tekenen en symptomen van COVID-19-infectie en werden ingevroren opgeslagen tot gebruik.

De klinische validatie werd uitgevoerd op de ABI 7500 Fast Dx. In tabel 18 staan de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ten opzichte van een referentiemethode vermeld, uitgedrukt als percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA) en percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabel 18. Klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ten opzichte van een referentiemethode

Monstertype	N	% positief	95%-BI	% negatief	95%-BI
Positief	52	98,1 (51/52)	89,9 - 99,7	5,1 (5/98)	
Negatief	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7 - 97,8

Afwijkende resultaten werden geëvalueerd aan de hand van een derde methode en opnieuw geanalyseerd met een kruistabel. De algehele klinische prestatieresultaten worden uitgedrukt als percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA) en percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA) en staan vermeld in tabel 19.

Tabel 19. Klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Monstertype	N	% positief	95%-BI	% negatief	95%-BI
Positief	52	98,1 (51/52)	89,9 - 99,7	5,1 (5/98)	
Negatief	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7 - 97,8

Hieronder staat het deel monsters in overeenstemming en de percentages positieve/negatieve overeenstemming (Positive/Negative Percent Agreement, PPA en NPA respectievelijk) met de verwachte monsterstatussen:

Percentage positieve overeenstemming

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

Percentage negatieve overeenstemming

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

Klinische prestaties met inbegrip van asymptomatische personen

De klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-assay werd geëvalueerd met retrospectieve specimens van nasofaryngeale uitstrijkjes in transportmedium, bestaande uit:

- 100 SARS-CoV-2-RNA negatieve specimens
- 53 SARS-CoV-2-RNA positieve specimens

Alle specimens zijn afgenomen bij patiënten zonder symptomen of met andere redenen om COVID-19-infectie te vermoeden.

De klinische validatie werd uitgevoerd op de ABI 7500 Fast Dx. 16 monsters zijn na het testen met de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit uitgesloten wegens een ongeldige status volgens de geldigheidscriteria voor monsters (Tabel 13).

In tabel 20 staan de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ten opzichte van een referentiemethode vermeld, uitgedrukt als percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA) en percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabel 20. Klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ten opzichte van een referentiemethode

Monstertype	N	% positief	95%-BI	% negatief	95%-BI
Positief	50	64,0 (32/50)	50,1 - 75,9	1,15 (1/87)	–
Negatief	87	36,0 (18/50)	–	98,85 (86/87)	93,8 - 99,8

19 afwijkende resultaten werden geëvalueerd aan de hand van een derde methode en opnieuw geanalyseerd met een kruistabel. De algehele klinische prestatieresultaten worden uitgedrukt als percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA) en percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA) en staan vermeld in tabel 21.

Tabel 21. Klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Monstertype	N	% positief	95%-BI	% negatief	95%-BI
Positief	32	100,0 (32/32)	89,3 - 100,0	0,95 (1/105)	–
Negatief	105	–	–	99,05 (104/105)	94,8 - 99,8

De classificatie van 18 fout-negatieve monsters werden gewijzigd naar werkelijk negatief. Het enkele fout-positieve monster bleef fout-positief.

Hieronder staat het deel monsters in overeenstemming en de percentages positieve/negatieve overeenstemming (Positive/Negative Percent Agreement, PPA en NPA respectievelijk) met de verwachte monsterstatussen:

Percentage positieve overeenstemming

(Positive Percent Agreement, PPA): $32/32 = 100,0\%$ (95%-BI: 89,3% - 100,0%)

Percentage negatieve overeenstemming

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

Referenties

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>

Probleemoplossingsgids

Deze gids voor probleemoplossing kan helpen bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg ook de pagina Veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Opmerkingen en suggesties

Zwak of geen signaal Green (FAM) in positieve controle (PC)

- | | |
|--|--|
| a) Het gekozen fluorescentiekanaal voor de analyse van RT-PCR-gegevens voldoet niet aan het protocol. | Voor gegevensanalyse selecteert u het fluorescentiekanaal FAM (Groen) voor de analytische RT-PCR-doelen van SARS-CoV-2, het fluorescentiekanaal HEX/VIC/JOE (Geel) voor de bemonsteringscontrole en Cy5/Atto (Rood) voor de interne controle. |
| b) Temperatuurprofiel verkeerd geprogrammeerd. | Vergelijk het RT-PCR-programma met het protocol. |
| c) Onjuiste configuratie van de PCR-reactie | Controleer uw werkstappen aan de hand van het pipetteerschema en herhaal de PCR zo nodig. |
| d) De opslagomstandigheden voor één of meer componenten van de kit voldeden niet aan de instructies, of de uiterste gebruiksdatum van de <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit is verlopen. | Volg de opslagomstandigheden en verifieer de uiterste gebruiksdatum van de reagentia; neem indien nodig een nieuwe kit. |
| e) Verkeerde configuratie van het qPCR-platform tijdens de configuratie van de gegevens. | Pas de aanbevolen configuraties voor uw qPCR-platform zoals beschreven in deze handleiding toe. |
| f) De PCR werd geremd. | Volg de goede praktijken in het laboratorium voor moleculaire biologie om de introductie van verontreinigingen te vermijden. Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden. Volg het protocol dat in deze handleiding is vermeld. Controleer de uiterste gebruiksdatum van het reagens en gebruik indien nodig een nieuwe kit. Herhaal de assay met een ander monster. |

Signaal Green (FAM) in de controle zonder template of controle zonder extractie

Er vond verontreiniging in de SARS-CoV-2-sequenties plaats tijdens de voorbereiding van de RT-PCR-plaat.

Voer de RT-PCR opnieuw uit met nieuwe reagentia. Volg de goede praktijken in het laboratorium voor moleculaire biologie om de introductie van verontreinigingen te vermijden. Volg het protocol dat in deze handleiding is vermeld. Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden.

Opmerkingen en suggesties

Zwak of geen rood signaal (Cy5/Atto) van de interne controle



- a) Er is een storende stof geïntroduceerd in de RT-PCR-reactie. De PCR is geremd.
- Volg de goede praktijken in het laboratorium voor moleculaire biologie om de introductie van verontreinigingen te vermijden.
- Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden.
- Volg het protocol dat in deze handleiding is vermeld.
- Herhaal het experiment met een nieuw afgenomen monster.
- b) De interne controle is aangetast.
- Volg de goede praktijken in het laboratorium voor moleculaire biologie om de introductie van RNAsen te vermijden. Volg de aanbevelingen in deze handleiding.
- Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden.
- Volg de opslagomstandigheden en verifieer de uiterste gebruiksdatum van de reagentia; neem indien nodig een nieuwe kit.
- c) Verkeerde configuratie van het qPCR-platform tijdens de configuratie van de gegevens.
- Pas de aanbevolen configuraties voor uw qPCR-platform zoals beschreven in deze handleiding toe.

Zwak of geen geel signaal (VIC/HEX) van de bemonsteringscontrole

- a) Het klinische monster is aangetast.
- Volg de aanbevelingen van de leverancier van het afnamehulpmiddel voor hun opslag, hantering en transport.
- Volg het protocol in deze handleiding, met inbegrip van de stappen voor monsterbereiding met de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer.
- Volg de opslagomstandigheden en verifieer de uiterste gebruiksdatum van de reagentia, zoals de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer; gebruik indien nodig een nieuwe kit.
- b) Het specimen werd niet juist afgenomen. Er zijn niet voldoende menselijke cellen verzameld op het uitstrijkje of overgebracht naar de transportmedia.
- Volg de aanbevelingen van de leverancier van het afnamehulpmiddel voor de afname en hantering van het specimen.
- c) Verkeerde configuratie van het qPCR-platform tijdens de configuratie van de gegevens.
- Pas de configuraties voor uw qPCR-platform zoals beschreven in deze handleiding toe.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen in de gebruiksaanwijzing of op de verpakking en etiketten zijn weergegeven:

Symbol	Symbooldefinitie
	Bevat voldoende reagentia voor 768 of 3072 reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Componenten
	Bevat
	Nummer
	Global Trade Item Number
Rn	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing; 'n' is het revisienummer
	Temperatuurbeperving
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Verwijderd houden van zonlicht
	Waarschuwing/voorzichtig

Contactgegevens

Voor technische ondersteuning en meer informatie kunt u contact opnemen met de afdeling Technische Diensten van QIAGEN via **support.qiagen.com**.

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Voor 768 reacties: bereidingsbuffer, ROX-kleurstof, Master Mix, primers en probes, interne controle, water (NTC) en positieve controle	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Voor 3072 reacties: bereidingsbuffer, ROX-kleurstof, Master Mix, primers en probes, interne controle, water (NTC) en positieve controle	4511469
Instrumenten en accessoires		
PCR Tubes, 0.1 ml voor Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Voor gebruik met rotor met 72 putjes, stripbuisjes en doppen	981103
Rotor-Gene Q-software	Rotor-Gene Q-software v2.3.1 (of hoger)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen, uitsmeltanalysator met hoge resolutie, software, laptopcomputer en accessoires; 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie	9002032
Loading Block	72 x 0,1 ml buisjes	9018901

Raadpleeg de handleiding of gebruiksaanwijzing van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen en gebruiksaanwijzingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Revisiegeschiedenis van document

Revisie	Beschrijving
R1, april 2021	Eerste uitgave.
R2, juli 2021	<p>Claimuitbreiding: Test is opgesteld voor asymptomatische personen. Beoogd gebruik is bijgewerkt met personen zonder symptomen of met andere redenen om COVID-19-infectie te vermoeden. Paragraaf over Klinische prestaties met inbegrip van asymptomatische personen is toegevoegd aan Prestaties gegevens.</p> <p>Het tekstdeel 'De prestaties van deze test zijn niet vastgesteld voor patiënten zonder de symptomatologie van een luchtweginfectie' is verwijderd uit de paragraaf Beperkingen.</p> <p>Kleine opmaak- en indelingswijzigingen.</p>

Beperkte licentieovereenkomst voor de *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in het paneel bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van dit paneel te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij het paneel zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat dit paneel en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Dit paneel en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknaapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van het paneel gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen en niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met het paneel en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Kijk op www.qiagen.com voor actuele licentievoorwaarden.

Handelsmerken: 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); Zeptomatrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Excel® (Microsoft Corporation); ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific of diens dochterondernemingen). Geregistreerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, moeten altijd als wettelijk beschermd worden beschouwd, zelfs als ze niet specifiek als zodanig zijn aangegeven.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Bestellen www.qiagen.com/shop | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com