

Januari 2022

# artus<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Prep&Amp<sup>™</sup> UM Kit Bruksanvisning (handbok)



Version 1



För in vitro-diagnostisk användning med Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM, ABI<sup>®</sup> 7500 Fast Dx, QuantStudio<sup>®</sup> 5 Dx, cobas<sup>®</sup> z 480 eller CFX96<sup>™</sup> Dx-instrument



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R4

# Innehåll

Avsedd användning .....	4
Beskrivning och princip .....	5
Information om patogen .....	5
Sammanfattning och förklaring.....	6
Material som medföljer.....	9
Kitinnehåll .....	9
Kitkomponenter .....	10
Plattformar och programvara .....	11
Material som behövs men inte medföljer.....	12
Förbrukningsartiklar och utrustning .....	12
Varningar och försiktighetsåtgärder .....	14
Säkerhetsinformation.....	14
Försiktighetsåtgärder.....	15
Förvaring och hantering av reagenser.....	16
Transport, förvaring och hantering av prover .....	16
Protokoll: Provberedning och SARS-CoV-2-detektion på RGQ MDx 5plex HRM .....	18
Protokoll: Provberedning och SARS-CoV-2-detektion på ABI 7500 Fast Dx.....	23
Protokoll: Provberedning och detektion av SARS-CoV-2 på CFX96 Dx.....	29
Protokoll: Provberedning och detektion av SARS-CoV-2 på cobas z 480 .....	34
Protokoll: Provberedning och detektion av SARS-CoV-2 på QuantStudio 5 Dx.....	40
Resultat.....	45

---

Analys på RGQ MDx 5plex HRM.....	45
Analys på ABI 7500 Fast Dx .....	47
Analys på CFX96 Dx .....	48
Analys på cobas z 480.....	49
Analys på QuantStudio 5 Dx .....	51
Tolkning av resultat .....	53
Begränsningar.....	56
Prestanda .....	57
Analytisk sensitivitet (Detektionsgräns).....	57
Analytisk specificitetsstudier (inkludativitet och exkludativitet/korsreaktivitet).....	58
Precision .....	68
Klinisk prestanda.....	69
Referenser.....	74
Felsökningsguide .....	75
Symboler .....	77
Kontaktinformation.....	79
Beställningsinformation .....	80
Dokumentrevisioner.....	81

---

# Avsedd användning

*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit är ett real-time RT-PCR-test avsett för kvalitativ detektion av nukleinsyror från SARS-CoV-2 med nasofarynxsvabb, nässvabb och orofarynxsvabb från personer med tecken och symptom på infektion eller personer utan symptom eller andra orsaker till misstänkt COVID-19-infektion. För outspädda salivprov är testet avsett för personer med tecken och symptom på infektion eller som har misstänkt COVID-19.

Det är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av COVID-19 i akut infektionsfas i kombination med kliniska observationer, patienthistorik och epidemiologisk information.

*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ska användas i en molekylärbiologisk labbmiljö av professionella användare som utbildad klinisk laboratoriepersonal som specifikt tränats i tekniker för real-time RT-PCR och *in vitro*-diagnostiska procedurer.

Negativa resultat utesluter inte SARS-CoV-2-infektion och ska inte ligga som enda grund för patienthanteringsbeslut.

*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit är avsett för användning med Rotor-Gene Q MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 eller CFX96 Dx som real-time PCR-system.

# Beskrivning och princip

## Information om patogen

Coronavirus, ett genus inom familjen *Coronaviridae*, är stora omslutna, positivt-strängade RNA-virus som orsakar höggradigt virulent sjukdom hos människor och djur (1). Coronavirus infekterar människor, orsakar en tredjedel av alla förkylningsinfektioner och är en känd orsak till nosokomiala övre luftvägsinfektioner hos tidigt födda barn (2).

En ny medlem i coronavirus-familjen orsakade ett utbrott av luftvägssjukdom i Wuhan City i Kina (1, 3). SARS-CoV-2, som först benämndes nya coronaviruset (2019-nCoV), skiljer sig från SARS-CoV (1, 3), som låg bakom utbrottet 2003 och MERS-CoV, som har förekommit i Mellanöstern sedan 2012. SARS-CoV-2 är orsaken till COVID-19. RNA från SARS-CoV-2 kan detekteras under tidiga och akuta faser av infektion från olika provtyper från övre luftvägarna (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx) och i utspädda salivprov (3).

Tillsammans med patienthistorik och SARS-CoV-2 epidemiologi har real-time RT-PCR-analyser blivit standarden vid SARS-CoV-2 diagnos. Europeiska smittskyddsinstitutet (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) har föreslagit att kombinera real-time RT-PCR-baserade analyser med immunoanalys för att övervaka infektionsstatus och utvärdera effektiviteten av de restriktiva åtgärder som vidtagits för att kontrollera utbrottet (4, 5).

*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit är utformad för att täcka 2 mål (N1 och N2) för N-genen som detekteras med samma fluorescenskanal. De två målen är inte differentierade och amplifiering av den ena eller bägge målen leder till en fluorescenssignal. Positiva resultat är indikativa för närvaro av SARS-CoV-2 men utesluter inte saminfektion med andra patogener. Å andra sidan utesluter inte negativa real-time RT-PCR-resultat en möjlig infektion.

## Sammanfattning och förklaring

*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit utgör ett instrument som är redo för användning med ett enkelt provberedningssteg och därefter detektion av SARS-CoV-2 RNA med hjälp av real-time RT-PCR på antingen RGQ MDx-instrumentet, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480, eller QuantStudio 5 Dx (Bild 1).

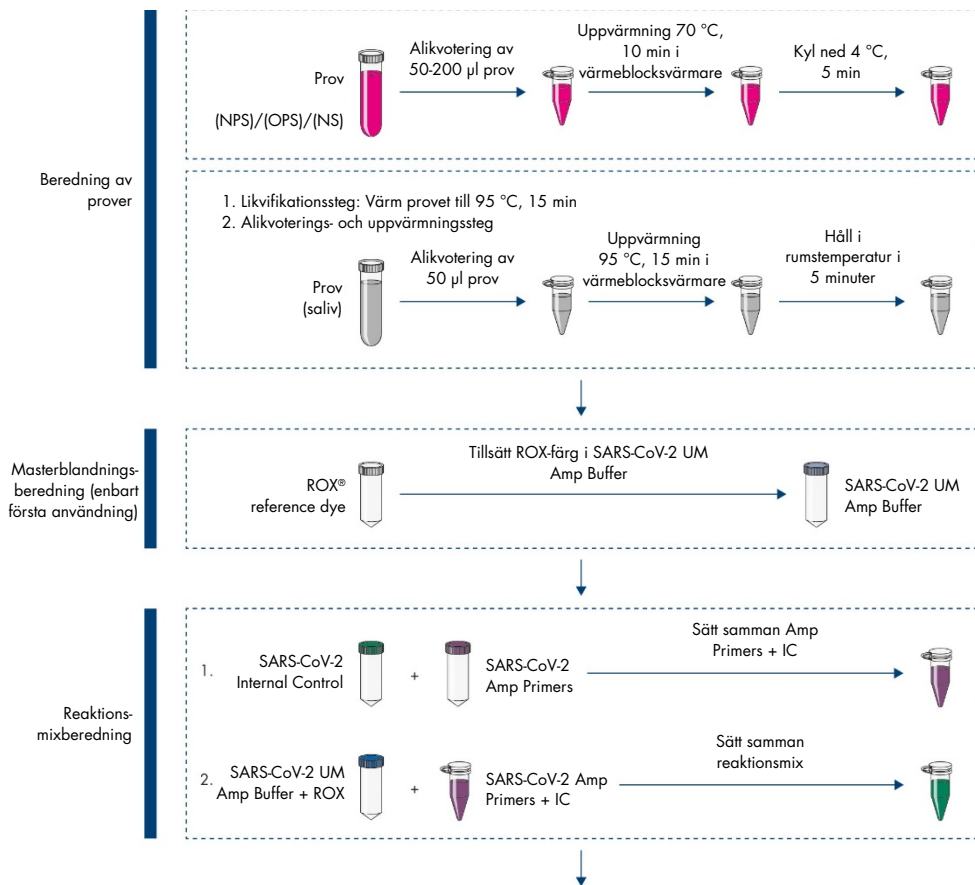
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer innehåller reagens och enzymer specifikt för amplifiering av en 72 baspar- (bp) och 67 basparregion av SARS-CoV-2 RNA-genomet och för direkt detektion av dem i fluorescenskanalen "Green" på RGQ MDx-instrument och i fluorescenskanalen "FAM" på ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480, eller QuantStudio 5 Dx.

Primer- och sökfragmentblandningen för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit innehåller även de oligonukleotider som krävs för RNase P-amplifieringarna. När de detekteras i fluorescenskanalen "Yellow" i RGQ MDx-instrumentet, i VIC/HEX på ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 eller QuantStudio 5 Dx, bekräftar amplifieringarna att ett tillräckligt biologiskt prov har samlats in. Den här kontrollen är avgörande för att bekräfta närvaron av biologiska prover i SARS-CoV-2-negativa prover. En amplifiering ska alltid detekteras, annars bör provkvaliteten ifrågasättas.

*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit innehåller även ett tredje heterologt amplifieringssystem för att avslöja eventuell real-time RT-PCR-hämning. Det detekteras som en intern RNA-kontroll (Internal Control, IC) i fluorescenskanalen "Red" i RGQ MDx-instrument eller i Cy5/ATTO647N på ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 eller QuantStudio 5 Dx. Eftersom IC ingår i SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, bör dess amplifiering vara konstant om ingen real-time RT-PCR-hämmare förekommer i provet eller i PCR-reaktionen, vilket fördröjer eller förhindrar amplifiering.

Externa positiva och negativa kontroller (SARS-CoV-2 Positive Control respektive nukleasfritt vatten som används som NTC) tillhandahålls i *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit för att bekräfta prestandan för PCR-steget. En ingen extraktionskontroll (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer använd som NEC) rekommenderas starkt för att påvisa frånvaro av real-time RT-PCR-hämmare i extraktionsbufferten.

När de tas tillsammans, övervakas effektiviteten för omvänd transkription och PCR-stegen av dessa kontroller.



(fortsätter på nästa sida)

(fortsätter från föregående sida)

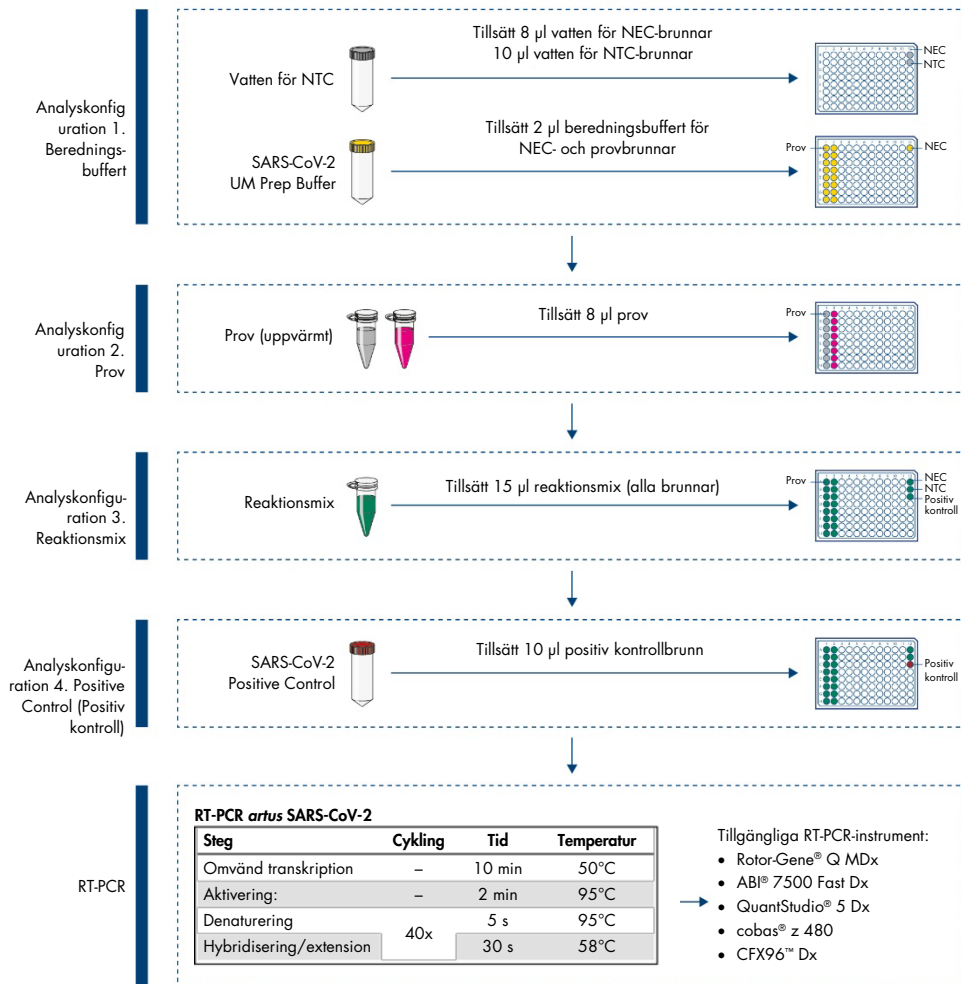


Bild 1. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit arbetsflöde



# Material som medföljer

## Kitinnehåll

<b>artus SARS-CoV-2 Prep&amp;Amp UM Kit</b>					
<b>Katalognr.</b>		<b>4511460</b>	<b>4511469</b>		
<b>Antal reaktioner</b>		<b>768</b>	<b>3072</b>		
<b>Rörfärg</b>	<b>Lockfärg</b>	<b>Identitet</b>	<b>Rör-ID</b>	<b>Volym (µl)</b>	<b>Volym (µl)</b>
Ofärgad	<b>Gul</b>	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	<b>Preparation Buffer (Beredningsbuffert)</b>	2 x 930	8 x 930
Ofärgad	<b>Blå</b>	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	<b>Master Mix (Masterblandning)</b>	4 x 1440	16 x 1440
Ofärgad	<b>Lila</b>	SARS-CoV-2 Amp Primers	<b>Primers and Probes (Primrar och sökfragment)</b>	4 x 1680	16 x 1680
Ofärgad	<b>Grön</b>	SARS-CoV-2 Internal Control	<b>Internal Control (Intern kontroll) (IC)</b>	1 x 1390	4 x 1390
Ofärgad	<b>Red</b>	SARS-CoV-2 Positive Control	<b>Positive Control (Positiv kontroll)</b>	1 x 220	4 x 220
Ofärgad	<b>Ofärgad</b>	Water for NTC (Vatten för NTC)	<b>Water (NTC) (Vatten (NTC))</b>	1 x 1900	4 x 1900
Ofärgad	<b>Ofärgad</b>	ROX Reference Dye (ROX-referensfärg)	<b>ROX Dye (ROX-färg)</b>	1 x 210	4 x 210

---

## Kitkomponenter

### Reagenser

I varje rör har reagensvolymerna optimerats för 8 batcher med 96 prover (för kitet för 768 reaktioner) eller 32 batcher med 96 reaktioner (för kitet för 3072 reaktioner), inklusive en positiv kontroll (Positive Control, PC), en kontroll utan mall (No Template Control, NTC) och en kontroll utan extraktion (No Extraction Control, NEC).

Ett färre eller större antal prover kan köras, men suboptimal reagensanvändning kommer att ske. Vi rekommenderar att du undviker flera frysnings-/upptiningscykler. Reagenser kan alikvoterats för att undvika flera frysnings-/upptiningscykler.

### Primrar och sökfragment

Primrar och sökfragment som riktar sig mot SARS-CoV-2-sekvenser är baserade på de primrar och sökfragment som skapats av Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

### Kontroller och kalibratorer

Analysen innehåller 5 kontroller för att övervaka real-time RT-PCR-effektivitet.

Intern kontroll (Internal Control, IC): Den interna kontrollen är ett ensträngat IVT-RNA som bekräftar närvaron av kontaminanter som kan hämma omvänd transkription. Den interna kontrollen övervakar över effektiviteten för omvänd transkription i kontroll utan mall (No Template Control, NTC) och i kontroll utan extraktion (No Extraction Control, NEC).

Kontroll utan mall (No Template Control, NTC): Kontrollen utan mall består av nukleasfritt vatten. Den tillsätts till PCR-plattan för att verifiera introduktion av kontaminanter under PCR-plattberedningen som kan leda till feltolkning av SARS-CoV-2-målen.

---

Positiv kontroll (Positive Control, PC): Den positiva kontrollen är ett dubbelsträngat DNA amplifierat med SARS-CoV-2 Primers and Probes (P&P). Detektionen verifierar effektiviteten för reagensen inblandad i PCR-amplifieringssteget.

Kontroll utan extraktion (No Extraction Control, NEC): Kontrollen utan extraktion består av SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Den bearbetades parallellt med de kliniska proverna för att verifiera introduktion av kontaminanter under provberedningen som kan leda till feltolkning av SARS-CoV-2-målen.

Provtagningskontroll: Provtagningskontrollen detekterar RNase P-genen och är avgörande för att bekräfta närvaron av biologiska prover i SARS-CoV-2-negativa prover. Amplifieringen av provtagningskontrollen ska alltid detekteras, annars bör provkvaliteten ifrågasättas.

## Plattformer och programvara

Säkerställ att instrumenten har underhållits och är kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer före användning. Kitet kan användas i fem arbetsflöden som kräver användning av följande real-time RT-PCR-instrument och deras tillhörande programvara:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Rotor-Gene Q programversion 2.3.1 eller senare
- ABI 7500 Fast Dx: SDS-programvaran version 1.4.1 eller senare
- CFX96 Dx med CFX Manager Dx-programvaran version 3.1.3090.1022 eller senare
- cobas z 480 med LightCycler® 480 SW UDF version 2.0.0 eller senare
- QuantStudio 5 Dx med QuantStudio 5 Dx IVD-programvaran version 1.0.1 eller senare och QuantStudio 5 Dx TD-programvaran version 1.0.1 eller senare

# Material som behövs men inte medföljer

## Förbrukningsartiklar och utrustning

### Vanliga förbrukningsartiklar och utrustning

- Bänkcentrifug med rotor för 2 ml reaktionsrör
- Pipetter (justerbara)
- Vortexblandare
- Blockvärmare
- Puderfria engångshandskar
- Sterila och nukleasfria pipettspetsar med filter
- 1,5 ml eller 2 ml PCR-fria rör
- 96-brunnars plattcentrifuginstrument

### Förbrukningsartiklar och utrustning för de enskilda plattformarna

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

- 0,1 ml PCR-rör för användning med Rotor-Gene Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, kat.nr. 981103).
- 72-Well Rotor (kat.nr. 9018903) och Locking Ring 72-Well Rotor (kat.nr 9018904)

#### **ABI 7500 Fast Dx-instrument**

- 96-Well MicroAmp™ (Thermo Fisher Scientific, kat.nr. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, kat.nr. 4360954)

#### **CFX96 Dx-instrument**

- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, low profile, thin wall, skirted white/clear (Bio-Rad Laboratories Inc., kat.nr. HSP9601)
- Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, Adhesive, Optical (Bio-Rad Laboratories Inc., kat.nr. MSB1001).

---

### **cobas z 480-instrument**

- LightCycler 480 Multiwell Plate, white (Roche Group, kat.nr. 04729692001).
- LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Group, kat.nr. 04729757001).

### **QuantStudio 5 Dx-instrument**

- MicroAmp EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, kat.nr. A36924)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, kat.nr. 4360954)

---

# Varningar och försiktighetsåtgärder

Var medveten om att du kan behöva konsultera lokala regelverk för rapportering av allvariga incidenter som inträffat i samband med enheten till tillverkaren och den tillsynsmyndighet där användaren och/eller patienten befinner sig.

## Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS). De finns tillgängliga online i behändigt PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), där du kan hitta, visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Använd alltid lämplig personlig skyddsutrustning, inklusive bland annat puderfria engångshandskar, labbrock och skyddsglasögon. Skydda hud, ögon och slemhinnor. Byt handskar ofta när du hanterar prover.

Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga. Följ alltid de säkerhetsåtgärder som föreskrivs i motsvarande säkerhetsföreskrifter, till exempel Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guideline (M29)*, eller annan lämplig dokumentation.

Prover är potentiellt smittsamma. Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.

---

## Försiktighetsåtgärder

- Följ standardprocedurer för laboratorier för renhållning och dekontaminering av alla arbetsytor. Avsätt ett område med specifik utrustning för att hantera RNA.
- Följ god laboratoriesed för att minimera korskontaminering.
- Var uppmärksam för att förhindra kontaminering med RNase under experimentet och använd RNase-fria plastartiklar.
- Se till att ha god spårbarhet för journalföringen, särskilt när det gäller proventifiering.

# Förvaring och hantering av reagenser

Var uppmärksam på de utgångsdatum och förvaringsvillkor som anges på förpackningen och på till alla komponenters etiketter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

*artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* kan förvaras i  $-30\text{ °C}$  till  $-15\text{ °C}$  i 6 månader eller till utgångsdatum.

# Transport, förvaring och hantering av prover

*artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* är avsett för användning med provstickor för nasofarynx, näsa, och orofarynx och utspädda salivprov. Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) och Public Health England har riktlinjer när det gäller provtagning, hantering och analys av kliniska prover. Referera till dessa riktlinjer eller andra relevanta nationella referenslaboratorieprotokoll för ytterligare information.

### Insamling, transport och förvaring av provstickor för nasofarynx, näsa, och orofarynx

För insamling, förvaring och transport av provstickor, se leverantörens rekommendationer. Provstickor måste vara helt nedsänkta i transportmedium för att bibehålla provintegritet. Nasofarynxsvabbprov förblir stabila och kan förvaras i:

- $4\text{ °C}$  (2 till  $8\text{ °C}$ ) i upp till 72 timmar
- $-70\text{ °C}$  i 2 veckor

Nasofarynxsvabbprov förblir stabila genom 3 frysings-/upptiningscykler.



## Provtagning, transport och förvaring av utspädda salivprov

Utspädda salivprov måste samlas in i sterila behållare utan konserveringsmedel, buffert eller andra tillsatser.

Instruktioner för insamling av utspädd saliv:

- Undvik att hosta före insamlandet av utspädd saliv.
- Du ska inte äta, dricka, röka, tugga tuggummi eller borsta tänderna 30 minuter före insamling av utspädd saliv.
- Ingen tandvård eller tandläkarundersökning får utföras inom 24 timmar före insamling av utspädd saliv.

De utspädda salivproven förblir stabila och kan förvaras i:

- Rumstemperatur (18–26 °C) i upp till 72 timmar
- 4 °C (2 till 8 °C) i upp till 72 timmar
- Kombinerad förvaring vid rumstemperatur, sedan 4 °C, sedan –20 °C (–30 till –15 °C) i upp till 12 dagar
- –20 °C (–30 till –15 °C) i 1 månad

Utspädda salivprov förblir stabila genom 3 frysings-/upptiningscykler.

Om provets förvaringsförhållanden avviker från dessa riktlinjer ska du validera dina egna förvaringsförhållanden.

# Protokoll: Provberedning och SARS-CoV-2-detektion på RGQ MDx 5plex HRM

Det här protokollet beskriver beredning av provet och real-time RT-PCR för att detektera SARS-CoV-2-mål i humana nasal-, nasofarynx- eller orofarynxsvabbar som förvaras i transportmedium och i outspädda salivprover på RGQ MDx 5plex HRM real-time RT-PCR-instrumentet som associeras med Rotor-Gene Q-programvaran version 2.3.1.49 (eller senare).

## Viktigt att tänka på före start

- Verifiera att de utgångsdatum och förvaringsförhållanden som anges på kartongen och alla komponentetiketter har följts. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Använd väl underhållen och kalibrerad utrustning.
- Var uppmärksam för att förhindra kontaminering med RNase under experimentet och använd nukleasfria plastartiklar.

## Saker som måste göras före start

- Luftvägsproverna kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen, men vi rekommenderar att de förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ.
- Salivproverna kan förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ, men vi rekommenderar att de förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen.
- Låt SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vatten för NTC och SARS-CoV-2 Positive Control tina fullständigt i rumstemperatur före användning. Förvara provrören i rumstemperatur och skydda dem från ljus innan användning.

- Homogenisera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer och SARS-CoV-2 UM Amp Buffer före användning genom att vända på dem 2–3 gånger (vortexblanda inte), följt av en kort centrifugering. Alla andra individuella ingredienser kan homogeniseras genom puls-vortexblandning i 3–5 sekunder eller genom att vändas 2–3 gånger följt av en kort centrifugering.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hämmar RNase som förekommer i kliniska prover för detektionssteget, men det är inte en virusinaktiverande lösning. Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga.
- Verifiera att cyklingsförhållandena för real-time RT-PCR-plattformen är som de anges i detta protokoll.
- Reagenser kan alikvoterats för att undvika flera frysnings-/upptiningscykler.
- Bered reaktionsblandningen färsk (<2 h till start av RT-PCR-plattan).
- För att minimera kontaminering bör provet och RT-PCR-beredningar utföras på separata zoner.

## Procedur

**Provberedning:** För luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx), följ steg 1. För salivprover gå till steg 2.

1. Luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx):
  - 1a. Vortexblanda provstickan med provet ordentligt.
  - 1b. Alikvoterats 50–200 µl av provet i 1,5 mL PCR-fria rör
  - 1c. Utför uppvärmningssteget i 70 °C i 10 min på en blockvärmare. Kyl ned proverna på is i minst 5 min. Förvara därefter proverna på is eller vid 4 °C.
2. Salivprover:
  - 2a. Likvifikation (för att underlätta pipettering): värm salivprovet till 95 °C i 15 minuter (ospecificerad volym, behållare och uppvärmningsenhet).
  - 2b. Homogenisera provet genom att försiktigt pipettera upp och ned det 8–10 gånger.
  - 2c. Alikvoterats 50 µl av provet i ett 1,5 ml PCR-fritt rör.

- 2d. Genomför uppvärmningssteget i 95 °C i 15 min på en blockvärmare. Förvara därefter provet i rumstemperatur i minst 5 min och ladda det sedan till PCR-brunn eller -provör.
3. Färdigställ SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX reference dye vid första användning.
  - 3a. Tillsätt 32,8 µl av ROX-färgen till 1 provrör med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Stäng locket med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer och ROX-färg och vänd provröret 3 gånger.
  - 3c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-färg till botten av röret.
4. För en full RGQ MDx-platta (72 brunnar), bered en alikvotblandning av SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
  - 4a. Överför nödvändiga volymer till SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt Tabell 1 till ett nytt 1,5 mL PCR-fritt provrör.
  - 4b. Stäng locket och vänd röret 3 gånger eller puls-vortexblanda provröret i 3–5 s.
  - 4c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 Amp Primers med intern kontroll till botten av röret.

**Tabell 1. Konfiguration av SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blandning**

SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			Antal reaktioner Volym (µl)	
Reagenser	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	72 rxns (+ 20 % extra volym*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3.45x	1x	7,25	626,4
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	129,6
Total SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			8,75	756

\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt det antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

5. Bered en reaktionsblandning enligt Tabell 2 och blanda noggrant genom att vända provröret 3 gånger.

**Tabell 2. Konfiguration av reaktionsmix**

RT-PCR-reaktionsmix				Antal reaktioner Volym (µl)	
Reagenser	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	72 rxns (+ 20 % extra volym*)	
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX-blandning	4x	1x	6,25	540	
SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning	2.9x	1x	8,75	756	
Total reaktionsvolym	–		15,00	1296	

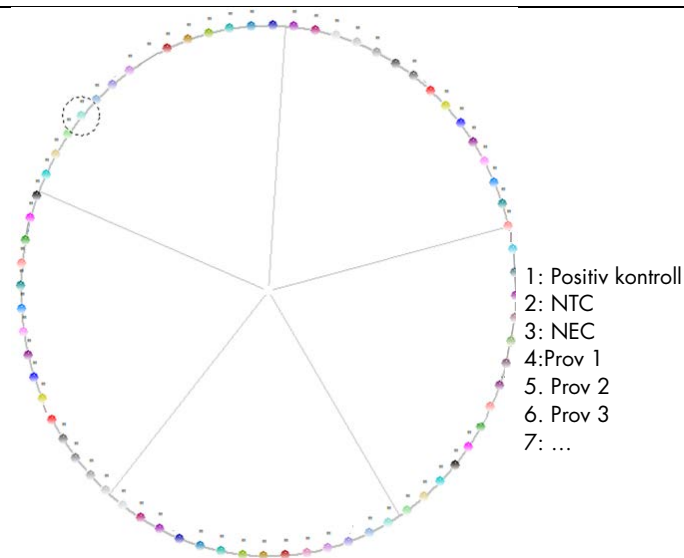
\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 Amp Buffer och SARS-CoV-2 Amp Primers enligt det antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

6. Dispensera 8 µl nukleasfritt vatten till det PCR-provrör som tilldelats NEC.
7. Ladda 10 µl nukleasfritt vatten till det PCR-provrör som tilldelats NTC.
8. Dispensera 2 µl med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i varje PCR-provrör som tilldelats NEC och de beredda proverna.
9. Tillsätt 8 µl av det förberedda provet till ett PCR-provrör med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
10. Tillsätt 15 µl med reaktionsmix berett i steg 5 till de provrör som dedikerats till prover och kontroller (Bild 2 tillhandahålls som ett exempel). Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger och stäng därefter PCR provrörens lock, förutom det som reserverats som SARS-CoV-2 Positiv Control.  
**OBS!** Verifiera att provrören är ordentligt stängda för att förhindra korskontaminering.
11. Ladda 10 µl av SARS-CoV-2 Positive Control till lämpligt PCR provrör. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
12. Konfigurera RT-PCR-programmet för RGQ MDx 5plex HRM enligt specifikationerna i Tabell 3.  
**OBS!** Datainsamling bör utföras under hybridiserings-/förlängningssteget.
13. Placera provrören i real-time-cyklern (ett exempel på provrörslayout visas i Bild 2) och starta cyklingsprogrammet som det beskrivs i Tabell 3.

**OBS!** Var noggrann med att följa samma provrörsposition och ordning mellan analysinställningen och real-time cykelstegen.

**Tabell 3. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-program**

Steg	Tid	Temperatur (°C)	Antal cykler	Insamling
Omvänd transkription	10 min	50	1	Nej
PCR initial värmeaktivering	2 min	95	1	Nej
2-stegscyklning				
Denaturering	5 s	95	40	Nej
hybridisering/förlängning	30 s	58		Green, Yellow och Red



**Bild 2. Exempel på provrörslayout på RGQ MDx 5plex HRM-plattformen**

14. Klicka på Gain optimization (Optimering av förstärkning) i "New Run Wizard" (Guide för ny körning) och öppna Auto-gain Optimization Setup (Konfigurera optimering av automatisk förstärkning).
15. Verifiera att insamlingskanalerna har konfigurerats som det anges i Tabell 4.

Tabell 4. RGQ MDx 5plex HRM-konfiguration

Namn	PC-rörposition	Min läsning (Fl)	Max läsning (Fl)	Min förstärkning	Max förstärkning
Green	1*	5 Fl	10 Fl	-10	10
Yellow	1*	5 Fl	10 Fl	-10	10
Red	1*	5 Fl	10 Fl	-10	10

\* **OBS!** Det här behöver ändras enligt positionen för SARS-CoV-2 Positive Control-provröret.

16. Välj Perform optimization before the first acquisition (utför optimering innan första insamling).

17. Starta körningen.

18. Analysera resultaten i slutet av körningen (se avsnittet Resultat).

## Protokoll: Provberedning och SARS-CoV-2-detektion på ABI 7500 Fast Dx

Det här protokollet är för att bereda och detektera SARS-CoV-2-mål i humana nasal-, nasofarynx- eller orofarynxsvabbar förvarade i transportmedia och i utspädda salivprover på ABI 7500 Fast Dx real-time RT-PCR-instrumentet.

Viktigt att tänka på före start

- Verifiera att de utgångsdatum och förvaringsförhållanden som anges på kartongen och alla komponentetiketter har följts. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Använd väl underhållen och kalibrerad utrustning.
- Var uppmärksam för att förhindra kontaminering med RNase under experimentet och använd nukleasfria plastartiklar.
- När du använder ABI 7500 Fast Dx, måste ROX-färg läggas till masterblandningsröret innan första användning.

## Saker som måste göras före start

- Luftvägsproverna kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen, men vi rekommenderar att de förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ.
- Salivproverna kan förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ, men vi rekommenderar att de förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen.
- ROX-färgen krävs är du använder ABI 7500 Fast Dx.
- Data måste hämtas med ROX passiv färginställning.
- Låt SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vatten för NTC och SARS-CoV-2 Positive Control tina fullständigt i rumstemperatur före användning. Förvara provrören i rumstemperatur och skydda dem från ljus innan användning.
- Homogenisera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer och SARS-CoV-2 UM Amp Buffer före användning genom att vända på dem 2–3 gånger (vortexblanda inte), följt av en kort centrifugering. Alla andra individuella ingredienser kan homogeniseras genom puls-vortexblandning i 3–5 sekunder eller genom att vändas 2–3 gånger följt av en kort centrifugering.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hämmar RNase som förekommer i kliniska prover för detektionssteget, men det är inte en virusinaktiverande lösning. Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga.
- Verifiera att cyklingsförhållandena för real-time RT-PCR-plattformen är som de anges i detta protokoll.
- Reagenser kan alikvoterats för att undvika flera frysnings-/upptiningscykler.
- Bered reaktionsblandningen färsk (<2 h till start av RT-PCR-plattan).
- För att minimera kontaminering bör provet och RT-PCR-beredningar utföras på separata zoner.



## Procedur

**Provberedning:** För luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx), följ steg 1. För salivprover gå till steg 2.

1. Luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx):
  - 1a. Vortexblanda provstickan med provet ordentligt.
  - 1b. Alikvotera 50–200 µl av provet i 1,5 mL PCR-fria rör.
  - 1c. Utför uppvärmningssteget i 70 °C i 10 min på en blockvärmare.
  - 1d. Kyl ned proverna på is i minst 5 min, förvara därefter proverna på is i 4 °C.
2. Salivprover:
  - 2a. Likvifikaion (för att underlätta pipettering): värm salivprovet till 95 °C i 15 minuter (ospecificerad volym, behållare och uppvärmningsenhet).
  - 2b. Homogenisera provet genom att försiktigt pipettera upp och ned det 8–10 gånger
  - 2c. Alikvotera 50 µl av provet i ett 1,5 ml PCR-fritt rör.
  - 2d. Genomför uppvärmningssteget i 95 °C i 15 min på en blockvärmare. Förvara därefter provet i rumstemperatur i minst 5 min och ladda det sedan till PCR-brunn eller -provrör.
3. Färdigställ SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX Reference Dye vid första användning.
  - 3a. Tillsätt 32,8 µl av ROX-färgen till ett provrör med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Stäng locket med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer och ROX-färg och vänd provröret 3 gånger.
  - 3c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-färg till botten av röret.
4. För en full ABI 7500 Fast Dx-platta (96 brunnar), bered en alikvotblandning av SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
  - 4a. Överför nödvändig volym till SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt Tabell 5 till ett nytt 1,5 mL PCR-fritt provrör.
  - 4b. Stäng locket och vänd röret 3 gånger eller puls-vortexblanda provröret i 3–5 s.
  - 4c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 Amp Primers med IC för att få ned lösningen till botten av röret.

**Tabell 5. Konfiguration av SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blandning**

SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			Antal reaktioner Volym (µl)	
Reagenser	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	96 rxns (+ 20 % extra volym*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3.45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Total SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			8,75	1008

\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt det antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

5. Bered en reaktionsblandning enligt Tabell 6 och blanda noggrant genom att vända provröret 3 gånger.

**Tabell 6. Konfiguration av reaktionsmix**

RT-PCR-reaktionsmix			Antal reaktioner Volym (µl)	
Reagenser	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	96 rxns (+ 20 % extra volym*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX-blandning	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning	2.9x	1x	8,75	1008
Total reaktionsvolym	–		15,00	1728

\* **OBS!** Justera volymen för SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, för SARS-CoV-2 Amp Primers enligt antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

6. Dispensera 8 µl nukleasfritt vatten till den brunn som tilldelats NEC.
7. Ladda 10 µl nukleasfritt vatten till den brunn som tilldelats NTC.
8. Dispensera 2 µl med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i varje brunn som tilldelats NEC och de beredda proverna.
9. Tillsätt 8 µl av det förberedda provet till en brunn med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
10. Tillsätt 15 µl med reaktionsmix berett i steg 5 till brunnarna som dedikerats till prover och kontroller (se exempel i Bild 3). Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
11. Ladda 10 µl av SARS-CoV-2 Positive Control till lämplig brunn. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.

12. Försegla PCR-plattan väl för att förhindra korskontaminering. Applicera tryck jämnt utmed hela plattan för att få en tät försegling över individuella brunnar.
13. Centrifugera PCR-plattan en kort stund för att samla vätska botten av brunnen.
14. Konfigurera real-time RT-PCR-programmet för körningsläget "Standard 7500" på ABI 7500 Fast Dx enligt Tabell 7.

**OBS!** När du har klickat på **file** (fil) och **new** (ny), verifiera att analysen är **Standard Curve** (Absolute Quantitation) (Standardkurva – absolut kvantifiering) och att Run Mode (Körningsläge) är inställt på **Standard 7500**. Välj FAM, VIC och Cy5 som reportrar med Quencher inställd på **None** (Ingen), och data måste insamlas med **ROX** som **passive reference** (passiv referens).

**OBS!** Datainsamling bör utföras under hybridiserings-/förlängningssteget.

**Obs!** Se *Bruksanvisningen för ABI 7500 Fast Dx* för mer information.

15. Placera plattan i real-time-cyklern (ett exempel på en PCR-plattlayout visas i Bild 3) och starta cyklingsprogrammet som det beskrivs i Tabell 7.
16. Välj de använda brunnarna och applicera FAM-, VIC- och Cy5-reporterna Data måste hämtas med ROX passiv färgning **PÅ**.
17. Verifiera att standardkurvan för ABI 7500 Fast Dx är konfigurerat som Absolut kvantifiering.
18. Starta körningen.
19. Analysera resultaten i slutet av körningen (se avsnittet Resultat).

**Tabell 7. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-program**

Steg	Tid	Temperatur (°C)	Antal cykler	Insamling
Omvänd transkription	10 min	50	1	Nej
PCR initial värmeaktivering	2 min	95	1	Nej
2-stegscyckling				
Denaturering	5 s	95	40	Nej
hybridisering/förlängning	30 s	58		FAM, VIC och Cy5

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

**Bild 3. Exempel på platlayout för ABI 7500 Fast Dx**

# Protokoll: Provberedning och detektion av SARS-CoV-2 på CFX96 Dx

Det här protokollet är för att bereda och detektera SARS-CoV-2-mål i humana nasal-, nasofarynx- eller orofarynxprovsticker förvarade i transportmedia och i outspädda salivprover på CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., kat.no. 1845097-IVD (Optical Reaction module)) och 1841000-IVD (Thermal Cycler module) med CFX Manager Dx-programvaran version 3.1.309001022 eller senare.

## Viktigt att tänka på före start

- Verifiera att de utgångsdatum och förvaringsförhållanden som anges på kartongen och alla komponentetiketter har följts. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Använd väl underhållen och kalibrerad utrustning.
- Var uppmärksam för att förhindra kontaminering med RNase under experimentet och använd nukleasfria plastartiklar.

## Saker som måste göras före start

- Luftvägsproverna kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen, men vi rekommenderar att de förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ.
- Salivproverna kan förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ, men vi rekommenderar att de förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen.
- Låt SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vatten för NTC och SARS-CoV-2 Positive Control tina fullständigt i rumstemperatur före användning. Förvara provrören i rumstemperatur och skydda dem från ljus innan användning.

- Homogenisera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer och SARS-CoV-2 UM Amp Buffer före användning genom att vända på dem 2–3 gånger (vortexblanda inte), följt av en kort centrifugering. Alla andra individuella ingredienser kan homogeniseras genom puls-vortexblandning i 3–5 sekunder eller genom att vändas 2–3 gånger följt av en kort centrifugering.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hämmar RNase som förekommer i kliniska prover för detektionssteget, men det är inte en virusinaktiverande lösning. Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga.
- Verifiera att cyklingsförhållandena för real-time RT-PCR-plattformen är som de anges i detta protokoll.
- Reagenser kan alikvoterats för att undvika flera frysnings-/upptiningscykler.
- Bered reaktionsblandningen färsk (<2 h till start av PCR-plattan).
- För att minimera kontaminering bör provet och real-time RT-PCR-beredningarna utföras på separata zoner.

## Procedur:

Provberedning: För luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx), följ steg 1. För salivprover gå till steg 2.

1. Luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx):
  - 1a. Vortexblanda provstickan med provet ordentligt
  - 1b. Alikvotera 50–200 µl av provet i 1,5 ml PCR-fria rör
  - 1c. Utför uppvärmningssteget i 70 °C i 10 min på en blockvärmare.
  - 1d. Kyl ned proverna på is i minst 5 min. Förvara därefter proverna på is eller vid 4 °C.
2. Salivprover:
  - 2a. Likvifikation (för att underlätta pipettering): värm salivprovet till 95 °C i 15 minuter (ospecificerad volym, behållare och uppvärmningsenhet).
  - 2b. Homogenisera provet genom att försiktigt pipettera upp och ned det 8–10 gånger.
  - 2c. Alikvotera 50 µl av provet i ett 1,5 ml PCR-fritt rör.

- 2d. Utför uppvärmingssteget i 95°C i 15 min på en blockvärmare. Förvara därefter provet i rumstemperatur i minst 5 min och ladda det sedan till PCR-brunn eller -provör.
3. Färdigställ SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX reference dye vid första användning.
  - 3a. Tillsätt 32,8 µl av ROX-färgen till 1 provrör med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Stäng locket med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer och ROX-färg och vänd provröret 3 gånger.
  - 3c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-färg till botten av röret.
4. För en full CFX96 Dx-platta (96 brunnar), bered en alikvotblandning av SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
  - 4a. Överför nödvändig volym till SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt Tabell 8 till ett nytt 1,5 mL PCR-fritt provrör.
  - 4b. Stäng locket och vänd röret 3 gånger eller puls-vortexblanda provröret i 3–5 s.
  - 4c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 Amp Primers med IC för att få ned lösningen till botten av röret.

**Tabell 8. Konfiguration av SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blandning**

SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			Antal reaktioner Volym (µl)	
Reagenser	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	96 rxns (+ 20 % extra volym*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3.45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Total SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			8,75	1008

\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt det antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

5. Bered en reaktionsblandning enligt Tabell 9 och blanda noggrant genom att vända provröret 3 gånger.

**Tabell 9. Konfiguration av reaktionsmix**

RT-PCR-reaktionsmix			Antal reaktioner Volym (µl)	
Reagenser	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	96 rxns (+ 20 % extra volym*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX-blandning	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning	2.9x	1x	8,75	1008
Total reaktionsvolym	–		15,00	1728

\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 UM Amp Buffer och SARS-CoV-2 Amp Primers enligt antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

- Dispensera 8 µl nukleasfritt vatten till den brunn som tilldelats NEC.
- Ladda 10 µl nukleasfritt vatten till den brunn som tilldelats NTC.
- Dispensera 2 µl av SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i varje brunn som tilldelats NEC och de beredda proverna.
- Tillsätt 8 µl av det förberedda provet till en brunn med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Tillsätt 15 µl med reaktionsmix berett i steg 5 till de provstickor som dedikerats till prover och kontroller (Bild 4 tillhandahålls som ett exempel). Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Ladda 10 µl av SARS-CoV-2 Positive Control till lämplig brunn. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Försegla PCR-plattan väl för att förhindra korskontaminering. Applicera tryck jämnt utmed hela plattan för att få en tät försegling över individuella brunnar.
- Centrifugera PCR-plattan en kort stund för att samla vätska botten av brunnen.
- På **CFX Manager Dx-programvaran > Startup Wizard** (Startguide), underrun **type** (körningstyp), välj **user defined** (användardefinierat).
- Fliken **Protocol** (Protokoll): Ställ in real-time RT-PCR-programmet enligt Tabell 10 för 25 µl av reaktionsvolym.



**OBS!** I fönstret **Protocol Editor** (Protokollredigerare), klicka på knappen **Step Options** (Stegalternativ) för att ställa in hastigheten för temperaturändring till 1,6 °C/s i var och en av RT-PCR-programmets fyra steg.

**OBS!** Datainsamling bör utföras under hybridiserings-/förlängningssteget.

**OBS!** Se *Bruksanvisningen för CFX96 Dx* för mer information.

16. Fliken **Plate** (Platta): Välj de använda brunnarna och applicera FAM-, HEX- och Cy5-reporterna.
17. Placera plattan i real-time-cyklern (ett exempel på en PCR-plattlayout visas i Bild 4).
18. Fliken **Start run** (Starta körning): Klicka på Start the run (Starta körningen).
19. Analysera resultaten i slutet av körningen (se avsnittet Results).

**Tabell 10. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-program för CFX96 Dx**

Steg	Tid	Temperatur (°C)	Hastighet för temperaturändring (°C/s)	Antal upprepningar	Insamling
1. Omvänd transkription	10 min	50	1,6	1	Nej
2. PCR initial värmeaktivering	2 min	95	1,6	1	Nej
2-stegscyklning				39*	
Denaturering	5 s	95	1,6	1	Nej
hybridisering/förlängning	30 s	58	1,6	1	FAM, HEX och Cy5

\*CFX fungerar genom repetition. För att programmet ska köra 40 cykler måste tvåstegscykeln ställas in på 39 upprepningar (som steg 5 "GOTO" i programvaran).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											
B	HTC											
C	HEC											
D	Sampla 1											
E	Sampla 2											
F	Sampla 3											
G	---											
H												

**Bild 4. Exempel på plattlayout för CFX96 Dx**

# Protokoll: Provberedning och detektion av SARS-CoV-2 på cobas z 480

Det här protokollet beskriver beredning av provet och real-time RT-PCR för att detektera SARS-CoV-2-mål i humana nasal-, nasofarynx- eller orofarynxsvabbar som förvaras i transportmedium och i utspädda salivprover på cobas z 480 med LightCycler 480 SW UDF version 2.0.0 (eller senare).

Viktigt att tänka på före start.

- Verifiera att de utgångsdatum och förvaringsförhållanden som anges på kartongen och alla komponentetiketter har följts. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Använd väl underhållen och kalibrerad utrustning.
- Var uppmärksam för att förhindra kontaminering med RNase under experimentet och använd nukleasfria plastartiklar.

Saker som måste göras före start.

- Luftvägsproverna kan förvaras i rumstemperatur under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen, men vi rekommenderar att de förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ.
- Salivproverna kan förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ, men vi rekommenderar att de förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen.
- Låt SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vatten för NTC och SARS-CoV-2 Positive Control tina fullständigt i rumstemperatur (15–25 °C) före användning. Förvara provrören i rumstemperatur och skydda dem från ljus innan användning.

- Homogenisera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer och SARS-CoV-2 UM Amp Buffer före användning genom att vända på dem 2–3 gånger (vortexblanda inte), följt av en kort centrifugering. Alla andra individuella ingredienser kan homogeniseras genom puls-vortexblandning i 3–5 sekunder eller genom att vändas 2–3 gånger följt av en kort centrifugering.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hämmar RNase som förekommer i kliniska prover för detektionssteget, men det är inte en virusinaktiverande lösning. Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga.
- Verifiera att cyklingsförhållandena för real-time RT-PCR-plattformen är som de anges i detta protokoll.
- Reagenser kan alikvoterats för att undvika flera frysnings-/upptiningscykler.
- Bered reaktionsblandningen färsk (<2 h till start av real-time RT-PCR-plattan).
- För att minimera kontaminering bör provet och real-time RT-PCR-beredningarna utföras på separata zoner.

## Procedur:

Provberedning: För luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx), följ steg 1. För salivprover gå till steg 2.

1. Luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx):
  - 1a. Vortexblanda provstickan med provet ordentligt.
  - 1b. Alikvoterats 50–200 µl av provet i 1,5 ml PCR-fria rör
  - 1c. Utför uppvärmningssteget i 70 °C i 10 min på en blockvärmare.
  - 1d. Kyl ned proverna på is i minst 5 min. Förvara därefter proverna på is eller vid 4 °C.
2. Salivprover:
  - 2a. Likvifikation (för att underlätta pipettering): värm salivprovet till 95 °C i 15 minuter (ospecificerad volym, behållare och uppvärmningsenhet).
  - 2b. Homogenisera provet genom att försiktigt pipettera upp och ned det 8–10 gånger.
  - 2c. Alikvoterats 50 µl av provet i ett 1,5 ml PCR-fritt rör.

- 2d. Genomför uppvärmningssteget i 95 °C i 15 min på en blockvärmare. Förvara därefter provet i rumstemperatur i minst 5 min innan du laddar det till PCR-brunn eller -provör.
3. Färdigställ SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX reference dye vid första användning.
  - 3a. Tillsätt 32,8 µl av ROX-färgen till 1 provrör med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Stäng locket med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer och ROX-färg och vänd provröret 3 gånger.
  - 3c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-färg till botten av röret.
4. För en full cobas z 480-platta (96 brunnar), bered en alikvotblandning av SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
  - 4a. Överför nödvändig volym till SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt Tabell 11 till ett nytt 1,5 mL PCR-fritt provrör.
  - 4b. Stäng locket och vänd röret 3 gånger eller puls-vortexblanda provröret i 3–5 s.
  - 4c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 Amp Primers med IC för att få ned lösningen till botten av röret.

**Tabell 11. Konfiguration av SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blandning**

SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning				Antal reaktioner Volym (µl)	
Reagenser	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	96 rxns (+ 20 % extra volym*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3.45x	1x	7,25	835,2	
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8	
Total SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			8,75	1008	

\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt det antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

5. Bered en reaktionsblandning enligt Tabell 12 och blanda noggrant genom att vända provröret 3 gånger.

**Tabell 12. Konfiguration av reaktionsmix**

Reagenser	RT-PCR-reaktionsmix		Antal reaktioner Volym (µl)	
	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	96 rxns (+ 20 % extra volym*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX-blandning	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning	2.9x	1x	8,75	1008
Total reaktionsvolym	–		15,00	1728

\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, och SARS-CoV-2 Amp Primers enligt antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

- Dispensera 8 µl nukleasfritt vatten till den brunn som tilldelats NEC.
- Ladda 10 µl nukleasfritt vatten till den brunn som tilldelats NTC.
- Dispensera 2 µl av SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i varje brunn som tilldelats NEC och de beredda proverna.
- Tillsätt 8 µl av det förberedda provet till en brunn med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Tillsätt 15 µl med reaktionsmix berett i steg 5 till de provstickor som dedikerats till prover och kontroller (Bild 5 tillhandahålls som ett exempel). Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Ladda 10 µl av SARS-CoV-2 Positive Control till lämplig brunn. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Försegla PCR-plattan väl för att förhindra korskontaminering. Applicera tryck jämnt utmed hela plattan för att få en tät försegling över individuella brunnar.
- Centrifugera PCR-plattan en kort stund för att samla vätska botten av brunnen.
- Första användning:** I Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0-programvaran: Klicka på **open tools** (öppna verktyg) och välj **detection formats** (detektionsformat) för att ställa in följande exciterings- och emissionskombinationer: 465-510 (FAM), 540-580 (HEX) och 610-670 (ATTO647N).

---

15. Ställ in real-time RT-PCR-programmet enligt Tabell 13 för 25 µl av reaktionsvolym.

**OBS!** Välj **detection format** (detektionsformat) högst upp på sidan för att välja detektionsformatet som skapades i steg 14.

**OBS!** Använd en anpassad hastighet för temperaturändring på 1,6 °C/s i var och en av real-time RT-PCR-programmets fem steg.

**OBS!** Datainsamling bör utföras under hybridiserings-/förlängningssteget.

**OBS!** Se *Bruksanvisningen för cobas z 480* för mer information.

16. Placera plattan i real-time-cyklern (ett exempel på en PCR-plattlayout visas i Bild 5).

17. Starta körningen.

18. Analysera resultaten i slutet av körningen (se avsnittet Results).

**Tabell 13. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-program för cobas z 480**

Steg	Tid	Temperatur (°C)	Hastighet för temperaturändring (°C/s)	Antal cykler	Analysis Mode (Analysläge)
Omvänd transkription	10 min	50	1,6	1	Ingen
PCR initial värmeaktivering	2 min	95	1,6	1	Ingen
2-stegscyklning				40	Quantification (Kvantifiering)
Denaturering	5 s	95	1,6		Ingen
hybridisering/förlängning	30 s	58	1,6		Single (Enskild)
Nedkyllning	1 min	37	1,6	1	Ingen

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

**Bild 5. Exempel på plattlayout för cobas z 480**

# Protokoll: Provberedning och detektion av SARS-CoV-2 på QuantStudio 5 Dx

Det här protokollet är för att bereda och detektera SARS-CoV-2-mål i humana nasal-, nasofarynx- eller orofarynxsvabbar förvarade i transportmedia och i utspädda salivprover på QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR-instrumentet.

Viktigt att tänka på före start.

- Verifiera att de utgångsdatum och förvaringsförhållanden som anges på kartongen och alla komponentetiketter har följts. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Använd väl underhållen och kalibrerad utrustning.
- Var uppmärksam för att förhindra kontaminering med RNase under experimentet och använd nukleasfria plastartiklar.
- När du använder QuantStudio 5 Dx måste ROX-färg läggas till masterblandningsröret innan första användning.

Saker som måste göras före start

- Luftvägsproverna kan förvaras i rumstemperatur under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen, men vi rekommenderar att de förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ.
- Salivprover kan förvaras på is eller vid 4 °C på ett kylställ, men vi rekommenderar att de förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) under beredningsstegen och reaktionskonfigurationen.
- ROX-färgen krävs är du använder QuantStudio 5.
- Låt SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vatten för NTC och SARS-CoV-2 Positive Control tina fullständigt i rumstemperatur (15–25 °C) före användning. Förvara provrören i rumstemperatur och skydda dem från ljus innan användning.



- Homogenisera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer och SARS-CoV-2 UM Amp Buffer före användning genom att vända på dem 2–3 gånger (vortexblanda inte), följt av en kort centrifugering. Alla andra individuella ingredienser kan homogeniseras genom puls-vortexblandning i 3–5 sekunder eller genom att vändas 2–3 gånger följt av en kort centrifugering.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hämmar RNase som förekommer i kliniska prover för detektionssteget, men det är inte en virusinaktiverande lösning. Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga.
- Verifiera att cyklingsförhållandena för real-time RT-PCR-plattformen är som de anges i detta protokoll.
- Reagenser kan alikvoterats för att undvika flera frysnings-/upptiningscykler.
- Bered reaktionsblandningen färsk (<2 h till start av real-time RT-PCR-plattan).
- För att minimera kontaminering bör provet och real-time RT-PCR-beredningarna utföras på separata zoner.

## Procedur

**Provberedning:** För luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx), följ steg 1. För salivprover gå till steg 2.

1. Luftvägsprover (provstickor för näsa, orofarynx och nasofarynx):
  - 1a. Vortexblanda provstickan med provet ordentligt.
  - 1b. Alikvoterats 50–200 µl av provet i 1,5 ml PCR-fria rör
  - 1c. Utför uppvärmningssteget i 70 °C i 10 min på en blockvärmare.
  - 1d. Kyl ned proverna på is i minst 5 min. Förvara därefter proverna på is eller vid 4 °C.
2. Salivprover:
  - 2a. Likvifikation (för att underlätta pipettering): värm salivprovet till 95 °C i 15 minuter (ospecificerad volym, behållare och uppvärmningsenhet).
  - 2b. Homogenisera provet genom att försiktigt pipettera upp och ned det 8–10 gånger.
  - 2c. Alikvoterats 50 µl av provet i ett 1,5 ml PCR-fritt rör.

- 2d. Genomför uppvärmningssteget i 95 °C i 15 min på en blockvärmare. Förvara därefter provet i rumstemperatur i minst 5 min innan du laddar det till PCR-brunn eller -provör.
3. Färdigställ SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX Reference Dye vid första användning.
  - 3a. Tillsätt 32,8 µl av ROX-färgen till ett provrör med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Stäng locket med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer och ROX-färg och vänd provröret 3 gånger.
  - 3c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-färg till botten av röret.
4. För en full QuantStudio 5 Dx-platta (96 brunnar), bered en alikvotblandning av SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
  - 4a. Överför nödvändig volym till SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt Tabell 14 till ett nytt 1,5 mL PCR-fritt provrör.
  - 4b. Stäng locket och vänd röret 3 gånger eller puls-vortexblanda provröret i 3–5 s.
  - 4c. Centrifugera ned SARS-CoV-2 Amp Primers med IC för att få ned lösningen till botten av röret.

**Tabell 14. Konfiguration av SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blandning**

Reagenser	SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			Antal reaktioner Volym (µl)	
	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	96 rxns (+ 20 % extra volym*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3.45x	1x	7,25	835,2	
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8	
Total SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontroll-blandning			8,75	1008	

\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 Amp Primers och SARS-CoV-2 Internal Control enligt det antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

5. Bered en reaktionsblandning enligt Tabell 15 och blanda noggrant genom att vända provröret 3 gånger.

**Tabell 15. Konfiguration av reaktionsmix**

Reagenser	RT-PCR-reaktionsmix			Antal reaktioner	Volym (µl)
	Stamkoncentration	Slutlig koncentration	1 rxn	96 rxns (+ 20 % extra volym*)	
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX-blandning	4x	1x	6,25		720
SARS-CoV-2 Amp Primers + intern kontrollblandning	2.9x	1x	8,75		1008
Total reaktionsvolym		–	15,00		1728

\* **OBS!** Justera volymerna för SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, och SARS-CoV-2 Amp Primers enligt antal prover som ska testas. Tänk på att ta med extra volym för att kompensera för död volym.

- Dispensera 8 µl nukleasfritt vatten till den brunn som tilldelats NEC.
- Ladda 10 µl nukleasfritt vatten till den brunn som tilldelats NTC.
- Dispensera 2 µl av SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i varje brunn som tilldelats NEC och de beredda proverna.
- Tillsätt 8 µl av det förberedda provet till en brunn med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Tillsätt 15 µl med reaktionsmix berett i steg 5 till de provstickor som dedikerats till prover och kontroller (Bild 6 tillhandahålls som ett exempel). Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Ladda 10 µl av SARS-CoV-2 Positive Control till lämplig brunn. Blanda genom att pipettera upp och ned 5 gånger.
- Försegla PCR-plattan väl för att förhindra korskontaminering. Applicera tryck jämnt utmed hela plattan för att få en tät försegling över individuella brunnar.
- Centrifugera PCR-plattan en kort stund för att samla vätska botten av brunnen.
- Första användning:** Mallen måste vara skapad i QuantStudio 5 Dx TD-programvaran version 1.0.1 eller senare och publicerad innan körningen i QuantStudio 5 Dx IVD-programvaran påbörjas. Ställa in mallen enligt följande:

**OBS!** I fliken **Properties** (Egenskaper), konfigurera **Experiment type** (Experimenttyp) till **Standard Curve** (Standardkurva) och **Run mode** (Körningsläge) till **Standard**.

**OBS!** Ställ in real-time RT-PCR-programmet för 25 µl av reaktionsvolym i fliken **Method** (Metod) (Tabell 16).

**OBS!** Datainsamling bör utföras under hybridiserings-/förlängningssteget.

**OBS!** I fliken **Plate** (Platta), välj **ROX** som **Passive Reference** (Passiv referens) och ställ in FAM, VIC och Cy5 som Targets (mål) utan Quencher (välj **None**, Ingen).

**OBS!** Se *Bruksanvisningen för QuantStudio 5 Dx* för mer information.

15. Ladda mallen som skapades tidigare i Steg 14 i QuantStudio 5 Dx IVD-programvaran. Välj de använda brunnarna och applicera FAM-, VIC- och Cy5-målen.
16. Placera plattan i real-time-cyklern (ett exempel på en PCR-plattlayout visas i Bild 6).
17. Starta körningen.
18. Analysera resultaten i slutet av körningen (se avsnittet Results).

**Tabell 16. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-program för QuantStudio 5 Dx**

Fas	Steg	Tid	Temperatur (°C)	Antal cykler	Insamling
Hold (Håll)	1. Omvänd transkription	10 min	50	1	Nej
	2. PCR initial värmeaktivering	2 min	95	1	Nej
PCR	2-stegscyckling			40	
	Denaturering	5 s	95	1	Nej
	hybridisering/förlängning	30 s	58	1	FAM, VIC och Cy5

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

**Bild 6. Exempel på plattlayout för QuantStudio 5 Dx**

# Resultat

## Analys på RGQ MDx 5plex HRM

På RGQ MDx 5plex HRM, analyseras data med Rotor-Gene Q-programversion 2.3.1 (eller senare) enligt tillverkarens instruktioner (Rotor-Gene Q MDx användarhandbok Revision 7 September 2018).

För dataanalys måste crop cycle (beskär cykel) användas (Bild 7): Öppna Raw-kanalen **Cycling A.Green**. Gå till Options (Alternativ) > **Crop Start Cycles** (Ta bort startcykler) och ange **5** i dialogrutan. En ny kanal skapas med namnet Cycling A(from 5).Green. Samma måste göras för raw-kanalerna Red och Yellow för att skapa kanalerna **Cycling A(from 5).Red** och **Cycling A(from 5).Yellow**.

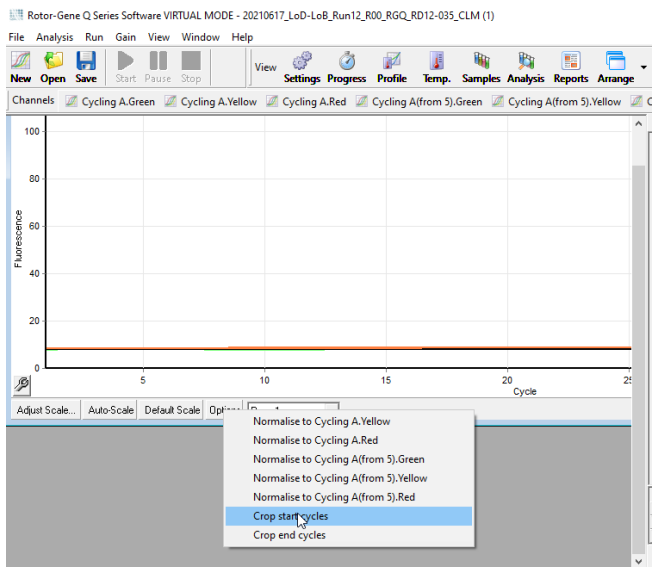


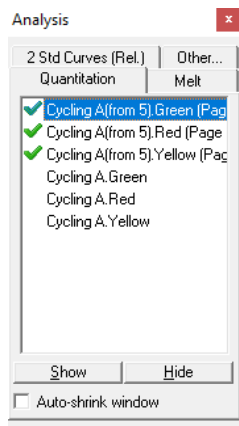
Bild 7. Skärmdump av inställning av cykelbeskärning för RGQ MDx 5plex HRM kör analys

Öppna analysmenyn (Bild 7) och tillämpa följande analysparametrar på varje Cycling A(from 5)-kanal som genereras, för att upprätthålla enhetligheten mellan olika analyser (Tabell 17).

**Tabell 17. Analysparametrar för RGQ MDx 5plex HRM**

Kanaler	Green	Red	Yellow
Tröskelvärde för fluorescens	0,03	0,03	0,03
Lutningskorrigering	Ja	Ja	Ja
Dynamiskt rör	Ja	Ja	Ja
Take off-punkt	Nej	10-20	10-20
Ta bort extremvärden: Tröskelvärde för reaktionseffektivitet	Ja Aktiverat 0 %	Nej	Nej
Beskurna startcykler	5	5	5
Cut-off-cykler	Ct >38,00 behandlas som 40,00	Nej	Ct >35,00 behandlas som 40,00

Körningsresultaten i RGQ-programvaran finns tillgängliga i kvantifieringsresultatrutnätet som öppnas under analysen. Data kan exporteras i kommaavgränsade värden (.csv)-textformat: I fönstret för RGQ-programvaran: Välj **File (Fil) > Save as (Spara som) > Excel analysis sheet (Excel-analysblad)**. Se till att proverna är markerade innan du exporterar resultaten (Bild 8).



**Bild 8. Skärmdump av valda kanaler för tillämpning av analysparametrarna och exportering av resultat (RGQ MDx 5plex HRM kör analys).**

## Analys på ABI 7500 Fast Dx

På ABI 7500 Fast Dx analyseras data med 7500 Fast-programversion 1.4.1 (eller senare) enligt tillverkarens instruktioner. Välj grupp av brunnar eller hela plattan som är tillgänglig i analysen i fliken **setup** (konfigurering) och högerklicka för att öppna brunninspektionsfönstret. De 3 fluoroforer (FAM, VIC och Cy5) måste vara valda och **ROX** måste vara vald som **Passive reference** (Passiv referens). Följande parametrar behövs för konsekvens mellan olika analyser (Tabell 18).

Tabell 18. Analysparametrar för ABI 7500 Fast Dx

Kandlar	FAM	Cy5	VIC
Passiv färg	ROX	ROX	ROX
Tröskelvärde för fluorescens	0,13	0,025	0,05
Baslinjeuppsättning	Auto	Auto	Auto
Cut-off-cykler	Ct >39,00 behandlas som 40,00	Nej	Ct >35,00 behandlas som 40,00

I ABI SDS-programvaran finns Ct-värden för en utvald grupp av brunnar eller hela plattan tillgängliga i **databladet** i huvudavsnittet **Results** (Resultat). Data kan exporteras i kommaavgränsade värden (.csv)-textformat: I SDS-programfönstret väljer du **File** (Arkiv) > **Export** (Exportera) > **Results** (Resultat) (du kan även välja menyobjektet **Ct**). Välj formatet för den exporterade filen som .csv.

## Analys på CFX96 Dx

På CFX96 Dx analyseras data med CFX Manager Dx-programversion 3.1.3090.1022 (eller senare) enligt tillverkarens instruktioner. FAM, HEX och Cy5 måste vara valda för alla brunnar som används i experimentet. Följande parametrar behövs för konsekvens mellan olika analyser (Tabell 19).

**Tabell 19. Analysparametrar för CFX96 Dx**

Kanaler	FAM	HEX	Cy5
Cq determination mode (Cq-bestämningsläge): Single threshold (Enkelt tröskelvärde)	Ja	Ja	Ja
Utgångsinställning:			
• subtraherad grafpassning	Ja	Ja	Ja
• Tillämpa driftkorrektur för fluorescens	Ja	Ja	Ja
Tröskelvärde (RFU)	250	300	100
Cut-off-cykler	Ct >39,00 behandlas som 40,00	Ct >35,00 behandlas som 40,00	Nej

I CFX manager Dx-programvaran finns Ct-värden (kallas **Cq** i programvaran) för en utvald grupp av brunnar eller hela plattan tillgängliga i databladet i avsnittet **Quantification Data** (Kvantifieringsdata). Data kan exporteras som text med kommaseparerade värden (.csv) genom att välja **Export** (Exportera) > **Custom Export** (Anpassad exportering) och ställa in parametrarna enligt Bild 9.



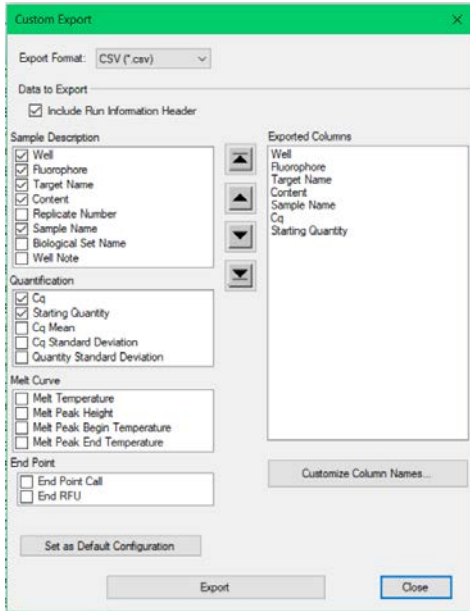


Bild 9. Råa datafilparametrar för CFX96 Dx

## Analys på cobas z 480

På cobas z 480 analyseras data med LightCycler 480 SW UDF version 2.0.0 (eller senare) enligt tillverkarens instruktioner. Skapa en delmängd av prover med endast de brunnar som använts i experimentet. Skapa för varje kanal en **Abs Quant/Fit Points** (Absolut kvantifiering/passpunkter)-analysida och använd följande parametrar för konsekvens mellan olika experiment (Tabell 20).

**Tabell 20. Analysparametrar för cobas z 480**

Kanaler	FAM (465-510)	HEX (540-580)	ATTO647N (610-670)
Fliken Cycle range (Cykelintervall)			
• Första-sista cykeln	1-40	1-40	6-40
• Bakgrund	5/10	5/10	6/11
Fliken Noise band (Bullerband)	STD-multiplikator	STD-multiplikator	STD-multiplikator
• Metod			
• STD-multiplikatorvärde	50	40	25
Fliken Analysis (Analys)	2	2	2
• Fit points (Passpunkter)			
• Metod för tröskelvärde	Auto	Auto	Auto
<b>Cut-off-cykel</b>	Ct >39,00 behandlas som 40,00	Ct >35,00 behandlas som 40,00	Nej

I LightCycler 480 SW UDF version 2.0.0 (eller senare) finns Ct-värden (kallas **Cp** i programvaran) för en utvald grupp av brunnar eller hela plattan tillgängliga i avsnittet **analysis** (analys) (Bild 10). Data kan exporteras i textfilformat (**.txt**) per kanal genom att högerklicka på resultattabellen och välja **Export table** (Exportera tabell).

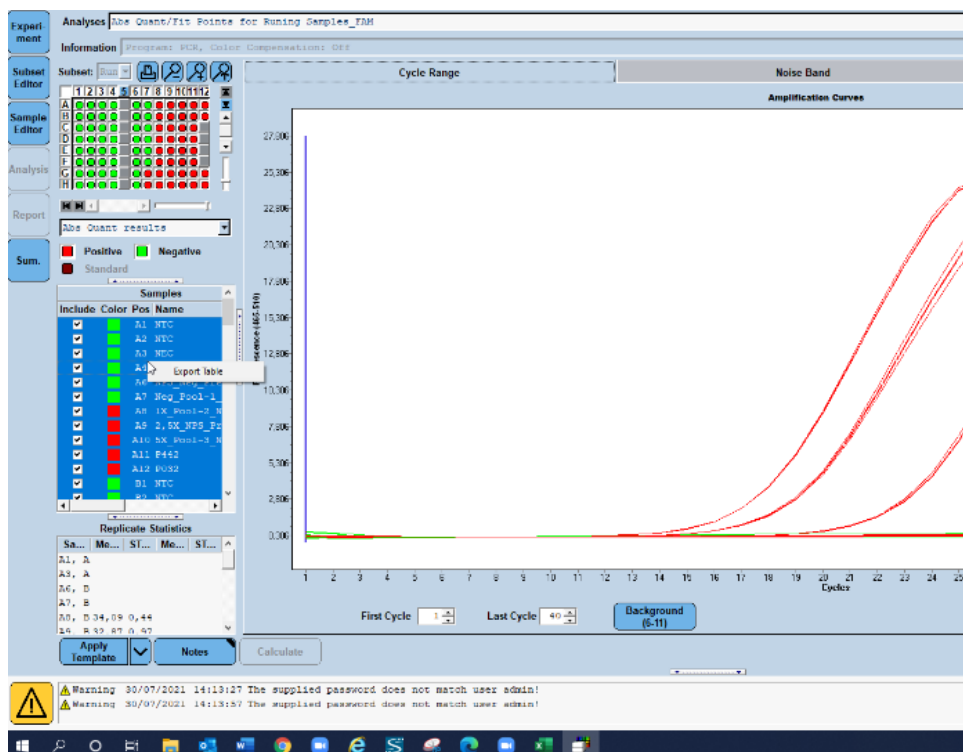


Bild 10. Skärmdump av exporterade data i LightCycler 480 SW UDF version 2.0.0 (eller senare).

## Analys på QuantStudio 5 Dx

På QuantStudio 5 Dx analyseras data med QuantStudio 5 Dx IVD-programversion 1.0.1 (eller senare) enligt tillverkarens instruktioner. De 3 fluoroforerna (FAM, VIC och Cy5) måste i fönstret **Assign Targets and Samples** (Tildela mål och prover) vara valda för de brunnar som används i experimentet och **ROX** måste vara vald som **Passive reference** (Passiv referens). Följande parametrar behövs för konsekvens mellan olika analyser (Tabell 21).

Tabell 21. Analysparametrar för QuantStudio 5 Dx

Kanaler	FAM	VIC	Cy5
Passiv färg	ROX	ROX	ROX
Tröskelvärde för fluorescens	0,21	0,062	0,04
Baslinjeuppsättning	Auto	Auto	Auto
Cut-off-cykler	Ct >39,00 behandlas som 40,00	Ct >35,00 behandlas som 40,00	Nej

Data kan exporteras som kalkylblad eller text (.xls, .xlsx, .txt). I fliken **Export** (Exportera) i QuantStudio 5 Dx IVD-programvarans fönster: Välj alla alternativ i avsnittet **content** (innehåll) och välj alternativet **unify the above content into one file** (sammanställ ovanstående innehåll till en fil).

# Tolkning av resultat

Den positiva kontrollen (Positive Control, PC), N1- och N2-generna detekteras i fluorescenskanalen Green med RGQ MDx 5plex HRM eller i fluorescenskanalen FAM på ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 och QuantStudio 5 Dx.

Provtagningskontrollen, bestående av RNase P, detekteras i fluorescenskanalen Yellow med RGQ MDx 5plex HRM eller i fluorescens VIC/HEX med ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 och QuantStudio 5 Dx. Varje kliniskt prov ska visa en provkontrollamplifiering. I PC kan en amplifiering av Yellow observeras trots frånvaro av humana sekvenser. I det här fallet kan signalen i PC Yellow-kanalen ignoreras eftersom den starka fluorescenssignalen i Green-kanalen kan läcka in i Yellow-kanalen. Den interna kontrollen (Internal Control, IC) ingår i SARS-CoV-2 Amp Primers. Den detekteras i kontroll utan mall (No Template Control, NTC), kontroll utan extraktion (No Extraction Control, NEC), positiv kontroll (Positive Control, PC) och kliniska prover med Red fluorescenskanal med RGQ MDx 5plex HRM eller i fluorescenskanalen Cy5/ATTO647N med ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 och QuantStudio 5 Dx. För att en real-time RT-PCR-körning ska vara giltig måste PC-, NTC- och NEC-kontroller utföras enligt (Tabell 22, Tabell 23).

**Tabell 22. Körningsvaliditetskriterier och resultatolkning för RGQ MDx 5plex HRM**

Kontroll	Detektion i Green-kanalen	Detektion i Yellow-kanalen	Detektion i Red-kanalen	Tolkning
<b>Positiv kontroll (Positive Control, PC)</b>	Ct ≤38,00	Likgiltigt	Likgiltigt	PC är giltig.
	Ct >38,00 eller Ingen Ct	Likgiltigt	Likgiltigt	PC är ogiltig.
<b>Kontroll utan mall (No Template Control, NTC) eller Kontroll utan extraktion (No Extraction Control, NEC)</b>	Ct >38,00 eller Ingen Ct	Ct >35,00 eller Ingen Ct	Ja	NTC/NEC är giltig.
	Alla andra kombinationer med amplifiering i Green eller Yellow		Likgiltigt	NTC/NEC är ogiltig.

Tabell 23. Körningsvaliditetskriterier och resultatolkning för real-time RT-PCR-instrumenten ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 och QuantStudio 5 Dx

Kontroll	Detektion i FAM-färg*	Detektion i VIC/HEX-färg*	Detektion i Cy5/ATTO647N-färg*	Tolkning
<b>Positiv kontroll (Positive Control, PC)</b>	Ct ≤39,00	Likgiltigt	Likgiltigt	PC är giltig.
	Ct > 39,00 eller Ingen Ct	Likgiltigt	Likgiltigt	PC är ogiltig.
<b>Kontroll utan mall (No Template Control, NTC) eller</b>	Ct >39,00 eller Ingen Ct	Ct >35,00 eller Ingen Ct	Ja	NTC/NEC är giltig.
<b>Kontroll utan extraktion (No Extraction Control, NEC)</b>	Alla andra kombinationer med amplifiering i FAM eller VIC/HEX		Likgiltigt	NTC/NEC är ogiltig.

Om du vill validera de analyserade proverna måste de amplifieras och detekteras som förväntat.

Tabell 24. Provaliditetskriterier och resultatolkning för RGQ MDx 5plex HRM

Detektion i Green-kanalen	Detektion i Yellow-kanalen	Detektion i Red-kanalen	Tolkning
Ct ≤38,00	Likgiltigt	Likgiltigt	Provet är positivt för SARS-CoV-2 RNA.
Ct >38,00 eller Ingen Ct	Ct ≤35,00	Likgiltigt	Provet är negativt, SARS-CoV-2 RNA har inte detekterats.
Ct >38,00 eller Ingen Ct	Ct >35,00 eller Ingen Ct	Ja	Ogiltigt prov. Inget eller otillräcklig humant material detekterat. Omtagning av provet krävs.
Ct >38,00 eller Ingen Ct	Ct >35,00 eller Ingen Ct	Nej	Ogiltigt prov. Real time RT-PCR-reaktionen är hämmad. Det behöver testas om.

**Tabell 25. Provaliditetskriterier och resultatolkning för real-time RT-PCR-instrumenten ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480, and QuantStudio 5 Dx.**

Detektion i FAM-färg*	Detektion i VIC/HEX-färg*	Detektion i Cy5/ATTO647N-färg*	Tolkning
Ct ≤39,00	Likgiltigt	Likgiltigt	Provtagningen är positiv.
Ct >39,00 eller Ingen Ct	Ct ≤35,00	Likgiltigt	Provet är negativ, SARS-CoV-2 har inte detekterats.
Ct >39,00 eller Ingen Ct	Ct >35,00 eller Ingen Ct	Ja	Ogiltigt prov. Inget humant material detekterat. Omtagning av provet krävs.
Ct >39,00 eller Ingen Ct	Ct >35,00 eller Ingen Ct	Nej	Ogiltigt prov. Real time RT-PCR-reaktionen är hämmad. Det behöver testas om.

# Begränsningar

- Endast för *in vitro*-diagnostisk användning.
- Resultat från *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit bör inte användas som den enda grund för diagnos, behandling eller andra patientvårdsbeslut. Negativa resultat utesluter inte infektion med SARS-CoV-2 och ska inte ligga som enda grund för patientbehandlingsbeslut.
- Produkten ska användas av personal som särskilt utbildats i *in vitro*-diagnostiska procedurer.
- Strikt efterlevnad av real-time RT-PCR-plattformens användarhandbok (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 eller QuantStudio 5 Dx) krävs för optimala PCR-resultat.
- Var noga med att uppmärksamma de utgångsdatum som är angivna på kartongen och etiketterna för alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat.
- Prestandan för analysen har inte fastställts för salivprov från patienter utan tecken och symptom på luftvägsinfektion.
- För att undvika risk för falskt negativt resultat ifall lågt positivt kliniskt prov testas: Om blodspår observeras i provröret bör detta registreras och om provet ger ett negativt resultat vid användning av *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit bör provet samlas in igen från patienten och testas igen med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.



# Prestanda

## Analytisk sensitivitet (Detektionsgräns)

Den analytiska sensitiviteten eller detektionsgränsen definieras som den lägsta koncentrationen där  $\geq 95$  % av testade prover ger ett positivt resultat. LoD utvärderades genom att analysera seriella spädningar av negativa nasofarynxprover och likvifierade utspädda salivprover beredda med högtiter-stamlösningar med inaktiverade virala partiklar erhållna från kommersiella leverantörer (ZeptoMetrix®). Två provpooler användes för varje prov för LoD-experimenten. För att bekräfta etablerad LoD-koncentration måste detektionsnivån för alla replikat vara  $\geq 95$  % (minst 19/20 replikat måste generera en positiv signal).

LoD-koncentrationen verifierades på nasofarynxprov och utspädda salivprov på de påstådda real-time RT-PCR-plattformarna (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx och cobas z 480).

### Näs-, orofarynx- och nasofarynxprover

LoD påstås vid 950 cp/ml för RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx och QuantStudio 5 Dx och 475 cp/ml för cobas z 480 (se Tabell 26)

### Outspädda salivprover

LoD påstås vid 950 cp/ml för RGQ MDx och 1200 cp/ml för ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx och CFX96 Dx (se Tabell 26).

Tabell 26. LoD-resultatsammanfattning för varje real time RT-PCR-plattform

Plattform	Provtyp	LoD verifierad (cp/ml)
RGQ MDx	NPS	950
	Outspädd saliv	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Outspädd saliv	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Outspädd saliv	1200
cobas z 480	NPS	475
	Outspädd saliv	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Outspädd saliv	1200

## Analytisk specificitetsstudier (inklusiveitet och exklusivitet/korsreaktivitet)

### Inklusivitet

Inklusiviteten för *artus* SARS-CoV-2 Amp primrar och sökfragment har utvärderats med en *in silico*-analys av sekvenser tillgängliga i GISAID-databasen ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)). Totalt 722 488 sekvenser (tillgängliga på 23/03/2021) analyserades i COVID CG (<https://covidcg.org>), med hjälp från GISAID-metadata. Sekvenserna justerades mot WIV04-referenssekvensen (100 % identisk med Wuhan-Hu-1/NC\_045512.2, förutom längden på poly-A-svansen) och de enskilda nukleotid-variationerna (Single Nucleotide Variation, SNV) analyserades i den genomiska region som *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit primrar och sökfragment riktar in sig mot. Förekomsten av identifierade enskilda nukleotid-variationer höll sig under 1 %, samt frekvensen för samförekommande mutationer. Ingen SNV påträffades vid de sista 1 till 3 nukleotiderna från 3'-ändan i respektive oligonukleotider, vilket hade förväntats ha en påverkan på prestandan. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit anses kunna detektera 100 % av publicerade sekvenser.

## Exklusivitet/korsreaktivitet

### In silico-analys

Exklusiviteten för *artus* SARS-CoV-2 Amp primrar och sökfragment har utvärderats med en *in silico*-analys av sekvenser lagrade i NCBI-databasen. *In silico*-analys visade att några av de testade patogenen hade mer än 80 % homologi med en av *artus* SARS-CoV-2 primrar eller sökfragment. Bland dessa är *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes*, och *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* hade mindre än 80 % homologi med en av primrarna/sökfragmenten i SARS-CoV-2-analysen. *artus* SARS-CoV-2 Amp primrar och sökfragment uppvisade dock ingen möjlig amplifiering med de olika sekvenserna som fanns lagrade i NCBI nr/nt-databasen.

Totalt 36 bakteriella, virala och fungala strängar (Tabell 27) har analyserats med *in silico* PCR med en begränsad potentiell amplikonstorlek på 500 bp. Patogensekvenserna samlades in från NCBI-databasen. Inget av dessa patogen uppvisade dock amplifiering *in silico*. Tabell 27 visar en lista över de patogen som har testats *in silico*.

**Tabell 27. Lista över *in silico*-testade patogen.**

Patogen	Sträng/typ	Taxonomiskt ID	<i>In silico</i> PCR-resultat
Adenovirus typ 3	Typ 3	45659	Ingen matchning
Adenovirus typ 4	Typ 4	28280	Ingen matchning
Adenovirus typ 5	Typ 5	28285	Ingen matchning
Adenovirus typ 7A	Typ 7A	85755	Ingen matchning
Adenovirus typ 14	Typ 14	10521	Ingen matchning
Adenovirus typ 31	Typ 31	10529	Ingen matchning
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Ingen matchning
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Ingen möjlig amplifiering*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Ingen matchning
Enterovirus	Typ 68	42789	Ingen matchning

\* Sekvensmatchning med en av primrarna/sökfragmenten uppvisade <80 % homologi.

† Sekvensmatchning med en av primrarna/sökfragmenten uppvisade ≥80 % homologi.

(fortsätter på nästa sida)

**Tabell 27. (Fortsätter från föregående sida)**

Patogen	Sträng/typ	Taxonomiskt ID	<i>In silico</i> PCR-resultat
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Ingen matchning
Humant coronavirus	229E	11137	Ingen matchning
Humant coronavirus	NL63	277944	Ingen matchning
Humant coronavirus	HKU-1	290028	Ingen matchning
Humant coronavirus OC43	OC43	31631	Ingen matchning
Humant coronavirus	MERS-CoV	1335626	Ingen matchning
Humant metapneumovirus	Ej relevant	162145	Ingen matchning
Influenza A	H1N1	114727	Ingen matchning
Influenza A	H3N2	119210	Ingen matchning
Influenza B	Ej relevant	11520	Ingen matchning
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Ingen matchning
Parainfluenzavirus	Typ 1	12730	Ingen matchning
Parainfluenzavirus	Typ 2	2560525	Ingen matchning
Parainfluenzavirus	Typ 3	11216	Ingen matchning
Parainfluenzavirus	Typ 4	2560526	Ingen matchning
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Ingen matchning
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Ingen möjlig amplifiering*
Respiratoriskt syncytialvirus	Typ A (RSV-A)	208893	Ingen matchning
Respiratoriskt syncytialvirus	Typ B (RSV-B)	208895	Ingen matchning
Rhinovirus	Typ A	147711	Ingen matchning
Rhinovirus	Typ B	147712	Ingen matchning
SARS-coronavirus	Tor2	694009	Ingen möjlig amplifiering†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ej relevant	1282	Ingen matchning
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Ej relevant	1314	Ingen möjlig amplifiering†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Ingen möjlig amplifiering†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Ingen matchning

\* Sekvensmatchning med en av primärna/sökfragmenten uppvisade <80 % homologi.

† Sekvensmatchning med en av primärna/sökfragmenten uppvisade ≥80 % homologi.

### In vitro-analys

Korsreaktiviteten verifierades *in vitro* med patogen som uppvisade  $\geq 80$  % homologi med SARS-CoV-2 Amp Primers i *in silico*-analys. Proverna bereddes genom att spetsa potentiellt korsreaktiva organismer i näs-svalgsvabbnmatris vid  $10^6$  cp/ml, förutom SARS-CoV-1 som testades utan spädning i enlighet med leverantörens rekommendation. Inget av dessa patogen uppvisade korsreaktivitet *in vitro*.

Den mikrobiella interferensen för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit-analysen har utvärderats *in vitro* mot en panel av rekommenderade patogen (Tabell 28). Proverna bereddes genom att spetsa max 5 patogen – vid 105 TCID50/mL för virala mål,  $10^6$  cp/mL för bakteriella och fungala mål, eller till högsta möjliga koncentration baserat på stamlösningen – till negativa nasofarynxsvabbar spetsade till  $2,87 \times \text{LoD}$  med inaktiverade SARS-CoV-2-partiklar (Zeptomatrix). NATrol™-panelerna och SARS-CoV-1 spetsades direkt med inaktiverade virala SARS-CoV-2-partiklar (Zeptomatrix) till  $2,87 \times \text{LoD}$ . Resultaten för varje testad mikroorganismpool och respektive koncentrationer sammanfattas nedan.

Tabell 28 visar listan testade patogen i mikrobiell interferens.

**Tabell 28. Lista med *in vitro*-testade patogen i mikrobiell interferens.**

Pool-ID/ prov-ID	Mikroorganism	Källa	Slutlig koncentration	Enhet	Resultat
<b>Pool 1</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ingen interferens
	Humant coronavirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Humant coronavirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/ml	
	Humant coronavirus 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	
<b>Pool 2</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ingen interferens
	Adenovirus T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/ml	
	Parainfluensavirus 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/ml	
	Inflensa B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Rhinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/ml	

(fortsätter på nästa sida)

Tabell 28 (fortsätter från föregående sida)

Pool-ID/ prov-ID	Mikroorganism	Källa	Slutlig koncentration	Enhet	Resultat
<b>Pool 3</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ingen interferens
	Parainfluensavirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3,30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4,60E+06	CFU/ml	
<b>Pool 4</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ingen interferens
	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	
<b>Pool 5</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Ingen interferens
	Respiratoriskt syncytialvirus RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influensa A H1N1 Kalifornien	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterovirus typ 68 huvudgrupp	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Adenovirus T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
<b>Pool 6</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ingen interferens
	MERS-coronavirus	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Adenovirus T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Humant metapneumovirus (hMPV) Typ B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Respiratoriskt syncytialvirus typ B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(fortsätter på nästa sida)

Tabell 28 (fortsätter från föregående sida)

Pool-ID/ prov-ID	Mikroorganism	Källa	Slutlig koncentration	Enhet	Resultat
Pool 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ingen interferens
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Parainfluensavirus 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenta A H3N2 Schweiz/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Pool 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ingen interferens
	NATrol Panel RP1 (Influenta A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenta A H1N1 (NY/02/2009), Rhinovirus (Typ 1A), Adenovirus T3, Parainfluenta T1, Parainfluensavirus T4, Metapneumovirus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Coxsackievirus (Typ A1)	Zeptomatrix (MDZ001)	Okänt*	Ej relevant	
Pool 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ingen interferens
	NATrol Panel RP2 (Influenta A H1 (Nya Kaledonien/20/99), Influenta B (Florida/02/06), RSV-A, Parainfluenta T2, Parainfluenta T3, Coronavirus HKU rekombinant, Coronavirus (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639)	Zeptomatrix (MDZ001)	Okänt*	Ej relevant	
Pool 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Ingen interferens
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS- ST)	Okänt*	Ej relevant	

\* Koncentrationer har inte kommunicerats av leverantören.

## Interfererande ämnen

### Näs-, orofarynx- och nasofarynxsvabbprov

Effekten av putativa interfererande ämnen (för de ämnen som listas i Tabell 29) har utvärderats på prestandan för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Testerna utfördes i 3 pooler med negativa näs-svalgsvabbar i 3 pooler med positiva näs-svalgsvabbar spetsade till 4 x LoD med inaktiverade virala SARS-CoV-2-partiklar (Zeptomatrix). Experimenten utfördes på RGQ MDx 5plex HRM-plattformen (över 4 instrument) av 1 operatör med 1 pilotkit.

Varje pool delades upp i 2 för att testa antingen det interfererande ämnet upplöst i lösningsmedel (testprov) eller enbart lösningsmedlet (kontrollprov). Träffar i fluorescenskanalerna Green och Red jämfördes mellan testet och dess motsvarande kontrollprover. I frånvaro av interferens hade testet och dess motsvarande kontrollprover samma träffar.

Tabell 29 visar att ingen av de testade substanserna interfererar med prestandan för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i fluorescenskanalen Green.

Tabell 29. Lista med interfererande ämnen och träffgraderna som erhålls i Green-kanalen.

Interfererande ämnen	Funktion	Testkoncentration	Resultat för träffgrad i negativ nasofarynxsvabb	Resultat för träffgrad i positiv (4x LoD) nasofarynxsvabb
<b>Tobramycin</b>	Systemisk antibiotika	1 mg/ml	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
<b>Mupirocin</b>	Nasal antibiotisk kräm	6,6 mg/ml	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
<b>Flutikason</b>	Nasal kortikosteroid	5 % (v/v)	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
<b>Mentol (halstabletter)</b>	Oralt bedövningsmedel och smärtstillande	0,5 mg/ml	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
<b>Oxymetazolin</b>	Nässprej	10 % (v/v)	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15

Fortsätter på nästa sida



Tabell 29 (fortsätter från föregående sida)

Interfererande ämnen	Funktion	Testkoncentration	Resultat för träffgrad i negativ nasofarynxsvabb	Resultat för träffgrad i positiv (4x LoD) nasofarynxsvabb
<b>Osetamivir</b>	Antiviralt läkemedel	3,3 mg/ml	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
<b>Mucin (bovin submandibulariskörtel typ I-S)</b>		2,5 mg/ml	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
<b>Helblod</b>		4 % (v/v)	Ingen interferens 1/15*	Ingen interferens 15/15

\* En amplifiering motsvarande en artefakt har detekterats.

### Outspädda salivprover

Effekten av åtta putativa interfererande ämnen (för de ämnen som listas i Tabell 30) har utvärderats på prestandan för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*. Testerna utfördes i 1 pool av negativa utspädda salivprover, som har delats i två delar för att genomföra två spädningsnivåer: (1) negativa utspädda salivprover och (2) konstruerade positiva utspädda salivprover (som erhålls genom att spetsa vid 3x LoD (3600 cp/ml) med inaktiva SARS-CoV-2-viruspartiklar (Zeptomatrix) i den negativa poolen). Outspädda salivprover testades med cobas z 480-plattformen av 3 operatörer med ett kommersiellt kit.

För varje interfererande ämne delades provreplikaten upp i 2 för att testa antingen det interfererande ämnet upplöst i lösningsmedel (testprov) eller enbart lösningsmedlet (kontrollprov). Träffar i fluorescenskanalerna Green, Red och Yellow jämfördes mellan testet och dess motsvarande kontrollprover. I frånvaro av en interferens hade testet och dess motsvarande kontrollprover samma träffar.

Vad gäller kvalitativ (provstatus-) analys påverkade inte de åtta interfererande ämnena som testades (se Tabell 30) resultaten för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* på positiva och negativa salivprover.

Tabell 30 visar att ingen av de testade substanserna interfererar med prestandan för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i fluorescenskanalen Green.

Tabell 30. Lista med interfererande ämnen och träffgraderna som erhålls i Green-kanalen.

Interfererande ämne*	Funktion	Testkoncentration	Resultat för träffgrad i negativa utspädda salivprover	Resultat för träffgrad i positiva (3 till 5x LoD) utspädda salivprover
<b>Helblod</b>	Endogent ämne: Humant gDNA, leukocyter, erythrocyter	1% v/v	Ingen interferens* 0/8	Ingen interferens* 8/8
<b>Altoids®</b>	Godis	2 vikt/volymprocent	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
<b>Aspirin</b>	Antiinflammatoriskt läkemedel	1 vikt/volymprocent	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
<b>Listerine®</b>	Antiseptiskt munsköljmedel	1% v/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
<b>Ricola®</b>	Godis	1 vikt/volymprocent	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
<b>Colgate® Total SF Whitening™ tandkräm</b>	Tandblekande tandkräm	0,1 vikt/volymprocent	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
<b>Tussidane® Sirop</b>	Läkemedel mot torrhosta	1% v/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
<b>Pulmofluide®</b>	Läkemedel mot slemhosta	1% v/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8

\*För helblod observerades en interfererande effekt för IC-detektion i Red-kanalen (10–40 % av inhibition) utan påverkan på provets validitet. På Green-kanalen påverkades in provstatusen av helblodet, men en svag Ct-drift observerades (i genomsnitt 1,35 Ct senare med helblod jämfört med kontrollprovet).

För att undvika risk för falskt negativt resultat ifall lågt positivt kliniskt prov testas: Om blodspår observeras i provröret bör detta registreras och om provet ger ett negativt resultat vid användning av *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit bör utspädd saliv samlas in igen från patienten och provet testas igen med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

## Provstabilitetsstudie

Provstabilitetsstudien genomfördes för att bedöma påverkan av olika förvaringsförhållanden för prover på kvalitativa (analys av träffgrad) och kvantitativ (analys av Ct-drift) resultat för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM kits. Experiment utfördes genom analys av två spädningsnivåer: (1) negativa prover och (2) konstruerade positiva prover som erhålls genom att spetsa inaktiva SARS-CoV-2-viruspartiklar (Zeptomatrix). För att bekräfta provernas stabilitet (saliv och NPS) krävdes att  $\geq 95\%$  av replikaten ger samma träffgrad och en Ct-drift på  $\leq 10\%$  än tidpunkten 0 för varje stabilitetsförhållande inträffar.

### Näs-, orofarynx- och nasofarynxprover:

De olika stabilitetsförhållandena som testas finns listade i Tabell 31. Tester utfördes med 3 provpooler. Negativa NPS-prover, 5x LoD (4750 cp/ml) av konstruerade positiva NPS-prover och tre loter av satsfrisläppningsprover BRS1 (N2-sträng, 1000 cp/10  $\mu$ L), BRS2 (RNAse P gblock, 1000 cp/10  $\mu$ L) och BRS3 (N1-sträng, 1000 cp/10  $\mu$ L) testades med ABI 7500 Fast Dx-plattformen.

Utifrån de kvalitativa och kvantitativa analysresultaten påverkade inte de testade förvaringsförhållandena för NPS-proverna träffgraden (förväntad status upptäcktes) och de ledde inte till signifikant Ct-drift av resultaten för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM kit. Därmed var kitets prestanda stabil trots alla de olika förvaringsförhållandena för NPS-prov som testades (se Tabell 31).

Tabell 31 visar nasofarynxprovernas stabilitetsförhållanden

**Tabell 31. Stabilitetsförhållanden för nasofarynxprov.**

Förhållanden	Påstående om provstabilitet
Frysning/upptining	3 frysningar/upptiningar
4 °C (2 °C till 8 °C)	72 h
-70 °C	2 veckor

## Outspädda salivprover

De olika stabilitetsförhållandena som testas finns listade i Tabell 32. Tester utfördes med 2 provpooler. Negativa utspädda salivprover och 3xLoD (3600 cp/ml) av konstruerade positiva utspädda salivprover testades med ABI 7500 Fast Dx-plattformen.

Utifrån de kvalitativa och kvantitativa analysresultaten påverkade inte de testade förvaringsförhållandena träffgraden (förväntad status upptäcktes) och de ledde inte till signifikant Ct-drift av resultaten för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM kit*. Därmed var kitets prestanda stabil trots de olika förvaringsförhållandena för utspädda salivprov som testades.

Tabell 32 visar stabilitetsförhållandena för utspädd saliv.

**Tabell 32. Stabilitetsförhållande för utspädd salivprov**

Förhållanden	Påstående om provstabilitet
Frysning/upptining	3 frysningar/upptiningar
Rumstemperatur (18 °C till 26 °C)	72 h
4 °C (2 °C till 8 °C)	72 h
Kombinerade förhållanden: 6 h i rumstemperatur kombinerat med 72 h i 4 °C (2 till 8 °C) kombinerat med 8 dagar i -20 °C (-30 °C till -15 °C)	6 h rumstemperatur, sedan 72 h vid 4 °C (2 till 8 °C), sedan 7 dagar -20 °C (-30 °C till -15 °C)
-20 °C (-30 °C till -15 °C)	1 månad (30,5 dagar)

## Precision

Precisionsstudien utvärderade reproducerbarheten (samma prov upprepas under olika körningar och förhållanden: 5 dagar, 3 kitloter, 3 operatörer och 2 instrument) och repeterbarheten (samma prov upprepas vid samma körning och förhållande). Testerna utfördes på negativa nasofarynxprover och negativa nasofarynxprover spikade till 5 x LoD på RGQ MDx.

För varje spädningsnivå samlades 204 datapunkter in. Repeterbarhets- och reproducerbarhetsdata användes för att fastställa standardavvikelse (Standard Deviation, SD) och variationskoefficient (Coefficient of Variation, %CV) för SARS-CoV-2-målen i kanalerna Green, Yellow och Red. Tabell 33 visar att *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit har en övergripande precision på 0,63 SD (2,03 % CV) i Green-kanalen, 0,54 SD (2,22 % CV) i Yellow-kanalen och 1,28 SD (4,10 % CV) i Red-kanalen.

**Tabell 33. Standardavvikelse och variationskoefficient för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.**

Prover och detektionskanal	Totalt	Mellan dagar	Mellan batcher	Mellan operatörer	Mellan instrument	Mellan körningar	Inom körning
<b>Standardavvikelse (Standard Deviation, SD) (variationskoefficient (Coefficient of Variation, %CV))</b>							
Negativ NPS	0,54	0,09	0,10	0,06	0,11	0,09	0,50
Yellow-kanal	(2,22)	(0,37)	(0,42)	(0,27)	(0,47)	(0,36)	(2,05)
Negativ NPS	1,15	0,0	0,55	0,00	0,12	0,39	0,92
Red-kanal	(3,68)	(0,00)0	(1,76)	(0,00)	(0,40)	(1,26)	(2,96)
Spetsad NPS	0,63	0,18	0,31	0,00	0,08	0,00	0,51
Green-kanal	(2,03)	(0,59)	(1,00)	(0,00)	(0,25)	(0,00)	(1,64)
Spetsad NPS	0,47	0,13	0,24	0,05	0,18	0,00	0,33
Yellow-kanal	(1,93)	(0,53)	(0,98)	(0,20)	(0,73)	(0,00)	(1,38)
Spetsad NPS	1,28	0,12	0,58	0,11	0,00	0,49	1,02
Red-kanal	(4,10)	(0,37)	(1,84)	(0,34)	(0,00)	(1,57)	(3,27)

## Klinisk prestanda

### Nasofarynxsvabbar

Klinisk prestanda för *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-analysen utvärderades med retrospektiva nasofarynxsvabbsprov i transportmedium, bestående av 150 kliniska prover.

Alla prover samlades in från patienter med tecken och symptom på COVID-19-infektion och förvarades frysta fram tills användning.

Den kliniska valideringen utfördes på ABI 7500 Fast Dx. Tabell 34 rapporterar prestandan för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* jämfört med referensmetoden.

**Tabell 34. Klinisk prestanda för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* jämfört med en referensmetod.**

Provstatus	N	% av positivt	95 % KI	% negativt	95 % KI
Positivt	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Negativt	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7–97,8

Avvikande resultat utvärderades av en tredje metod och återanalyserades med en kontingenstabell. Övergripande kliniska prestandaresultat uttrycks som positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA) och negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA) och visas i Tabell 35.

**Tabell 35. Klinisk prestanda för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* efter analys av avvikande resultat.**

Provstatus	N	% positivt	95 % KI	% negativt	95 % KI
Positivt	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Negativt	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7–97,8

Nedan anges provens fraktioner i överensstämmelse och positiv och negativ överensstämmelse i procent (PPA respektive NPA) med förväntade provstatusar:

Positiv överensstämmelse i procent

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

Negativ överensstämmelse i procent

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

## Nasofarynxsvabbar inklusive asymtomatiska personer

Klinisk prestanda för *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-analysen utvärderades med retrospektiva nasofarynxsvabbprov i transportmedium, bestående av 153 kliniska prover.

Alla prover togs på patienter utan symptom eller annan orsak att misstänka COVID-19-infektion.

Den kliniska valideringen utfördes på ABI 7500 Fast Dx. Sexton prover exkluderades från analys efter test med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit på grund av ogiltig status i enlighet med kriterierna för provvaliditet (Tabell 23).

Tabell 36 rapporterar prestandan för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jämfört med referensmetoden vilken uttrycks som positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA) och negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA).

**Tabell 36. Klinisk prestanda för *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jämfört med en referensmetod**

Provstatus	N	% av positivt	95 % KI	% negativt	95 % KI
Positivt	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	36,0 (18/50)	–
Negativt	87	1,15 (1/87)	–	98,85 (86/87)	93,8–99,8

Nitton avvikande resultat utvärderades med en tredje metod och återanalyserades med en kontingenstabell. Övergripande kliniska prestandaresultat uttrycks som positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA) och negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA) och visas i Tabell 37.

Tabell 37. Klinisk prestanda för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* efter analys av avvikande resultat

Provstatus	N	% av positivt	95 % KI	% negativt	95 % KI
Positivt	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0 (0/32)	-
Negativt	105	0,95 (1/105)	-	99,05 (104/105)	94,8–99,8

Arton falskt negativa resultat omklassificerades som sanna negativa resultat medan ett falskt positivt förblev falskt positivt.

Nedan anges provens fraktioner i överensstämmelse och positiv och negativ överensstämmelse i procent (PPA respektive NPA) med förväntade provstatusar:

Positiv överensstämmelse i procent

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

Negativ överensstämmelse i procent

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

### Outspädda salivprover

Klinisk prestanda för *artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp*-analysen utvärderades med outspädda salivprov, bestående av 142 salivprov.

Alla prover samlades in från patienter med tecken och symptom på COVID-19-infektion. Den kliniska valideringen utfördes på ABI 7500 Fast Dx. Tolv prover exkluderades från analys efter test med *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* och även med referensmetoden på grund av att båda tester gav ogiltig status i enlighet med kriterierna för provvaliditet.

Tabell 38 rapporterar prestandan för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* jämfört med referensmetoden.



**Tabell 38. Klinisk prestanda för artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jämfört med en referensmetod.**

Provstatus	N	% av positivt	95 % KI	% negativt	95 % KI
Positivt	45	93,33 (42/45)	82,14–97,71	6,67 (3/45)	-
Negativt	85	0 (0/85)	-	100 (85/85)	95,68–100,00

Tre avvikande resultat utvärderades av en tredje metod och återanalyserades med en kontingenstabell. Övergripande kliniska prestandaresultat uttrycks som positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA) och negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA) och visas i Tabell 39.

**Tabell 39. Klinisk prestanda för artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit efter analys av avvikande resultat.**

Provstatus	N	% positivt	95 % KI	% negativt	95 % KI
Positivt	43	97,67 (42/43)	87,94–99,59	2,32 (1/43)	-
Negativt	87	0 (0/87)	-	100 (87/87)	95,77–100,00

Två falskt negativa resultat omklassificerades som sanna negativa resultat medan ett falskt negativt resultat förblev falskt negativt.

Nedan anges provens fraktioner i överensstämmelse och positiv och negativ överensstämmelse i procent (PPA respektive NPA) med förväntade provstatusar:

Positiv överensstämmelse i procent

(Positive Percent Agreement, PPA):  $42/43 = 97,67\%$  (95 % KI: 87,94–99,59 %)

Negativ överensstämmelse i procent

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

---

# Referenser

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>

# Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp att lösa eventuella problem som uppstår. Mer information finns på sidan Vanliga frågor (Frequently Asked Questions, FAQ) på vårt tekniska supportcenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx).

## Kommentarer och förslag på åtgärd

### Svag eller Ingen Green-signal (FAM) i positiv kontroll (Positive Control, PC)

- |  |   |
|--|---|
| a) Den valda fluorescenskanalen för RT-PCR-dataanalys stämmer inte överens med protokollet.  | För dataanalys, välj fluorescenskanalen FAM (Green) för de analytiska SARS-CoV-2 RT-PCR-mälen, fluorescenskanalen HEX/VIC/JOE (Yellow) för provtagningskontroll och Cy5/Atto (Red) för intern kontroll.   |
| b) Felaktig programmering av temperaturprofilen.   | Jämför RT-PCR-programmet med protokollet.   |
| c) Felaktig konfiguration av PCR-reaktionen  | Verifiera arbetsstegen med hjälp av pipetteringsschemat och upprepa PCR-analysen vid behov.   |
| d) Lagringsförhållandena för en eller fler kitkomponenter efterlevde inte instruktionerna, eller så har <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR-kitet utgått. | Följ förvaringsvillkoren och verifiera förfallodatum för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs.   |
| e) Felaktig konfiguration av real time RT-PCR-plattformen under datakonfigurationen.   | Använd de rekommenderade konfigurationerna relaterade till real time RT-PCR-plattformen som beskrivs i manualen.  |
| f) PCR inhiberades.  | Följ god laboratoriesed för molekylär biologi för att undvika att introducera kontaminanter.<br>Försäkra dig om att arbetsytor och instrument dekontamineras regelbundet. Följ protokollen som nämns i den här manualen.<br>Kontrollera förfallodatum för reagensen och använd ett nytt kit om det behövs. Upprepa analysen med ett annat prov. |

### Green signal (FAM) i kontroll utan mall eller i kontroll utan extraktion

Kontaminering med SARS-CoV-2-sekvenser inträffade under RT-PCR-plattberedning.

Upprepa RT-PCR med nya reagenser. Följ god laboratoriesed för molekylär biologi för att undvika att introducera kontaminanter. Följ protokollen som nämns i den här handboken. Försäkra dig om att arbetsytor och instrument dekontamineras regelbundet.

## Kommentarer och förslag på åtgärd

---

### Svag eller ingen Red-signal (Cy5/Atto) från intern kontroll











- a) En interferent har introducerats i RT-PCR-reaktionen. PCR inhiberas.
- Följ god laboratoriesed för molekylär biologi för att undvika att introducera kontaminanter.
- Försäkra dig om att arbetsytor och instrument dekontamineras regelbundet.
- Följ protokollen som nämns i den här manualen.
- Upprepa experimentet med ett nytt prov.
- b) Den interna kontrollen är degraderad.
- Följ god laboratoriesed för molekylär biologi för att undvika att introducera RNase. Följ rekommendationerna som nämns i den här manualen.
- Försäkra dig om att arbetsytor och instrument dekontamineras regelbundet.
- Följ förvaringsvillkoren och kontrollera reagensernas förfallodatum och använd ett nytt kit om det behövs.
- c) Felaktig konfiguration av real time RT-PCR-plattformen under datakonfigurationen.
- Använd de rekommenderade konfigurationerna relaterade till real time RT-PCR-plattformen som beskrivs i manualen.

### Svag eller ingen Yellow-signal (VIC/HEX) för provtagningskontrollen

- a) Det kliniska provet är degraderat.
- Följ rekommendationerna från provtagningsenhetens leverantör för lagring, hantering och transport.
- Följ protokollen som nämns i den här manualen, inklusive provberedningsstegen med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer.
- Följ förvaringsvillkoren och kontrollera reagensernas förfallodatum, såsom SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, och använd ett nytt kit om det behövs.
- b) Provet togs inte på korrekt sätt. Otillräckligt med humana celler plockades upp av provstickan eller överfördes till transportmedium.
- Följ rekommendationerna från provtagningsenhetens leverantör för provtagning och hantering av prover.
- c) Felaktig konfiguration av real time RT-PCR-plattformen under datakonfigurationen.
- Använd konfigurationerna relaterade till real time RT-PCR-plattformen som beskrivs i manualen.

# Symboler

Följande symboler kan finnas i användningsinstruktionerna eller på förpackningar och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Innehåller tillräckligt med reagenser för 768 eller 3 072 reaktioner
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Katalognummer
	Partinummer
	Komponenter
	Innehåller
	Antal
	GSI-artikelnnummer
<b>R<sub>n</sub></b>	R betyder revidering av bruksanvisningen och n är revisionsnumret
	Temperaturbegränsning

Symbol

Symbolförklaring

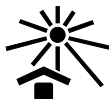
---



Tillverkare



Läs bruksanvisningen innan användning



Utsätt inte för direkt solljus



Varning/försiktighet

---

# Kontaktinformation

För teknisk support och mer information, kontakta QIAGEN teknisk service på **[support.qiagen.com](https://support.qiagen.com)**.

# Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	För 768 reaktioner: Beredningsbuffert, ROX-färg, Masterblandning, Primrar och sökfragment, Intern kontroll, Vatten (NTC) och positiv kontroll	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	För 3 072 reaktioner: Beredningsbuffert, ROX-färg, Masterblandning, Primrar och sökfragment, Intern kontroll, Vatten (NTC) och positiv kontroll	4511469
Instrument och tillbehör		
PCR tubes, 0.1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	För användning med 72-brunns rotor, striprör och lock	981103
Rotor-Gene Q software	Rotor-Gene Q-programvara v2.3.1 (eller senare)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Real-time PCR-cykler med 5 kanaler, högupplösningssmältningssinstrument, programvara, bärbar dator och tillbehör, 1 års garanti för delar och arbete, installation	9002032
72-Well Rotor	För placering av Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, med reaktionsvolymen på 10–50 µl	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	För låsning av Strip Tubes and Caps, 0.1 ml i rotorn med 72-Well Rotor	9018904

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive handbok eller användarmanual för QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kit finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller din lokala återförsäljare.



# Dokumentrevisioner

Revision	Beskrivning
R1, april 2021	Startversion.
R2 juli 2021	Tillägg till påstående: Test har fastställts för asymtomatiska personer. Avsedd användning uppdaterades till att inkludera personer utan symptom eller annan orsak att misstänka COVID-19-infektion. Avsnitt om Klinisk prestanda inklusive asymtomatiska personer lades till i Prestandadata.
R3, september 2021	<p>Tillägg till påstående:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Tillägg av test med salivprover.</li><li>2. Ändring av arbetsflödet.</li><li>3. För användning med 3 ytterligare plattformar och deras tillhörande programvara: CFX96 Dx med CFX Manager Dx-programvaran version 3.1.3090.1022 (eller senare), cobas z 480 med LightCycler 480 SW UDF version 2.0.0 (eller senare) och QuantStudio 5 Dx med QuantStudio 5 Dx IVD-programvaran version 1.0.1 (eller senare).</li><li>4. Detektionsgränsen för de 3 ytterligare plattformarna (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) lades till i avsnittet prestanda för nasofarynx-, näs- och orofarynxsvabbprov.</li><li>5. Avsnittet prestandaegenskaper har uppdaterats.</li><li>6. Endast fluorescenskanaler (Green, Red, Yellow) behålls för RGQ-instrumentet (färgnamnen i parentes togs bort).</li><li>7. Endast färgnamnen behålls för CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 och QuantStudio 5 Dx.</li><li>8. För ABI7500 Fast Dx togs fluorescensfiltren A/1, B/2 och E/5 bort. Endast färgnamnen behålls (Fam, Vic och Cy5).</li><li>9. Ändringar i tabellerna 34–37 i avsnittet klinisk prestanda för att göra framställningen tydligare.</li></ol>
R4, januari 2022	Rättning av stavfel i Tabell 39.

### Begränsat licensavtal för *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i panelen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna panel och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Panelen och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av panelen godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser panelen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Prep&Amp™, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™, Hard-Shell® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zeptomatrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Colgate®, Total SF Whitening™ (Colgate-Palmolive Company); Listerine® (Johnson & Johnson); Tussidane® (Laboratoires Des Realisations Therapeutiques Elerte); Pulmofluide® (Laboratoires Gerda); Excel® (Microsoft Corporation); Ricola® (Ricola Group); cobas®, LightCycler® (Roche Group); ABI®, MicroAmp™, EnduraPlate™, QuantStudio®, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific eller dess dotterbolag); Altoids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Registrerade namn, varumärken med mera som används i detta dokument ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

01/2022 R4 HB-2850-004 © 2021 QIAGEN, med ensamrätt.

---

Beställning [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Teknisk support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webbplats [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)