



Tammikuu 2022

# artus<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Prep&Amp<sup>™</sup> UM Kit -sarjan käyttöohje (käsikirja)



Versio 1



In vitro -diagnostiikkaan Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM-, ABI<sup>®</sup> 7500 Fast Dx-, QuantStudio<sup>®</sup> 5 Dx-, cobas<sup>®</sup> z 480- tai CFX96<sup>™</sup> Dx -laitteiden kanssa



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA

R5

## 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 ja välineet .....	12
Varoitukset ja varotoimet .....	14
Turvallisuustiedot .....	14
Varotoimet.....	15
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	16
Näytteiden kuljetus, säilytys ja käsittely .....	16
Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus RGQ MDx 5plex HRM -laitteella.....	18
Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus ABI 7500 Fast Dx - laitteella .....	24
Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus CFX96 Dx -laitteella.....	29
Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus cobas z 480 -laitteella ....	34

Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus QuantStudio 5 Dx - laitteella .....	39
Tulokset .....	44
Analyysi RGQ MDx 5plex HRM -laitteella.....	44
Analyysi ABI 7500 Fast Dx -laitteella .....	46
Analyysi CFX96 Dx -laitteella .....	46
Analyysi cobas z 480 -laitteella .....	48
Analyysi QuantStudio 5 Dx -laitteella .....	50
Tulosten tulkitseminen .....	51
Rajoitukset .....	54
Suorituskykyominaisuudet .....	55
Analyttinen herkkyys (havaitsemisraja).....	55
Analyttisen spesifisyyden tutkimukset (inklusiivisuus ja eksklusiivisuus/ ristireaktiiviteetti) .....	56
Tarkkuus.....	68
Kliininen suorituskyky .....	69
Lähdeviitteet.....	74
Vianmäärittämisopas .....	75
Symbolit .....	77
Yhteystiedot .....	79
Tilautustiedot .....	80
Asiakirjan muutoshistoria.....	81

# 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. Puhtaasta sylkinäytteestä tehty testi on tarkoitettu henkilöille, joilla on taudin merkkejä tai oireita tai joilla epäillään 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 RT-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 MDx System-, ABI 7500 Fast Dx-, QuantStudio 5 Dx-, cobas z 480- tai CFX96 Dx -laitetta 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 ylähengitystienäytteistä (näytepuikkonäyte nenästä, suunielusta ja nenänielusta) ja puhtaista sylkinäytteistä (3).

real-time RT-PCR -määrityksistä on tullut SARS-CoV-2-diagnosoinnin kultastandardi potilashistorian ja SARS-CoV-2-epidemiologian arvioinnin lisänä. Euroopan tautienehkäisy- ja valvontakeskus (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) on ehdottanut real-time RT-PCR:ään perustuvia määrityksiä yhdessä immuunimäärityksen kanssa infektioitan valvontaan ja epidemian hallintaan liittyvien rajoitustoimenpiteiden tehon arviointiin (4, 5).

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit on suunniteltu kattamaan kaksi N-geenin kohdetta (N1- ja N2-geenit), jotka havaitaan samalla fluoresenssikanavalla. Näitä kahta kohdetta ei erotella toisistaan, vaan fluoresenssisignaali syntyy kumman tahansa tai kummankin kohteen monistumisesta. Positiiviset tulokset viittaavat SARS-CoV-2-viruksen läsnäoloon mutta eivät sulje pois muiden patogeenien aiheuttamaa samanaikaista infektiota. Toisaalta negatiiviset real-time 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 real-time RT-PCR -menetelmällä RGQ MDx -järjestelmän tai ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- tai QuantStudio 5 Dx -laitteen 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-, CFX96 Dx-, cobas z 480- tai QuantStudio 5 Dx -laitteiden FAM-fluoresenssikanavalla.

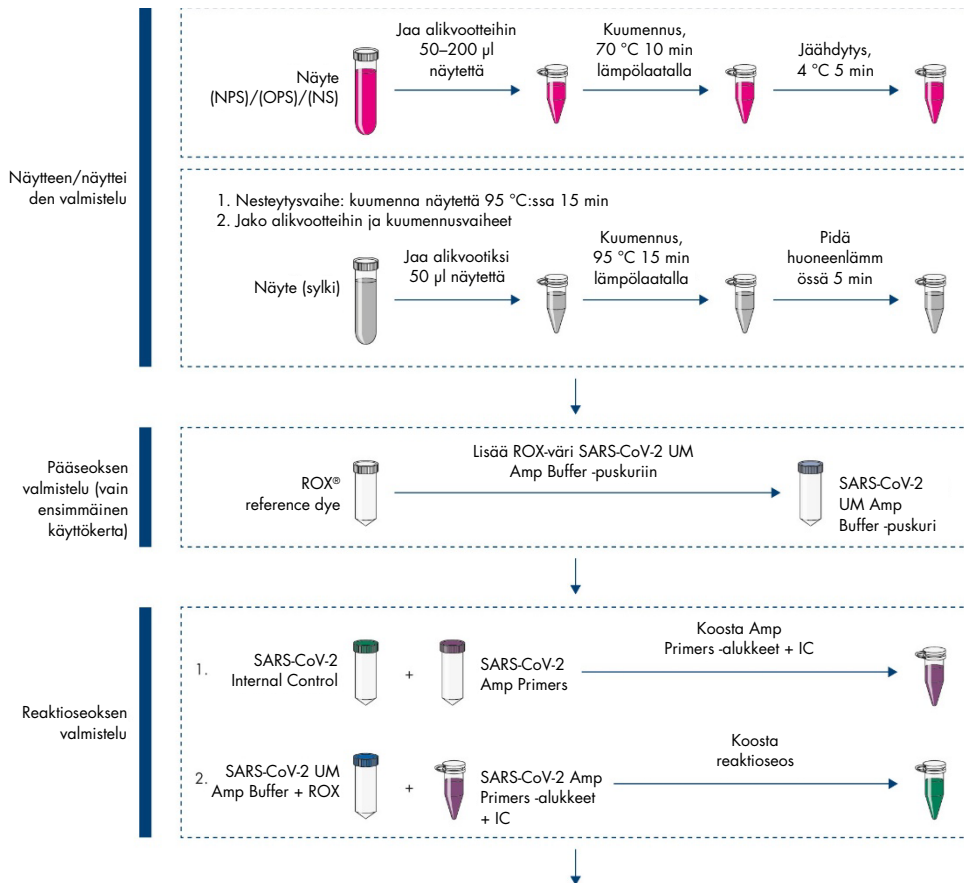
*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan Primers-alukeseokset ja Probes-koetinseokset sisältävät myös RNAasi P -monistukseen tarvittavat oligonukleotidit. Jos monistumista havaitaan RGQ MDx -laitteen Yellow-fluoresenssikanavalla tai ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- tai QuantStudio 5 Dx -laitteen VIC/HEX-kanavalla, biologista näytettä ei ole kerätty riittävästi. 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 real-time RT-PCR:n estäjä. Sen osoittaa sisäinen RNA-kontrolli (Internal Control, IC) RGQ MDx -laitteiden Red-fluoresenssikanavalla tai ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- tai QuantStudio 5 Dx -laitteiden Cy5/ATTO647N-kanavalla. Koska SARS-CoV-2 Amp Primers Mix -alukeseokseen kuuluu sisäinen kontrolli, sen monistuksen pitäisi olla tasainen, ellei näytteessä tai PCR-reaktiossa ole monistuksen estävää tai sitä viivästyttävää real-time RT-PCR:n 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.

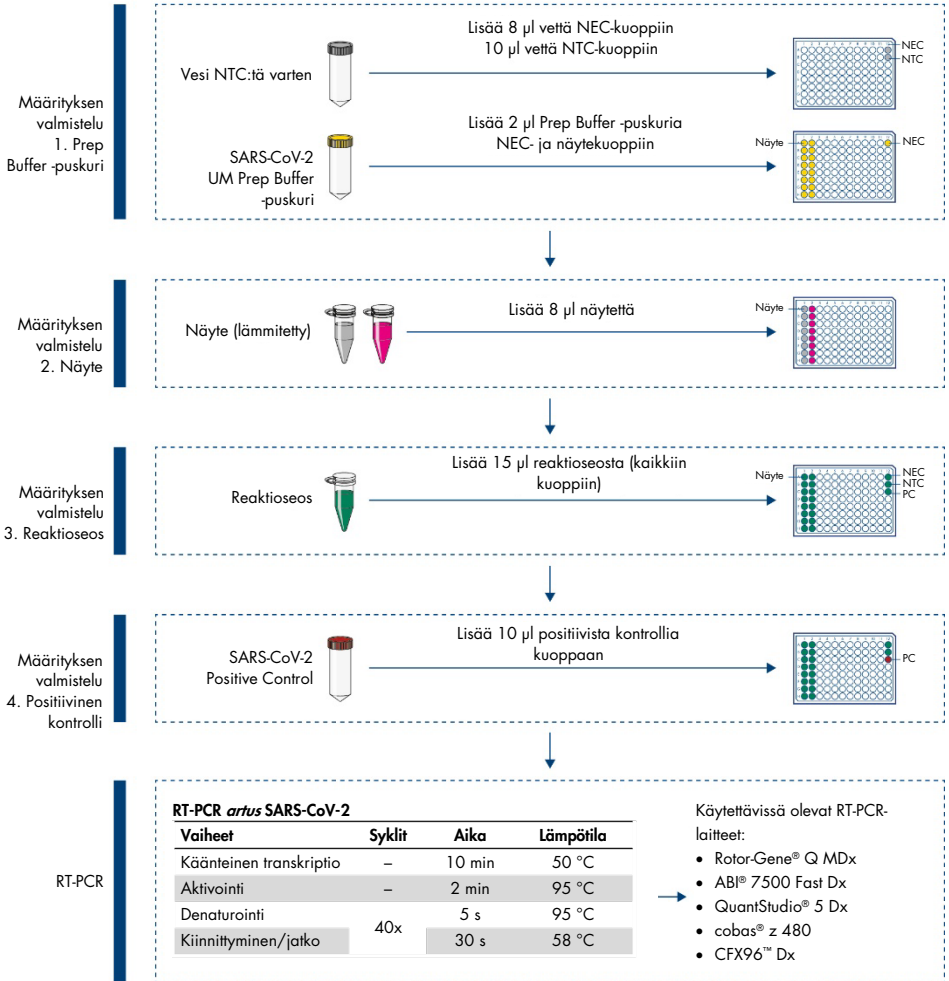
Eristämättömyyskontrollin käyttämistä (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria käytetään eristämättömyyskontrollina [No Extraction Control, NEC]) suositellaan voimakkaasti, jotta voidaan varmistaa, että valmistelupuskurissa ei ole real-time RT-PCR:n estäjiä.

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



(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

Reaktioiden määrä

4511460

768

4511469

3072

Putken väri	Kannen väri	Nimi	Putken tunnus	Määrä (µl)	Määrä (µl)
Kirkas	<b>Keltainen</b>	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri	<b>Preparation Buffer (Valmistelupuskuri)</b>	2 x 930	8 x 930
Kirkas	<b>Sininen</b>	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri	<b>Master Mix (Pääseos)</b>	4 x 1440	16 x 1440
Kirkas	<b>Violetti</b>	SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet	<b>Primers and Probes (Alukkeet ja koettimet)</b>	4 x 1680	16 x 1680
Kirkas	<b>Vihreä</b>	SARS-CoV-2 Internal Control	<b>Internal Control (IC) (Sisäinen kontrolli (IC))</b>	1 x 1390	4 x 1390
Kirkas	<b>Punainen</b>	SARS-CoV-2 Positive Control	<b>Positive Control (Positiivinen kontrolli)</b>	1 x 220	4 x 220
Kirkas	<b>Kirkas</b>	Water for NTC (NTC-vesi)	<b>Water (NTC) (Vesi [NTC])</b>	1 x 1900	4 x 1900
Kirkas	<b>Kirkas</b>	ROX Reference Dye -viiteväri	<b>ROX Dye (ROX-väri)</b>	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 real-time 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 kontaminantteja, 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 viidessä eri työnkulussa, joissa tarvitaan real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttäviä laitteita ja niihin kuuluvia ohjelmistoja:

- 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.
- CFX96 Dx ja CFX Manager Dx -ohjelmistoversio 3.1.3090.1022 tai uudempi
- cobas z 480 ja LightCycler® 480 SW UDF -versio 2.0.0 tai uudempi
- QuantStudio 5 Dx ja QuantStudio 5 Dx IVD -ohjelmistoversio 1.0.1 tai uudempi ja QuantStudio 5 Dx TD -ohjelmistoversio 1.0.1 tai uudempi.

# Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

## Tarvikkeet ja välineet

### Yleiset tarvikkeet ja välineet

- Pöytämallinen sentrifugi, jossa on roottori 2 ml:n reaktioputkille
- Pipettejä (säädettäviä)
- Vortex-sekoitin
- Laattalämmitin
- Kertakäyttöiset, puuterittomat käsineet
- Steriilejä ja nukleasittomia suodattimellisia pipettikärkiä
- 1,5 ml:n tai 2 ml:n putkia (ei PCR)
- 96-kuoppaiselle levyille sopiva sentrifugilaite

### Alustakohtaiset tarvikkeet ja välineet

#### **Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite**

- 0,1 ml:n PCR-putket käytettäväksi Rotor-Gene Q MDx -laitteessa (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, tuotenro 981103).
- 72-Well Rotor (tuotenro 9018903) ja Locking Ring 72-Well Rotor (tuotenro 9018904)

#### **ABI 7500 Fast Dx -laite**

- 96-kuoppainen MicroAmp™ (Thermo Fisher Scientific, tuotenro N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive -kalvo (Thermo Fisher Scientific, tuotenro 4360954)

### **CFX96 Dx -laite**

- 96-kuoppainen Hard-Shell®-PCR-levy, matala, ohutseinäinen, reunuksellinen, valkoinen/kirkas (Bio-Rad Laboratories Inc., tuotenro HSP9601)
- Microseal B -sinetöintikalvo PCR-levylle, liimautuva, optinen (Bio-Rad Laboratories Inc., tuotenro MSB1001).

### **cobas z 480 -laite**

- LightCycler 480 -monikuoppalevy, valkoinen (Roche Group, tuotenro 04729692001).
- LightCycler 480 -sinetöintikalvo (Roche Group, tuotenro 04729757001).

### **QuantStudio 5 Dx -laite**

- 96-kuoppainen, kirkas MicroAmp EnduraPlate™ Optical -reaktiolevy (Thermo Fisher Scientific, tuotenro A36924)
- MicroAmp Optical Adhesive -kalvo (Thermo Fisher Scientific, tuotenro 4360954)

# 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](http://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 vakimuotoisia laboratorio-ohjeita työalueen puhtaana ja kontaminoitumattomana pitämisestä. Osoita RNA:n käsittelylle erillinen alue välineineen.
- Vältä ristikontaminaatiota noudattamalla hyviä laboratoriokäytäntöjä.
- 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 viimeiseen käyttöpäivään asti.

## Näytteiden kuljetus, säilytys ja käsittely

*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit on tarkoitettu käytettäväksi nenänielu-, nenä- ja suunielunäytepuikkojen sekä puhtaiden sylkinäytteiden 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 laboratoriotokollista.

### Nenänielu-, nenä- ja suunielunäytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen

Katso tavarantoimittajan suositukset puikkonäytteiden ottamisesta, säilytyksestä ja kuljetuksesta. Puikot on upotettava kokonaan kuljetusaineeseen, jotta näyte on luotettava. Nenänielunäytteet pysyvät stabiileina ja niitä voidaan säilyttää

- 4 °C:ssa (2–8 °C:ssa) enintään 72 tuntia
- $-70$  °C:ssa kaksi viikkoa.

Nenänielunäytteet pysyvät stabiileina kolmen pakastus-sulatusjakson ajan.



## Puhtaiden sylkinäytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen

Puhtaat sylkinäytteet täytyy kerätä steriileihin astioihin ilman säilöntäaineita, puskureita tai muita lisäaineita.

Puhtaan syljen otto-ohjeet:

- Vältä yskimistä ennen puhtaan sylkinäytteen ottamista.
- Älä syö, juo, tupakoi, polta sähkötupakkaa, pureskele purukumia tai harjaa hampaita 30 minuuttiin ennen puhtaan sylkinäytteen ottamista.
- Hammastoimenpiteitä tai -tutkimuksia ei saa tehdä 24 tuntiin ennen puhtaan sylkinäytteen ottamista.

Puhtaat sylkinäytteet pysyvät stabiileina ja niitä voidaan säilyttää

- huoneenlämmössä (18–26 °C) enintään 72 tuntia
- 4 °C:ssa (2–8 °C:ssa) enintään 72 tuntia
- yhdistelmäsäilytyksessä ensin huoneenlämmössä, sitten 4 °C:ssa, sitten –20 °C:ssa (–30...–15 °C:ssa) enintään 12 vuorokautta
- –20 °C:ssa (–30...–15 °C:ssa) enintään 1 kuukauden.

Puhtaat sylkinäytteet pysyvät stabiileina kolmen pakastus-sulatusjakson ajan.

Jos näytteiden säilytysolosuhteet poikkeavat näistä ohjeista, huolehdi omien säilytysolosuhteidenne validoinnista.

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

Tässä protokollassa kuvataan, miten näytteet ja real-time RT-PCR valmistellaan, jotta SARS-CoV-2-kohteet voidaan tunnistaa ihmisen nenästä, nenänielusta ja suunielusta otetuista, kuljetusaineeseen säilytyistä puikkonäytteistä sekä puhtaista sylkinäytteistä RGQ MDx 5plex HRM real-time RT-PCR -laitteella ja Rotor-Gene Q -ohjelmistoversiolla 2.3.1.49 (tai uudemmalla).

## 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

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteet voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- 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. 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 (älä käytä vortex-laitetta) ja 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 RNAsit, mutta se ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän 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

**Näytteen valmistelu:** Noudata hengitystienäytteiden (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikkojen) käsittelyssä vaihetta 1. Siirry sylkinäytteiden käsittelyssä vaiheeseen 2.

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
  - 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. Sylkinäytteet:
  - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaite).
  - 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa.
  - 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
  - 2d. Lämmitä laattalämmittimellä 95 °C:ssa 15 minuuttia ja pidä sitten näytettä huoneenlämmössä ainakin 5 min ennen PCR-kuoppaan tai -putkeen lisäämistä.

3. Valmistele ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX Reference Dye -viitevärillä.
  - 3a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä yhteen SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
  - 3b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
  - 3c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
4. Valmistele täyttä RGQ MDx -levyä (72 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin alikvoottiseos.
  - 4a. 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.
  - 4b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
  - 4c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältävät SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet putken pohjalle.

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

Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	Reaktioiden lukumäärä	
			1 rxn	72 rxn (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	626,4
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopiota /µl	10 kopiota/µl	1,5	129,6
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos yhteensä			8,75	756

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

5. Valmista reaktioseos taulukon 2 mukaan ja sekoita perusteellisesti kääntämällä putki ylösalaisin kolme kertaa.

## Taulukko 2. Reaktioseoksen valmistelu

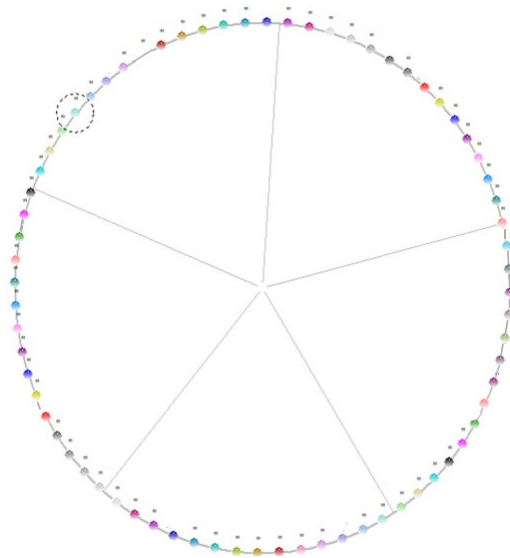
Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	Reaktioiden lukumäärä	
			1 rxn	Määrä (µl) 72 rxn (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX -seos	4x	1x	6,25	540
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos	2,9x	1x	8,75	756
Reaktioseoksen kokonaismäärä	–		15,00	1296

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

- Annostele 8 µl nukleasitonta vettä NEC-kontrollin PCR-putkeen.
- Lisää 10 µl nukleasitonta vettä NTC-kontrollin PCR-putkeen.
- Annostele 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria jokaiseen NEC-kontrollille ja valmistelluille näytteille määritettyyn PCR-putkeen.
- Lisää 8 µl valmisteltua näytettä PCR-putkeen, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 15 µl vaiheessa 5 valmisteltua 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.
- Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun PCR-putkeen. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Aseta RGQ MDx 5plex HRM -laitteen RT-PCR-ohjelma taulukon 3 ohjeiden mukaisesti.  
**Huomautus:** tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.
- 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, Yellow ja Red



- 1: PC
- 2: NTC
- 3: NEC
- 4: Näyte 1
- 5: Näyte 2
- 6: Näyte 3
- 7: ...

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

14. Valitse New Run Wizard (Ohjattu uusi ajo) -valintaikkunasta Gain Optimisation (Vahvistuksen optimointi) ja avaa Auto-Gain Optimisation Setup (Automaattisen vahvistuksen optimoinnin asetukset).
15. 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.

16. Valitse Perform optimization before the first acquisition (Suorita optimointi ennen ensimmäistä keruuta).
17. Aloita ajo.
18. 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 suunielusta otetuista, kuljetusaineessa säilytetyistä puikkonäytteistä sekä puhtaista sylkinäytteistä real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävän ABI 7500 Fast Dx -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 nukleasittomia muovitarvikkeita.
- ABI 7500 Fast Dx -laitetta käytettäessä ROX-väri on lisättävä pääseosputkeen ennen ensimmäistä käyttökertaa.

## Ennen kuin aloitat

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdystelinedessä.
- Sylkinäytteet voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdystelinedessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- 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. 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 (älä käytä vortex-laitetta) ja 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 ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän 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

**Näytteen valmistelu:** Noudata hengitystienäytteiden (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikkojen) käsittelyssä vaihetta 1. Siirry sylkinäytteiden käsittelyssä vaiheeseen 2.

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
  - 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.
  - 1d. Jäähdytä näytteitä jäällä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
  - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaite).
  - 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa
  - 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.

- 2d. Lämmitä laattalämmittimellä 95 °C:ssa 15 minuuttia ja pidä sitten näytettä huoneenlämmössä ainakin 5 min ennen PCR-kuoppaan tai -putkeen lisäämistä.
3. Valmistele ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX Reference Dye -viitevärillä.
- 3a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
- 3b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
- 3c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
4. Valmistele täyttä ABI 7500 Fast Dx -levyä (96 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja sisäisen SARS-CoV-2 Internal Control -kontrollin alikvoottiseos.
- 4a. Siirrä vaadittu määrä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäistä kontrollia taulukon 5 mukaan uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
- 4b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
- 4c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältäviä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita, jotta liuos laskeutuu putken pohjalle.

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

Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	Reaktioiden lukumäärä	
			1 rxn	96 rxn (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopiota /µl	10 kopiota/µl	1,5	172,8
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos yhteensä			8,75	1008

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

5. Valmista reaktioseos taulukon 6 mukaan ja sekoita perusteellisesti käänntämällä putki ylösalaisin kolme kertaa.

## Taulukko 6. Reaktioseoksen valmistelu

Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	Reaktioiden lukumäärä Määrä (µl)	
			1 rxn	96 rxn (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX -seos	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos	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.

- Annostele 8 µl nukleasitonta vettä NEC-kontrollin kuoppaan.
- Lisää 10 µl nukleasitonta vettä NTC-kontrollin kuoppaan.
- Annostele 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria sekä NEC-kontrollin että valmisteltujen näytteiden kuoppiin.
- Lisää 8 µl valmisteltua näytettä kuoppaan, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 15 µl vaiheessa 5 valmisteltua reaktioseosta näytteiden ja kontrollien kuoppiin (esimerkki kuvassa 3). Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun kuoppaan. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Sulje PCR-levy tiiviisti, jotta ristikontaminaatiota ei pääse tapahtumaan. Painele tasaisesti koko levyn alueelta, jotta myös kuoppien välit sulkeutuvat tiiviisti.
- Sentrifugoi PCR-levy lyhyesti, jotta neste laskeutuu kuoppien pohjalle.
- Valmistele real-time RT-PCR -menetelmän ohjelma ABI 7500 Fast Dx -laitteen Standard 7500 -ajotilassa taulukon 7 ohjeiden mukaan.

**Huomautus:** Kun olet napsauttanut kohtia **file** (tiedosto) ja **new** (uusi), varmista, että määrittäksenä on **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standardikäyrä [absoluuttinen kvantitointi]) ja ajotilana on **Standard 7500**. Valitse reportteriksi FAM, VIC ja Cy5 ja sammuttajaksi **None** (Ei mitään). Tietojen hankinnassa on oltava **ROX passive reference** (passiivinen viiteväri) -asetuksena.

**Huomautus:** tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

**Huomautus:** katso lisätietoja *ABI 7500 Fast Dx -käyttöohjeesta*.

15. Aseta levy reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen (esimerkki putkien asettelusta PCR-levyssä on kuvassa 3) käynnistä ohjelma taulukon 7 ohjeiden mukaisesti.
16. Valitse käytössä olevat kuopat ja käytä FAM-, VIC- ja Cy5-raportointeja. Tiedonkeruussa passiivisen ROX-värin asetuksen on oltava **ON** (Käytössä).
17. Tarkista, että ABI 7500 Fast Dx -laitteessa Standard Curve (Standardikäyry) -asetuksena on Absolute Quantitation (Absoluuttinen kvantitointi).
18. Aloita ajo.
19. 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		FAM, VIC ja Cy5

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

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

# Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus CFX96 Dx -laitteella

Tämä on protokolla SARS-CoV-2-kohteiden valmisteluun ja tunnistamiseen ihmisen nenästä, nenänielusta tai suunielusta otetuista, kuljetusaineessa säilytetyistä puikkonäytteistä sekä puhtaista sylkinäytteistä CFX96 Dx -laitteella (Bio-Rad Laboratories Inc., tuotenro 1845097-IVD [optinen reaktiomoduuli] ja 1841000-IVD [lämpöjaksotusmoduuli]) ja CFX Manager Dx -ohjelmistoversiolla 3.1.309001022 tai uudemmalla.

## 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

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteet voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- 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. 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 (älä käytä vortex-laitetta) ja 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 real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen PCR-levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja real-time RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

## Toimenpide:

Näytteen valmistelu: Noudata hengitystienäytteiden (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikkojen) käsittelyssä vaihetta 1. Siirry sylkinäytteiden käsittelyssä vaiheeseen 2.

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
  - 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.
  - 1d. Jäähdytä näytteitä jäillä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
  - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaitte).

- 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa.
- 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
- 2d. Lämmitä laattalämmittimellä 95 °C:ssa 15 minuuttia. Pidä näytettä sitten huoneenlämmössä ainakin 5 min ennen PCR-kuoppaan tai -putkeen lisäämistä.
3. Valmistele ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX Reference Dye -viitevärillä.
  - 3a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä yhteen SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
  - 3b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
  - 3c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
4. Valmistele täyttää CFX96 Dx -levy (96 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin alikvoottiseos.
  - 4a. Siirrä vaadittu määrä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäistä kontrollia taulukon 8 mukaan uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
  - 4b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
  - 4c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältäviä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita, jotta liuos laskeutuu putken pohjalle.

#### Taulukko 8. 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 (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopiota/ µl	10 kopiota/µl	1,5	172,8
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos yhteensä			8,75	1008

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

5. Valmista reaktioseos taulukon 9 mukaan ja sekoita perusteellisesti kääntämällä putki ylösalaisin kolme kertaa.

## Taulukko 9. 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 + ROX -seos	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos	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 määrät testattavien näytteiden määrän mukaan. Lisätilavuus kompensoi tyhjän tilavuuden.

- Annostele 8 µl nukleasitonta vettä NEC-kontrollin kuoppaan.
- Lisää 10 µl nukleasitonta vettä NTC-kontrollin kuoppaan.
- Annostele 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria sekä NEC-kontrollin että valmisteltujen näytteiden kuoppiin.
- Lisää 8 µl valmisteltua näytettä kuoppaan, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 15 µl vaiheessa 5 valmisteltua reaktioseosta näytteiden ja kontrollien kuoppiin (esimerkki kuvassa 4). Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun kuoppaan. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Sulje PCR-levy tiiviisti, jotta ristikontaminaatiota ei pääse tapahtumaan. Painele tasaisesti koko levyn alueelta, jotta myös kuoppien välit sulkeutuvat tiiviisti.
- Sentrifugoi PCR-levy lyhyesti, jotta neste laskeutuu kuoppien pohjalle.
- Valitse kohdassa CFX Manager Dx Software (CFX Manager Dx -ohjelmisto) > Startup Wizard (Ohjattu aloitustoiminto) run type (ajon tyyppi) -asetukseksi user defined (käyttäjän määrittämä).
- Protocol** (Protokolla) -välilehti: Määritä real-time RT-PCR:n ohjelma taulukon 10 mukaan 25 µl:n reaktiomäärälle.

**Huomautus:** napsauta **Protocol Editor** (Protokollan muokkaus) -ikkunassa **Step Options** (Vaiheen asetukset) -painiketta ja aseta muutosnopeudeksi 1,6 °C/s jokaiselle RT-PCR-ohjelman neljästä vaiheesta.

**Huomautus:** tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.



**Huomautus:** katso lisätietoja *CFX96 Dx -käyttöohjeesta*.

16. **Plate** (Levy) -välilehti: Valitse käytössä olevat kuopat ja käytä FAM-, HEX- ja Cy5-reporttereita.
17. Aseta levy reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen (esimerkki putkien asettelusta PCR-levyssä on kuvassa 4).
18. **Start Run** (Ajon aloittaminen) -välilehti: napsauta Start the run (Aloita ajo) -painiketta.
19. Analysoi tulokset ajon lopussa (katso kohta Results).

**Taulukko 10. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM -ohjelma CFX96 Dx -laitteella**

Vaiheet	Aika	Lämpötila (°C)	Muutosnopeus (°C/s)	Toistojen määrä	Keruu
1. Käänteinen transkriptio	10 min	50	1,6	1	Ei
2. PCR:n alun lämpöaktivointi	2 min	95	1,6	1	Ei
2-vaiheinen jaksotus				39*	
Denaturointi	5 s	95	1,6	1	Ei
Kiinnittyminen/laajeneminen	30 s	58	1,6	1	FAM, HEX ja Cy5

\* CFX toimii toistoperiaatteella. Jos ohjelmaan halutaan 40 jaksoa, kaksivaiheiseen jaksotukseen on asetettava 39 toistoa (ohjelmiston vaiheessa 5 "GOTO").

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

**Kuva 4. Esimerkki levyn asettelusta CFX96 Dx -laitteessa**

# Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus cobas z 480 -laitteella

Tässä protokollassa kuvataan, miten näytteet ja real-time RT-PCR valmistellaan, jotta SARS-CoV-2-kohteet voidaan tunnistaa ihmisen nenästä, nenänielusta ja suunielusta otetuista, kuljetusaineeseen säilytyistä puikkonäytteistä sekä puhtaista sylkinäytteistä cobas z 480 -laitteella ja LightCycler 480 SW UDF -versiolla 2.0.0 (tai uudemmalla).

## 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 nukleasittomia muovitarvikkeita.

## Ennen kuin aloitat

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteet voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- 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 suojaa 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 (älä käytä vortex-laitetta) ja 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 real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen real-time RT-PCR -levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja real-time RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

## Toimenpide:

Näytteen valmistelu: Noudata hengitystienäytteiden (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikkojen) käsittelyssä vaihetta 1. Siirry sylkinäytteiden käsittelyssä vaiheeseen 2.

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
  - 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.
  - 1d. Jäähdytä näytteitä jäällä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
  - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaite).
  - 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa.

- 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
- 2d. Lämmitä laattalämpimellä 95 °C:ssa 15 minuuttia ja pidä sitten näytettä huoneenlämmössä ainakin 5 min ennen PCR-kuoppaan tai -putkeen lisäämistä.
3. Valmistelee ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX Reference Dye -viitevärillä.
- 3a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä yhteen SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
- 3b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
- 3c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
4. Valmistelee täyttää cobas z 480 -levy (96 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin alikvoottiseos.
- 4a. Siirrä vaadittu määrä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäistä kontrollia taulukon 11 mukaan uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
- 4b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
- 4c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältäviä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita, jotta liuos laskeutuu putken pohjalle.

#### Taulukko 11. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seoksen valmistelu

Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	Reaktioiden lukumäärä Määrä (µl)	
			1 rxn	96 rxn (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopiota /µl	10 kopiota/µl	1,5	172,8
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos yhteensä			8,75	1008

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

5. Valmista reaktioseos taulukon 12 mukaan ja sekoita perusteellisesti käänntämällä putki ylösalaisin kolme kertaa.

## Taulukko 12. Reaktiioseoksen valmistelu

Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	Reaktioiden lukumäärä Määrä (µl)	
			1 rxn	96 rxn (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX -seos	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos	2,9x	1x	8,75	1008
Reaktiioseoksen kokonaismäärä	–		15,00	1728

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

- Annostele 8 µl nukleasitonta vettä NEC-kontrollin kuoppaan.
- Lisää 10 µl nukleasitonta vettä NTC-kontrollin kuoppaan.
- Annostele 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria sekä NEC-kontrollin että valmisteltujen näytteiden kuoppiin.
- Lisää 8 µl valmistettua näytettä kuoppaan, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 15 µl vaiheessa 5 valmistettua reaktiioseosta näytteiden ja kontrollien kuoppiin (esimerkki kuvassa 5). Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun kuoppaan. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Sulje PCR-levy tiiviisti, jotta ristikontaminaatiota ei pääse tapahtumaan. Painele tasaisesti koko levyn alueelta, jotta myös kuoppien välit sulkeutuvat tiiviisti.
- Sentrifugoi PCR-levy lyhyesti, jotta neste laskeutuu kuoppien pohjalle.
- Ensimmäinen käyttökerta:** Napsauta Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0 -ohjelmistossa **open tools** (avaa työkalut) -painiketta ja valitse **detection formats** (tunnistusmuodot) seuraavien heräte-emissioyhdistelmien mukaan: 465–510 (FAM), 540–580 (HEX) ja 610–670 (ATTO647N).

15. Määritä real-time RT-PCR:n ohjelma taulukon 13 mukaan 25 µl:n reaktiomäärälle.

**Huomautus:** valitse sivun yläreunasta **detection format** (tunnistusmuoto) ja vaiheessa 14 luotu tunnistusmuoto.

**Huomautus:** käytä real-time RT-PCR:n ohjelman jokaisessa viidessä vaiheessa mukautettua muutosnopeutta 1,6 °C/s.

**Huomautus:** tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

**Huomautus:** katso lisätietoja *cobas z 480 -käyttöohjeesta*.

16. Aseta levy reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen (esimerkki putkien asettelusta PCR-levyssä on kuvassa 5).

17. Aloita ajo.

18. Analysoi tulokset ajon lopussa (katso kohta Results).

**Taulukko 13. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM -ohjelma cobas z 480 -laitteella**

Vaiheet	Aika	Lämpötila (°C)	Muutosnopeus (°C/s)	Jaksojen määrä	Analyytitila
Käänteinen transkriptio	10 min	50	1,6	1	Ei mitään
PCR:n alun lämpöaktivointi	2 min	95	1,6	1	Ei mitään
2-vaiheinen jaksotus				40	Quantification (Kvantifiointi)
Denaturointi	5 s	95	1,6		None (Ei mitään)
Kiinnittyminen/laajeneminen	30 s	58	1,6		Single (Yksittäinen)
Jäähdytys	1 min	37	1,6	1	Ei mitään

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

**Kuva 5. Esimerkki levyn asettelusta cobas z 480 -laitteessa**

# Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus QuantStudio 5 Dx -laitteella

Tämä on protokolla SARS-CoV-2-kohteiden valmisteluun ja tunnistamiseen ihmisen nenästä, nenänielusta tai suuontelusta otetuista, kuljetusaineessa säilytetyistä puikkonäytteistä sekä puhtaista sylkinäytteistä real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävän QuantStudio 5 Dx -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.
- QuantStudio 5 Dx -laitetta käytettäessä ROX-väri on lisättävä pääseosputkeen ennen ensimmäistä käyttökertaa.

## Ennen kuin aloitat

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteitä voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- ROX-värin käyttö on pakollista QuantStudio 5 -laitetta käytettäessä.
- 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 15–25 °C:ssa. 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 (älä käytä vortex-laitetta) ja

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 ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen real-time RT-PCR -levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja real-time RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

## Toimenpide

**Näytteen valmistelu:** Noudata hengitystienäytteiden (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikkojen) käsittelyssä vaihetta 1. Siirry sylkinäytteiden käsittelyssä vaiheeseen 2.

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
  - 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.
  - 1d. Jäähdytä näytteitä jäillä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
  - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaite).
  - 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa.
  - 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
  - 2d. Lämmitä laattalämmittimellä 95 °C:ssa 15 minuuttia ja pidä sitten näytettä huoneenlämmössä ainakin 5 min ennen PCR-kuoppaan tai -putkeen lisäämistä.



3. Valmistele ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX Reference Dye -viitevärillä.
  - 3a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
  - 3b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
  - 3c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
4. Valmistele täyttää QuantStudio 5 Dx -levyä (96 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin alikvoottiseos.
  - 4a. Siirrä vaadittu määrä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäistä kontrollia taulukon 14 mukaan uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
  - 4b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
  - 4c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältäviä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita, jotta liuos laskeutuu putken pohjalle.

**Taulukko 14. 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 (+20 %:n lisätilavuus*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopiota /µl	10 kopiota/µl	1,5	172,8
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos yhteensä			8,75	1008

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

5. Valmista reaktioseos taulukon 15 mukaan ja sekoita perusteellisesti käntämällä putki ylösalaisin kolme kertaa.

## Taulukko 15. Reaktioseoksen valmistelu

Reagenssit	Varastopitoisuus	Lopullinen pitoisuus	1 rxn	Reaktioiden lukumäärä
				Määrä (µl)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX -seos	4x	1x	6,25	96 rxn (+20 %:n lisätilavuus*) 720
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seos	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 määrät testattavien näytteiden määrän mukaan. Lisätilavuus kompensoi tyhjän tilavuuden.

- Annostele 8 µl nukleasitonta vettä NEC-kontrollin kuoppaan.
- Lisää 10 µl nukleasitonta vettä NTC-kontrollin kuoppaan.
- Annostele 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria sekä NEC-kontrollin että valmisteltujen näytteiden kuoppiin.
- Lisää 8 µl valmisteltua näytettä kuoppaan, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 15 µl vaiheessa 5 valmisteltua reaktioseosta näytteiden ja kontrollien kuoppiin (esimerkki kuvassa 6). Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun kuoppaan. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Sulje PCR-levy tiiviisti, jotta ristikontaminaatiota ei pääse tapahtumaan. Painele tasaisesti koko levyn alueelta, jotta myös kuoppien välit sulkeutuvat tiiviisti.
- Sentrifugoi PCR-levy lyhyesti, jotta neste laskeutuu kuoppien pohjalle.
- Ensimmäinen käyttökerta:** Ennen kuin ajo voidaan aloittaa QuantStudio 5 Dx IVD -ohjelmistossa, QuantStudio 5 Dx TD -ohjelmistoversiolla 1.0.1 tai uudemmalla täytyy luoda malli ja se täytyy julkaista. Luo malli seuraavasti:  
Huomautus: määritä Properties (Ominaisuudet) -välilehdessä Experiment type (Koetyyppi) -asetukseksi Standard Curve (Standardikäyrä) ja Run mode (Ajojtila) -asetukseksi Standard (Vakio).

**Huomautus:** määritä **Method** (Menetelmä) -välilehdessä real-time RT-PCR:n ohjelma 25 µl:n reaktiomäärälle (Taulukko 16).

**Huomautus:** tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

**Huomautus:** Valitse **Plate** (Levy) -välilehdessä **Passive Reference** (Passiivinen viiteväri) -asetukseksi **ROX** ja määritä kohteiksi FAM, VIC ja Cy5 ilman sammuttajaa (valitse **None** [Ei mitään]).

**Huomautus:** katso lisätietoja *QuantStudio 5 Dx -käyttöohjeesta*.

15. Lataa QuantStudio 5 Dx IVD -ohjelmistossa malli, jonka loit aiemmin vaiheessa 14. Valitse käytössä olevat kuopat ja käytä FAM-, VIC- ja Cy5-kohteita.
16. Aseta levy reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen (esimerkki putkien asettelusta PCR-levyssä on kuvassa 6).
17. Aloita ajo.
18. Analysoi tulokset ajon lopussa (katso kohta Results).

**Taulukko 16. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM -ohjelma QuantStudio 5 Dx -laitteella**

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

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

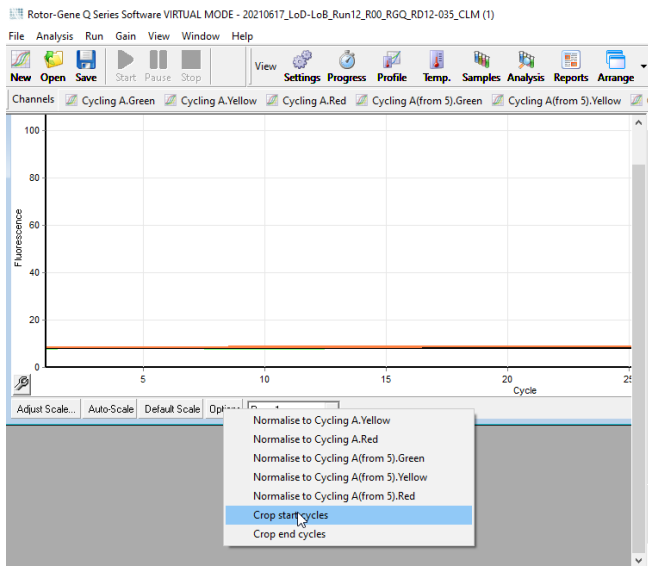
**Kuva 6. Esimerkki levyn asettelusta QuantStudio 5 Dx -laitteessa**

# Tulokset

## Analyysi RGQ MDx 5plex HRM -laitteella

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).

Tietojen analysoinnissa täytyy käyttää syklin rajausta (kuva 7): Avaa raakakanava **Cycling A.Green**. Siirry kohtaan Options (Asetukset) > **Crop Start Cycles** (Rajaa aloitussyklit) ja syötä valintaikkunaan luku **5**. Ohjelmisto luo uuden kanavan, jonka nimi on Cycling A(from 5).Green. Tee sama raakakanaville Red ja Yellow, niin saat kanavat **Cycling A(from 5).Red** ja **Cycling A(from 5).Yellow**.



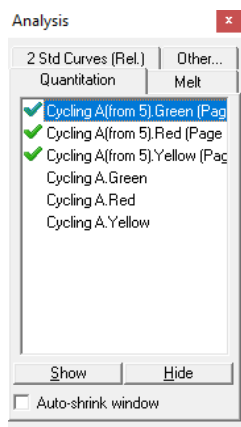
Kuva 7. Näyttökuva rajattujen syklien määrittämisestä RGQ MDx 5plex HRM -ajojen analysointiin

Avaa Analysis (Analyysi) -valikko (Kuva 8) ja säilytä eri analyysien välinen yhdenmukaisuus käyttämällä jokaiselle luodulle Cycling A(from 5) -kanavalle seuraavia testiparametreja (taulukko 17).

**Taulukko 17. 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 kynnsarvo	Kyllä Käytössä: 0 %	Ei	Kyllä Käytössä: -85%
Rajatut aloitusykyt	5	5	5
Katkaistut syklit	Ct > 38,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ei	Ct > 35,00 tulkitaan arvoksi 40,00

RGQ-ohjelmistossa ajon tulokset näkyvät analyysin aikana aukeavassa kvantitointitulosaulukossa. Tiedot voidaan viedä pilkulla erotettuna arvotekstinä csv-muodossa: Valitse RGQ-ohjelmiston ikkunassa **File** (Tiedosto) > **save as** (tallenna muodossa) > **Excel analysis sheet** (Excel-analyysitaulukko) Varmista, että kaikki näytteet ovat valittuina, ennen kuin viet tulokset (kuva 8).



**Kuva 8. Näyttökuva valituista kanavista testiparametrien käyttöön ja tulosten vientiin (RGQ MDx 5plex HRM -ojojen analysointi).**

## Analyysi ABI 7500 Fast Dx -laitteella

ABI 7500 Fast Dx -laitteessa tiedot analysoidaan 7500 Fast System Software -versiolla 1.4.1 (tai uudemmalla) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Valitse **setup** (valmistelu) -välilehdessä kuopparyhmä tai koko levy, jota analyysissä voidaan käyttää, ja avaa kuoppien tarkasteluikkunat napsauttamalla hiiren kakkospainiketta. Fluoresoivia aineita on valittava kolme (FAM, VIC ja Cy5) ja **Passive reference** (Passiivinen viiteväri) -asetukseksi on valittava **ROX**. Eri analyysien yhdenmukaisuus varmistetaan seuraavilla parametreilla (taulukko 18).

**Taulukko 18. ABI 7500 Fast Dx -laitteen testiparametrit**

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

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

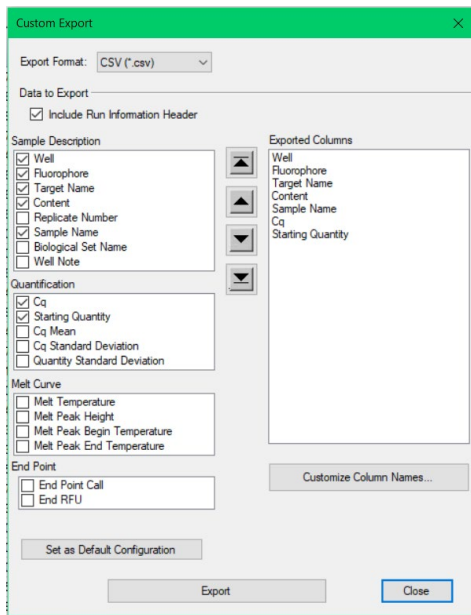
## Analyysi CFX96 Dx -laitteella

CFX96 Dx -laitteessa tiedot analysoidaan CFX Manager Dx -ohjelmistoversiolla 3.1.3090.1022 (tai uudemmalla) valmistajan ohjeiden mukaisesti. FAM, HEX ja Cy5 on valittava kaikille kokeessa käytettäville kuopille. Eri analyysien yhdenmukaisuus varmistetaan seuraavilla parametreilla (taulukko 19).

Taulukko 19. CFX96 Dx -laitteen testiparametrit

Kanavat	FAM	HEX	Cy5
Cq-määrittystila: yksittäinen raja-arvo	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Perustason asetukset:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>vähennetty käyrän sovitus</li> <li>Käytä fluoresenssiirtymän korjausta</li> </ul>	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Raja-arvo (RFU)	250	300	100
Katkaistut syklit	Ct > 39,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ct > 35,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ei

CFX Manager Dx -ohjelmistossa valitun kuopparyhmän tai koko levyn Ct-arvot (ohjelmistossa nimellä **Cq**) ovat saatavilla **Quantification Data** (Kvantifiointitiedot) -osion tietolehdessä. Tiedot voidaan viedä pilkulla erotettuna arvotekstinä (.csv-muodossa) määrittämällä kohdassa **Export** (Vie) > **Custom Export** (Mukautettu vienti) parametrien asetukset kuvan 9 mukaisesti.



Kuva 9. Raakadataviedoston parametrit CFX96 Dx -laitteessa

## Analyysi cobas z 480 -laitteella

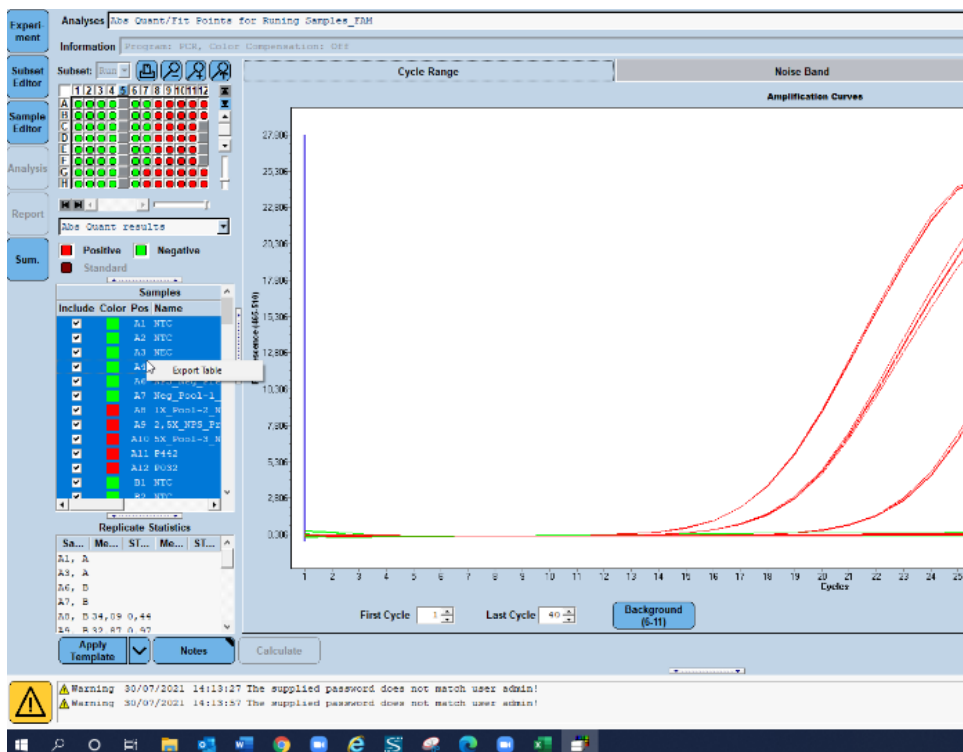
cobas z 480 -laitteessa tiedot analysoidaan LightCycler 480 SW UDF -versiolla 2.0.0 (tai uudemmallalla) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Luo näytteiden alijoukko kuopista, joita käytetään tässä kokeessa. Luo jokaiselle kanavalle **Abs Quant/Fit Points** -analyysisivu ja käytä seuraavia parametreja, jotta yhdenmukaisuus eri kokeiden välillä säilyy (taulukko 20).

**Taulukko 20. cobas z 480 -laitteen testiparametrit**

Kanavat	FAM (465–510)	HEX (540–580)	ATTO647N (610–670)
Cycle range (Sykialue) -välilehti			
• Ensimmäinen – viimeinen sykli	1–40	1–40	6–40
• Tausta	5/10	5/10	6/11
Noise band (Kohinaluokka) -välilehti			
• Menetelmä	STD-kerroin	STD-kerroin	STD-kerroin
• STD-kertoimen arvo	50	40	25
Analysis (Analyysi) -välilehti	2	2	2
• Sovituspisteet			
• Raja-arvomenetelmä	Automaattinen	Automaattinen	Automaattinen
<b>Katkaistu sykli</b>	Ct > 39,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ct > 35,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ei

LightCycler 480 SW UDF -versiossa 2.0.0 (tai uudemmassa) valitun kuopparyhmän tai koko levyn Ct-arvot (ohjelmistossa nimellä **Cp**) ovat saatavilla **analysis** (analyysi) -osiossa (kuva 10). Tiedot voi viedä tekstitiedostona (**.txt**-muodossa) kanavakohtaisesti napsauttamalla tulostaulukkoa hiiren kakkospainikkeella ja valitsemalla **Export table** (Vie taulukko) -vaihtoehdon.





Kuva 10. Näyttökuvaa viedyistä tiedoista LightCycler 480 SW UDF-versiossa 2.0.0 (tai uudemmassa).

## Analyysi QuantStudio 5 Dx -laitteella

QuantStudio 5 Dx -laitteessa tiedot analysoidaan QuantStudio 5 Dx IVD -ohjelmistoversiolla 1.0.1 (tai uudemmalla) valmistajan ohjeiden mukaisesti. **Assign Targets and Samples** (Määritä kohteet ja näytteet) -ikkunassa kaikille kokeessa käytettäville kuopille on valittava kolme fluoresoivaa ainetta (FAM, VIC ja Cy5) ja **Passive reference** (Passiivinen viiteväri) -asetukseksi on valittava **ROX**. Eri analyysien yhdenmukaisuus varmistetaan seuraavilla parametreilla (taulukko 21).

Taulukko 21. QuantStudio 5 Dx -laitteen testiparametrit

Kanavat	FAM	VIC	Cy5
Passiivinen väri	ROX	ROX	ROX
Fluoresenssikynnys	0,21	0,062	0,04
Perustaso	Automaattinen	Automaattinen	Automaattinen
Katkaistut sykli	Ct > 39,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ct > 35,00 tulkitaan arvoksi 40,00	Ei

Tiedot voidaan viedä laskentataulukkona tai tekstinä (.xls, .xlsx, .txt). Valitse QuantStudio 5 Dx IVD -ohjelmiston ikkunan **Export** (Vie) -välilehdessä kaikki **content** (sisältö) -osion vaihtoehdot ja sitten **unify the above content into one file** (yhdistä edellä valittu sisältö yhteen tiedostoon).

# Tulosten tulkitseminen

Positiivinen kontrolli (Positive Control, PC) sekä N1- ja N2-geenit havaitaan Green-fluoresenssikanavassa RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa tai FAM-fluoresenssikanavassa ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteessa.

Näytteenoton kontrolli, joka koostuu RNAasi P:stä, havaitaan Yellow-fluoresenssikanavassa RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa tai VIC/HEX-fluoresenssikanavassa ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteessa. Jokaisessa kliinisessä näytteessä pitäisi näkyä näytteen kontrollin monistuminen. Positiivisessa kontrollissa monistuminen Yellow-kanavassa voi näkyä, vaikka ihmisperäisiä sekvenssejä ei olisi. Tässä tapauksessa positiivisen kontrollin signaali Yellow-kanavassa voidaan jättää huomiotta, koska Green-kanavan vahva fluoresenssisignaali voi vuotaa Yellow-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/ATTO647N-fluoresenssikanavassa ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteessa. Jotta ajo real-time RT-PCR -menetelmällä on hyväksyttävä, PC-, NTC- ja NEC-kontrollien tulosten on oltava kuten taulukossa 22 ja taulukossa 23.

**Taulukko 22. Ajon kelvollisuuden kriteerit ja tulosten tulkitseminen RGQ MDx 5plex HRM -laitteella**

Kontrolli	Havainto Green-kanavalla	Havainto Yellow-kanavalla	Havainto Red-kanavalla	Tulkinta
<b>Positiivinen kontrolli (Positive Control, PC)</b>	Ct ≤ 38,00	Merkityksetön	Merkityksetön	PC on hyväksyttävä.
	Ct > 38,00 tai ei Ct:tä	Merkityksetön	Merkityksetön	PC ei ole hyväksyttävä.
<b>Malliton kontrolli (No Template Control, NTC) tai</b>	Ct > 38,00 tai ei Ct:tä	Ct > 35,00 tai ei Ct:tä	Kyllä	NTC/NEC on hyväksyttävä.
<b>eristämättömyyskontrolli (No Extraction Control, NEC)</b>	Mikä tahansa muu Green- tai Yellow-kanavan monistumisen yhdistelmä		Merkityksetön	NTC/NEC ei ole hyväksyttävä.

**Taulukko 23. Ajon kelvollisuuden kriteerit ja tulosten tulkitseminen real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävillä ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteilla**

Kontrolli	Havainto FAM-värissä*	Havainto VIC/HEX-värissä*	Havainto Cy5/ATTO647N-värissä*	Tulkinta
<b>Positiivinen kontrolli (Positive Control, PC)</b>	Ct ≤ 39,00	Merkityksetön	Merkityksetön	PC on hyväksyttävä.
	Ct > 39,00 tai ei Ct:tä	Merkityksetön	Merkityksetön	PC ei ole hyväksyttävä.
<b>Malliton kontrolli (No Template Control, NTC) tai eristämättömyyskontrolli (No Extraction Control, NEC)</b>	Ct > 39,00 tai ei Ct:tä	Ct > 35,00 tai ei Ct:tä	Kyllä	NTC/NEC on hyväksyttävä.
	Mikä tahansa muu FAM- tai VIC/HEX-kanavan monistumisen yhdistelmä		Merkityksetön	NTC/NEC ei ole hyväksyttävä.

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

**Taulukko 24. 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. Real-time RT-PCR -reaktio on estynyt. Testi on tehtävä uudelleen.

**Taulukko 25. Näytteen kelvollisuuden kriteerit ja tulosten tulkitseminen real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävillä ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteilla.**

Havainto FAM-värisssä*	Havainto VIC/HEX-värisssä*	Havainto Cy5/ATTO647N-värisssä*	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. Real-time RT-PCR -reaktio on estynyt. Testi on tehtävä uudelleen.

# Rajoitukset

- Vain *in vitro* -diagnoosiin.
- *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* -diagnoosiin toimenpiteisiin.
- Hyvät PCR-tulokset edellyttävät real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävän alustan käyttöoppaan (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ja QuantStudio 5 Dx) tarkkaa noudattamista.
- Kaikkien komponenttien pakkauksiin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.
- Tämän testin toimivuutta sellaisten potilaiden sylkinäytteillä, joilla ei ole hengitystieinfektion merkkejä tai oireita, ei ole määritetty.
- Virheellisesti negatiivisen tuloksen riskin välttämiseksi on kirjattava ylös, jos heikosti positiivista kliinistä näytettä testataan ja putkessa havaitaan verijäämiä, ja jos näytteestä saadaan negatiivinen tulos *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjalla, potilaalta on otettava uusi näyte uutta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -testiä varten.

# Suorituskykyominaisuudet

## Analyttinen herkkyys (havaitsemiss raja)

Analyttinen herkkyys eli havaitsemiss raja määritetään pienimmäksi pitoisuudeksi, jossa testatuista näytteistä  $\geq 95\%$  tuottaa positiivisen tunnistuksen. Havaitsemiss raja (Limit of Detection, LoD) arvioitiin analysoimalla sarjalaimennokset negatiivisista nenänielunäytteistä ja nesteytetyistä puhtaista sylkinäytteistä, jotka oli valmisteltu kaupallisilta hankkijoilta (ZeptoMetrix®) hankituista korkean titterin varastoiduista, inaktivoituista viruspartikkeleista. Jokaiselle näytteelle käytettiin kahta näytepoolia LoD-tutkimuksissa. Jotta aikaansaatu LoD-pitoisuus olisi vahvistettu, kaikkien replikaattien havaitsemissasteen on oltava  $\geq 95\%$  (vähintään 19/20 replikaatin on luotava positiivinen signaali).

LoD-pitoisuus vahvistettiin nenänielunäytteille ja puhtaille sylkinäytteille ilmoitetuilla real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävillä alustoilla (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx ja cobas z 480).

### Nenä-, suunielu- ja nenänielunäytteet

LoD-pitoisuudeksi on ilmoitettu 950 cp/ml RGQ MDx-, ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx- ja QuantStudio 5 Dx -laitteilla ja 475 cp/ml cobas z 480 -laitteella (katso taulukko 26).

### Puhtaat sylkinäytteet

LoD-pitoisuudeksi on ilmoitettu 950 cp/ml RGQ MDx -laitteella ja 1 200 cp/ml ABI 7500 Fast Dx-, cobas z 480-, QuantStudio 5 Dx- ja CFX96 Dx -laitteilla (katso taulukko 26).

Taulukko 26. Yhteenveto LoD-tuloksista real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävillä alustoilla

Alusta	Näytetyyppi	Vahvistettu LoD (cp/ml)
RGQ MDx	NPS	950
	Puhdas sylki	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Puhdas sylki	1 200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Puhdas sylki	1 200
cobas z 480	NPS	475
	Puhdas sylki	1 200
CFX96 Dx	NPS	950
	Puhdas sylki	1 200

## Analyttisen spesifisyyden tutkimukset (inkluusiivisuus ja eksklusiivisuus/ristireaktiviteetti)

### Inkluusiivisuus

*artus* SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja Probes-koetinten inkluusiivisuus arvioitiin GISAID-tietokannassa ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)) saatavilla olevien sekvenssien *in silico* -analyysin avulla. Yhteensä 722 488 sekvenssiä (saatavilla 23/03/2021) analysoitiin COVID CG -työkälulla (<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 alukset ja koettimet määrittivät. Tunnistettujen SNV-variaatioiden esiintyvyys 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 patogeeneiden 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-määrittymisen 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 bakteeri-, virus- ja sienikantaa (taulukko 27) 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*. Taulukossa 27 esitetään luettelo *in silico* -testatuista patogeeneistä.

**Taulukko 27. Luettelo *in silico* -testatuista patogeeneistä.**

Patogeenit	Kanta/tyyppi	Taksonominen tunnus	<i>In silico</i> -PCR-tulokset
Adenovirus 3	Tyyppi 3	45659	Ei vastaavuutta
Adenovirus 4	Tyyppi 4	28280	Ei vastaavuutta
Adenovirus 5	Tyyppi 5	28285	Ei vastaavuutta
Adenovirus 7A	Tyyppi 7A	85755	Ei vastaavuutta
Adenovirus 14	Tyyppi 14	10521	Ei vastaavuutta
Adenovirus 31	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 27. (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 synsytiaalivirus	Tyyppi A (RSV-A)	208893	Ei vastaavuutta
Respiratorinen synsytiaalivirus	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 mikrobiaalinen häiriönkesto testattiin *in vitro* suositelluista patogeeneistä muodostetulla paneelilla (taulukko 28). 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  $2,87 \times \text{LoD}$  inaktivoituja SARS-CoV-2-partikkeleita (Zeptomatrix). NATrol™-paneelit ja SARS-CoV-1 lisättiin suoraan yhdessä inaktivoitujen SARS-CoV-2-viruspartikkelien (Zeptomatrix) kanssa pitoisuudella  $2,87 \times \text{LoD}$ . Alla on yhteenveto kaikista testatuista mikro-organisimiyhdistelmistä ja niiden pitoisuuksista.

Taulukossa 28 on luettelo mikrobiaalisen häiriön tutkimuksessa testatuista patogeeneistä.

**Taulukko 28. Luettelo mikrobiaalisen häiriön tutkimuksessa *in vitro* -testatuista patogeeneistä.**

Yhdistelmän tunnus/näytetunnus	Mikro-organismi	Lähde	Lopullinen pitoisuus	Yksikkö	Tulos
	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	
	Ihmissen koronavirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
Yhdistelmä 1	Ihmissen koronavirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/ml	Ei häiriötä
	Ihmissen koronavirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID50/ml	
	Adenovirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Parainfluensavirus 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID50/ml	

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 28 (jatkuu edelliseltä sivulta)

Yhdistelmän tunnus/näytetunnus	Mikro-organismi	Lähde	Lopullinen pitoisuus	Yksikkö	Tulos
Yhdistelmä 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Adenovirus T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/ml	
	Parainfluenssavirus 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/ml	
	Influenssa B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Rinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Yhdistelmä 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Parainfluenssavirus 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	

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 28 (jatkuu edelliseltä sivulta)

Yhdistelmän tunnus/näytteenunus	Mikro-organismi	Lähde	Lopullinen pitoisuus	Yksikkö	Tulos
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 synsytiaalivirus tyyppi B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	
Yhdistelmä 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ei häiriötä
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	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  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 *	–	Ei häiriötä

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 28 (jatkuu edelliseltä sivulta)

Yhdistelmän tunnus/näytetunnus	Mikro-organismi	Lähde	Lopullinen pitoisuus	Yksikkö	Tulos
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, koronavirukset (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

### Nenä-, suunielu- ja nenänielunäytteet

Luultujen häiritsevien aineiden (taulukossa 29 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). Green- ja Red-fluoresenssikanavien osumatarkkuutta verrattiin testien välillä sekä vastaaviin kontrollinäytteisiin. Jos häiriötä ei ollut, testin ja sitä vastaavan kontrollinäytteen osumatarkkuus on sama.

Taulukossa 29 näkyy, että mikään testatuista aineista ei aiheuttanut häiriötä *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskykyyn Green-fluoresenssikanavassa.

**Taulukko 29. Luettelo häiritsevistä aineista ja Green-kanavan osumatarkkuuksista.**

Häiritsevät aineet	Toiminto	Testattu pitoisuus	Osumatarkkuustulokset negatiivisissa nenänielunäytepuikkonäytteissä	Osumatarkkuustulokset positiivisissa (4 x LoD) nenänielunäytepuikkonäytteissä
Tobramysiini	Systeeminen antibiootti	1 mg/ml	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 15/15
Mupirosiini	Nenän kautta annettava antibioottinen voide	6,6 mg/ml	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 15/15
Flutikasoni	Nenän kautta annettavat kortikosteroidit	5 % (v/v)	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 15/15
Mentoli (imeskeltävä)	Suun kautta annettavat puuduttavat ja analgeettiset aineet	0,5 mg/ml	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 15/15
Oksimetatsoliini	Nenäsuihke	10 % (v/v)	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 15/15
Oseltamiviiri	Viruslääke	3,3 mg/ml	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 15/15
Musiini (naudan leuanalussylikirauhanen tyyppi I-S)		2,5 mg/ml	Ei häiriötä 0/15	Ei häiriötä 15/15
Kokoveri		4 % (v/v)	Ei häiriötä 1/15*	Ei häiriötä 15/15

\* Artefaktia vastaava monistuminen havaittiin.

## Puhtaat sylkinäytteet

Kahdeksan luullun häiritsevän aineen (taulukossa 30 Taulukko 30 mainitut aineet) vaikutus *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskykyyn arvioitiin. Testeissä käytettiin yhtä negatiivisten puhtaiden sylkinäytteiden poolia, joka jaettiin kahteen osaan kahden eri laimennustason testaamista varten: (1) negatiiviset puhtaat sylkinäytteet ja (2) keinotekoisesti positiiviset puhtaat sylkinäytteet (negatiiviseen pooliin lisätty 3-kertainen LoD-pitoisuus [3 600 cp/ml] inaktivoituja SARS-CoV-2-viruspartikkeleita [Zeptometrix]). Kolme käyttäjää testasi puhtaat sylkinäytteet cobas z 480 -alustalla ja yhdellä kaupallisesti saatavilla olevalla sarjalla.

Jokaista häiritsevää ainetta kohden näytteen replikaatit jaettiin kahtia ja näillä osilla testattiin joko liuottimeen (testinäyte) liuenneita häiritseviä aineita tai pelkästään liuotinta (kontrollinäyte). Green-, Red- ja Yellow-fluoresenssikanavien osumatarkkuutta verrattiin testien välillä sekä vastaaviin kontrollinäytteisiin. Jos häiriötä ei ollut, testin ja sitä vastaavan kontrollinäytteen osumatarkkuus on sama.

Kvalitatiivisen (näytteen tilan) analyysin osalta kahdeksalla testatulla häiritsevällä aineella (katso taulukko 30) ei ole vaikutusta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan tuloksiin positiivisia ja negatiivisia sylkinäytteitä testattaessa.

Taulukossa 30 näkyy, että mikään testatuista aineista ei aiheuttanut häiriötä *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskykyyn Green-fluoresenssikanavassa.



Taulukko 30. Luettelo häiritsevästä aineista ja Green-kanavan osumatarkkuuksista.

Häiritsevä aine*	Toiminto	Testattu pitoisuus	Osumatarkkuustulokset negatiivisissa puhtaissa sylkinäytteissä	Osumatarkkuustulokset positiivisissa (3–5x LoD) puhtaissa sylkinäytteissä
<b>Kokoveri</b>	Endogeeninen aine: ihmisen gDNA, leukosyytit, erytrosyytit	1 % v/v	Ei häiriötä* 0/8	Ei häiriötä* 8/8
<b>Altoids®</b>	Makeinen	2 % w/v	Ei häiriötä 0/8	Ei häiriötä 8/8
<b>Aspiriini</b>	Tulehduslääke	1 % w/v	Ei häiriötä 0/8	Ei häiriötä 8/8
<b>Listerine®</b>	Antiseptinen suuvesi	1 % v/v	Ei häiriötä 0/8	Ei häiriötä 8/8
<b>Ricola®</b>	Makeinen	1 % w/v	Ei häiriötä 0/8	Ei häiriötä 8/8
<b>Colgate® Total SF Whitening™ Toothpaste</b>	Hampaita valkaiseva hammastahna	0,1% w/v	Ei häiriötä 0/8	Ei häiriötä 8/8
<b>Tussidane® Sirop</b>	Lääke kuivaan yskään	1 % v/v	Ei häiriötä 0/8	Ei häiriötä 8/8
<b>Pulmofluide®</b>	Lääke limaiseen yskään	1 % v/v	Ei häiriötä 0/8	Ei häiriötä 8/8

\* Kokoveren kohdalla häiritsevä vaikutus havaittiin Red-kanavan IC-tunnistuksessa (10–40 %:n esto), mutta sillä ei ollut vaikutusta näytteen kelvollisuuteen. Green-kanavassa kokoveri ei vaikuttanut näytteen tilaan, mutta pieni Ct-siirtymä havaittiin (keskimäärin 1,35 Ct myöhemmin kokoveren kanssa verrattuna kontrollinäytteeseen).

Virheellisesti negatiivisen tuloksen riskin välttämiseksi on kirjattava ylös, jos heikosti positiivista kliinistä näytettä testataan ja putkessa havaitaan verijäämiä, ja jos näytteestä saadaan negatiivinen tulos *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjalla, potilaalta on otettava uusi puhdas sylkinäyte ja se on testattava uudella *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjalla.

## Näytteen stabiiliustutkimus

Näytteen stabiiliustutkimuksessa arvioitiin näytteiden erilaisten säilytysolosuhteiden vaikutus *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjojen kvalitatiivisiin (osumatarkkuusanalyysi) ja kvantitatiivisiin (Ct-siirtymäanalyysi) tuloksiin. Kokeet tehtiin analysoimalla kaksi laimennustasoa: (1) negatiiviset näytteet ja (2) keinotekoisesti positiiviset näytteet, joihin on lisätty inaktivoituja SARS-CoV-2-viruspartikkeleita (Zeptomatrix). Näytteiden (sylki- ja NPS-näytteet) stabiiliuden varmistamiseksi vaadittiin, että  $\geq 95$  % replikaateista antoi saman osumatarkkuuden ja Ct-siirtymä oli  $\leq 10$  %:n ajankohtaan 0 nähden kaikissa stabiiliusolosuhteissa.

### Nenä-, suunielu- ja nenänielunäytteet:

Testatut stabiiliusolosuhteet luetellaan taulukossa 31. Testeissä käytettiin kolmea näytepoolia. ABI 7500 Fast Dx -alustalla testattiin negatiivisia NPS-näytteitä, keinotekoisesti positiivisia 5-kertaisen LoD:n (4 750 cp/ml) NPS-näytteitä sekä kolme erää myyntiin vapautettujen erien näytteitä BRS1 (N2-ketju, 1 000 cp / 10  $\mu$ l), BRS2 (RNAasi P -gblock, 1 000 cp / 10  $\mu$ l) ja BRS3 (N1-ketju, 1 000 cp / 10  $\mu$ l).

Kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen analyysin tuloksissa NPS-näytteiden testatuilla säilytysolosuhteilla ei ollut vaikutusta osumatarkkuuteen (odotettu tila havaittiin) eivätkä ne aiheuttaneet merkitseviä Ct-siirtymiä *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan tuloksiin. Näin ollen sarjan suorituskyky pysyi stabiilina NPS-näytteiden testattujen säilytysolosuhteiden eroista huolimatta (katso taulukko 31).

Taulukossa 31 esitetään nenänielunäytteiden stabiiliusolosuhteet.

### Taulukko 31. Nenänielunäytteiden stabiiliusolosuhteet.

Olosuhteet	Näytteen ilmoitettu stabiilius
Pakastus/sulatus	3 pakastusta/sulatusta
4 °C (2 °C – 8 °C)	72 h
-70 °C	2 viikkoa

### Puhtaat sylkinäytteet

Testatut stabiiliusolosuhteet luetellaan taulukossa 32. Testeissä käytettiin kahta näytepoolia. ABI 7500 Fast Dx -alustalla testattiin negatiivisia puhtaita sylkinäytteitä ja keinotekoisesti positiivisia 3-kertaisen LoD:n (3 600 cp/ml) puhtaita sylkinäytteitä.

Kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen analyysin tuloksissa testatuilla säilytysolosuhteilla ei ollut vaikutusta osumatarkkuuteen (odotettu tila havaittiin) eivätkä ne aiheuttaneet merkitseviä Ct-siirtymiä *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* -sarjan tuloksiin. Näin ollen sarjan suorituskyky pysyi stabiilina puhtaiden sylkinäytteiden testattujen säilytysolosuhteiden eroista huolimatta.

Taulukossa 32 esitetään puhtaiden sylkinäytteiden stabiiliusolosuhteet.

### Taulukko 32. Puhtaiden sylkinäytteiden stabiiliusolosuhteet

Olosuhteet	Näytteen ilmoitettu stabiilius
Pakastus/sulatus	3 pakastusta/sulatusta
Huoneenlämpö (18 °C – 26 °C)	72 h
4 °C (2 °C – 8 °C)	72 h
Olosuhteiden yhdistelmä: 6 h huoneenlämmössä ja 72 h 4 °C:ssa (2 °C – 8 °C) ja 8 vuorokautta -20 °C:ssa (-30 °C ... -15 °C)	6 h huoneenlämmössä ja sitten 72 h 4 °C:ssa (2 °C – 8 °C) ja sitten 7 vuorokautta -20 °C:ssa (-30 °C ... -15 °C)
-20 °C (-30 °C ... -15 °C)	1 kuukausi (30,5 vrk)

## 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 negatiivisille nenänielunäytteille, joihin oli lisätty 5 x LoD, ja ajot tehtiin RGQ MDx -laitteella.

Jokaisesta laimennuspitoisuudesta kerättiin 204 tietopistettä. Toistettavuus- ja uusittavuustietoja käyttiin keskihajonnan (Standard Deviation, SD) sekä variaatiokerroimen (Coefficient of Variation, %CV) määrittämiseen SARS-CoV-2-kohteille Green-, Yellow- ja Red-kanavissa. Taulukko 33 osoittaa, että *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan yleinen tarkkuus on 0,63 SD (2,03 %CV) Green-kanavassa, 0,54 SD (2,22 %CV) Yellow-kanavassa ja 1,28 SD (4,10 %CV) Red-kanavassa.

**Taulukko 33. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan keskihajonta ja variaatiokerroin.**

	Yhteensä	Päivien välillä	Erien välillä	Käyttäjien välillä	Laitteiden välillä	Ajojen välillä	Ajon sisällä
<b>Näytteet ja havainnointikanava</b>	<b>Keskihajonta (SD) (Variaatiokerroin [%CV])</b>						
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

## Nenänielunäytteet

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp -määrityksen kliininen suorituskyky arvioitiin käyttämällä kuljetusaineeseen säilötyjä, puikolla otettuja retrospektiivisiä nenänielunäytteitä, joihin kuului 150 kliinistä 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. Taulukossa 34 on tiedot artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskyvystä verrattuna vertailumenetelmään.

**Taulukko 34. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky verrattuna vertailumenetelmään.**

Näytteen tila	N	Positiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	–
Negatiivinen	98	5,1 (5/98)	–	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 35.

**Taulukko 35. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky ristiriitaisen tulosten analysoinnin jälkeen.**

Näytteen tila	N	Positiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	–
Negatiivinen	98	5,1 (5/98)	–	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):  $51/52 = \mathbf{98,1\%}$  (95 %:n CI: 89,9–99,7 %)

Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

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

### [Nenänielunäytepuikot, mukaan lukien oireettomat henkilöt](#)

*artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp -määrityksen kliininen suorituskyky arvioitiin käyttämällä kuljetusaineeseen säilötyjä, puikolla otettuja retrospektiivisiä nenänielunäytteitä, joihin kuului 153 kliinistä 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 23).

Taulukossa 36 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 36. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky verrattuna vertailumenetelmään**

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

19 ristiriitaista tulosta arvioitiin kolmannella menetelmällä ja analysoitiin uudelleen yhtäpitävyydestaulukon 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 37.

**Taulukko 37. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky ristiriitaisen tulosten analysoinnin jälkeen**

Näytteen tila	N	Positiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0 (0/32)	–
Negatiivinen	105	0,95 (1/105)	–	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 %)

## Puhtaat sylkinäytteet

*artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp -määrityksen kliininen suorituskyky arvioitiin käyttämällä puhtaita sylkinäytteitä, joihin kuului 142 sylkinäytettä.

Kaikki näytteet kerättiin potilailta, joilla oli COVID-19-infektion merkkejä ja oireita. Kliininen kelpoisuus testattiin ABI 7500 Fast Dx -laitteella. 12 näytettä jätettiin analyysin ulkopuolelle *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan testauksen ja vertailumenetelmän jälkeen, sillä kumpikin testi antoi kelvottoman tilan näytteen kelvollisuuskriteerien mukaan.

Taulukossa 38 on tiedot *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskyvystä verrattuna vertailumenetelmään.

**Taulukko 38. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky verrattuna vertailumenetelmään.**

Näytteen tila	N	Positiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosenttiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	45	93,33 (42/45)	82,14–97,71	6,67 (3/45)	–
Negatiivinen	85	0 (0/85)	–	100 (85/85)	95,68–100,00

Kolme 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 39.

**Taulukko 39. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kliininen suorituskyky ristiriitaisen tulosten analysoinnin jälkeen.**



Näytteen tila	N	Positiivisten prosentiosuus	95 %:n CI	Negatiivisten prosentiosuus	95 %:n CI
Positiivinen	43	97,67 (42/43)	87,94–99,59	2,32 (1/43)	–
Negatiivinen	87	0 (0/87)	–	100 (87/87)	95,77–100,00

Kaksi virheellisesti negatiivista tulosta luokiteltiin uudelleen todellisiksi negatiivisiksi, ja yksi virheellisesti negatiivinen tulos pysyi virheellisesti negatiivisena.

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):  $42/43 = 97,67\%$  (95 %:n CI: 87,94–99,59 %)

Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

(Negative Percent Agreement, NPA):  $87/87 = 100,00\%$  (95 %:n CI: 95,77–100,00 %)

# 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](http://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 (Green) RT-PCR-analyysin SARS-CoV-2-kohteille, fluoresenssikanava HEX/VIC/JOE (Yellow) näytteen kontrollille ja Cy5/Atto (Red) 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) Real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävä alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa.   | Käytä tässä oppaassa suositeltua, käyttämäsi real-time RT-PCR -tekniikan alustaa koskevaa konfiguraatiota.   |
| f) PCR inhiboitu.   | 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 Red-signaali (Cy5/Atto) on heikko tai sitä ei ole











- a) RT-PCR-reaktioon on päässyt häiritsevää 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) Real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävä alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa.
- Käytä tässä oppaassa suositeltua, käyttämäsi real-time RT-PCR -tekniikan alustaa koskevaa konfiguraatiota.

### Näytteen kontrollin Yellow-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 ihmisoluja.
- Noudata näytteenottolaitteen toimittajan antamia suosituksia näytteenotosta ja näytteiden käsittelystä.
- c) Real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävä alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa.
- Käytä tässä oppaassa kuvattua, käyttämäsi real-time RT-PCR -tekniikan 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 -lääkintälaitte
	Tuotenumero
	Eränumero
	Komponentit
	Sisältö
	Numero
	GTIN-numero
Rn	R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota ja n on versionumero
	Lämpötilarajoitus

Symboli

Selitys

---



Valmistaja



Katso käyttöohjeet



Säilytettävä auringonvalolta suojattuna



Varoitus/huomio

# Yhteystiedot

Teknistä tukea ja lisätietoja saa ottamalla yhteyttä QIAGENin tekniseen palveluun osoitteessa **[support.qiagen.com](https://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		
PCR tubes, 0.1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Käytettäväksi 72 kuoppaisessa roottorissa, Strip tubes and caps	981103
Rotor-Gene Q software	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
72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml -tuotteille, joiden reaktiutilavuus on 10–50 µl	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps 0.1 ml -liuskaputkien ja korkkien lukitsemiseen 72-Well Rotor -roottoriin	9018904

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](http://www.qiagen.com), tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.



# Asiakirjan muutoshistoria

Versio	Kuvaus
R3, syyskuu 2021	<p>Ilmoituksen jatko:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Lisätty testaus sylkinäytteiden avulla.</li><li>2. Työnkulkua muokattu.</li><li>3. Käytettäväksi kolmen muun alustan ja niihin liittyvien ohjelmistojen kanssa: CFX96 Dx ja CFX Manager Dx -ohjelmistoversio 3.1.3090.1022 (tai uudempi), cobas z 480 ja LightCycler 480 SW UDF -versio 2.0.0 (tai uudempi) sekä QuantStudio 5 Dx ja QuantStudio 5 Dx IVD -ohjelmistoversio 1.0.1 (tai uudempi).</li><li>4. Kolmen lisätyn alustan (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) havaitsemisrajat lisättiin nenänielu-, nenä- ja suuinielunäytteitä koskevaan suorituskykyosioon.</li><li>5. Suorituskykyominaisuudet-osio on päivitetty.</li><li>6. Vain fluoresenssikanavat (Green, Red ja Yellow) säilytettiin RGQ-laitteen kohdalla (sulkeissa olleet värien nimet poistettiin).</li><li>7. Vain värien nimet säilytettiin CFX96 Dx-, ABI 7500 Fast Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteiden kohdalla.</li><li>8. ABI 7500 Fast Dx -laitteen kohdalla fluoresenssisuodattimet A/1, B/2 ja E/5 poistettiin. Vain värien nimet säilytettiin (FAM, VIC ja Cy5).</li><li>9. Muutoksia taulukoihin 34–37 Kliininen suorituskyky -osiossa esityksen selventämiseksi.</li></ol>
R4, tammikuu 2022	<p>Korjattu kirjoitusvirhe taulukossa 39.</p>
R5, syyskuu 2022	<p>Päivitetty Reagenssien säilytys ja käsittely -kohta Päivitetty taulukko 17.</p>

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

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

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä immateriaaliomaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen 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](http://www.qiagen.com). Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. 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 paneeliin ja/tai sen osien osalta.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Tavaramerkit: QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, *artus*<sup>®</sup>, Prep&Amp<sup>™</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); ATCC<sup>®</sup> (American Type Culture Collection); CFX96<sup>™</sup>, Hard-Shell<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>®</sup>, CLSI<sup>®</sup> (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc.); Zepemetric<sup>®</sup>, NATrol<sup>™</sup> (Cole-Parmer); Colgate<sup>®</sup>, Total SF Whitening<sup>™</sup> (Colgate-Palmolive Company); Listerine<sup>®</sup> (Johnson & Johnson); Tussidane<sup>®</sup> (Laboratoires Des Realisations Therapeutiques Elerte); PulmoFluide<sup>®</sup> (Laboratoires Gerda); Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corporation); Ricola<sup>®</sup> (Ricola Group); cobas<sup>®</sup>, LightCycler<sup>®</sup> (Roche Group); ABI<sup>®</sup>, MicroAmp<sup>™</sup>, EnduraPlate<sup>™</sup>, QuantStudio<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific tai sen tytäryhtiöt); Altoids<sup>®</sup> (Wm. Wrigley Jr. Company). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

09/2022 R5 HB-2850-005 © 2021 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Tekninen tuki [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Verkkosivusto [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)