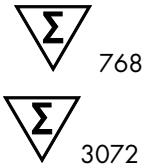


Januar 2022

artus[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp[™] UM Kit – brugsanvisning (håndbog)



Version 1



Til in vitro-diagnostisk brug på Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM, ABI[®] 7500 Fast Dx, QuantStudio[®] 5 Dx, cobas[®] z 480 eller CFX96[™] Dx-instrumenter



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R4

Indhold

Tilsligtet anvendelse	4
Beskrivelse og princip	5
Patogeninformation.....	5
Oversigt og forklaring.....	6
Medfølgende materialer	9
Kit-indhold	9
Kitkomponenter	10
Platforme og software	11
Nødvendige materialer, som ikke medfølger.....	12
Forbrugsvarer og udstyr	12
Advarsler og forholdsregler.....	14
Sikkerhedsinformation	14
Forholdsregler	15
Opbevaring og håndtering af reagenser	16
Prøvetransport, -opbevaring og -håndtering.....	16
Protokol: Klargøring af prøver og SARS-CoV-2-detektion på RGQ MDx 5plex HRM.....	18
Protokol: Klargøring af prøver og SARS-CoV-2-detektion på ABI 7500 Fast Dx.....	23
Protokol: Klargøring af prøve og SARS-CoV-2-detektion på CFX96 Dx	29
Protokol: Klargøring af prøve og SARS-CoV-2-detektion på cobas z 480.....	34
Protokol: Klargøring af prøve og SARS-CoV-2-detektion på QuantStudio 5 Dx	39
Resultater.....	45

Analyse på RGQ MDx 5plex HRM	45
Analyse på ABI 7500 Fast Dx.....	47
Analyse på CFX96 Dx	47
Analyse på cobas z 480.....	49
Analyse på QuantStudio 5 Dx	50
Fortolkning af resultater	52
Begrænsninger.....	54
Ydelse	55
Analysesensitivitet (påvisningsgrænse)	55
Undersøgelser af analysespecificitet (inkludativitet og eksklusivitet/krydsreaktivitet)....	56
Præcision	67
Klinisk ydeevne	68
Litteraturhenvisninger.....	73
Fejlsøgningsvejledning	74
Symboler	76
Kontaktoplysninger	78
Bestillingsinformation.....	79
Revisionshistorik for dokumentet.....	81

Tilsligtet anvendelse

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit er en real-time-RT-PCR-test til kvalitativ detektion af nukleinsyre fra SARS-CoV-2 i næsesvælgspodepinde (Nasopharyngeal Swabs, NPS), næsepodepinde og svælgspodepinde fra personer med tegn og symptomer på infektion eller personer uden symptomer eller andre årsager, der kunne give mistanke om COVID-19-infektion. Testen, der foretages med ufortyndede spytpøver, er beregnet til personer med tegn og symptomer på infektion eller mistanke om COVID-19-smitte.

Testen er en hjælp til diagnosticering af COVID-19 i den akutte infektionsfase sammen med kliniske observationer, patienthistorik og epidemiologiske oplysninger.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit skal bruges i et molekylærbiologisk laboratoriemiljø af professionelle brugere, såsom uddannede kliniske laboratorieansatte, som har modtaget specifikke instruktioner i principperne bag real-time RT-PCR- og *in vitro*-diagnostiske procedurer.

Et negativt resultat udelukker ikke en infektion med SARS-CoV-2 og bør derfor ikke anvendes som eneste behandlingsgrundlag.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit er beregnet til brug med Rotor-Gene Q MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 eller CFX96 Dx som real-time PCR-systemer.

Beskrivelse og princip

Patogeninformation

Coronavira, et genus af familien *Coronaviridae*, er store, indkapslede RNA-vira med positive strenge, der udvikler særdeles smitsomme sygdomme hos mennesker og husdyr (1). Coronavira er ansvarlige for en tredjedel af verdens almindelige forkølelser og en velkendt årsag nosokomial respiratorisk infektion i de øvre luftveje hos præmature børn (2).

Det var et nyt medlem af coronavirusfamilien, der startede epidemien i den kinesiske storby Wuhan (1, 3). SARS-CoV-2, der indledningsvist blev kaldt ny coronavirus (2019-nCoV), adskiller sig fra SARS-CoV (1, 3), der forårsagede SARS-udbruddet i 2003, og MERS-CoV, der har cirkuleret i Mellemøsten siden 2012. SARS-CoV-2 er det kausale stof i COVID-19. RNA'et i SARS-CoV-2 kan påvises i de tidlige og akutte infektionsstadier ved hjælp af forskellige prøvetagninger fra de øvre luftveje taget med næse-, svælg- og næsesvælgspodepinde og i ufortyndede spytpøver (3).

I kombination med SARS-CoV-2-epidemiologien er real-time RT-PCR-analyser blevet den foretrukne metode til diagnosticering af SARS-CoV-2. Det europæiske center for forebyggelse af og kontrol med sygdomme (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) har foreslået at kombinere real-time RT-PCR-baserede analyser med immunanalyser for at overvåge infektionsstatus og evaluere effektiviteten af restriktionerne for at begrænse udbruddet (4, 5).

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit er udviklet til at dække 2 mål (N1 og N2) hos N-genet, der er påvist med samme fluorescenskanal. Der skelnes ikke mellem de to mål, og amplifikation af det ene eller begge mål resulterer i et fluorescenssignal. Et positivt resultat indikerer tilstedeværelse af SARS-CoV-2, men udelukker ikke samtidig infektion med andre patogener. Et negativt real-time RT-PCR-resultat udelukker omvendt ikke en mulig infektion.

Oversigt og forklaring

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit er et brugsklart system med ét prøveklargøringstrin efterfulgt af detektion af SARS-CoV-2-RNA ved hjælp af real-time RT-PCR på RGQ MDx System, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 eller QuantStudio 5 Dx (figur 1).

SARS-CoV-2 UM Amp Buffer indeholder reagenser og enzymer til den specifikke amplifikation af 72 basiske par (bp) og et 67 bp område med SARS-CoV-2-RNA-genom og til deres direkte detektion i fluorescenskanalen "Green" på RGQ MDx-instrumenterne og i fluorescenskanalen "FAM" på ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 eller QuantStudio 5 Dx.

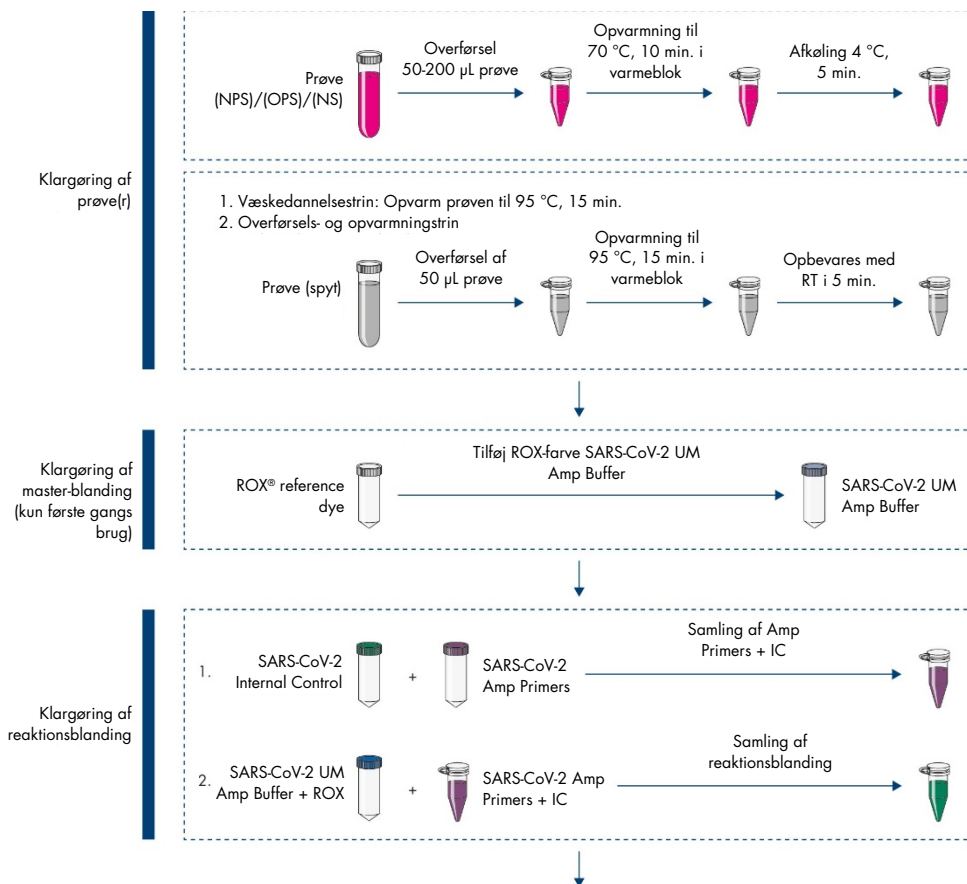
Primer- og probeblandingen af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit indeholder desuden de nødvendige oligonukleotider til RNase P-amplifikationerne. Når disse amplifikationer detekteres i fluorescenskanal "Yellow" på RGQ MDx-instrumentet, i VIC/HEX of ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 eller QuantStudio 5 Dx, sikrer de, at der er indsamlet tilstrækkeligt med biologisk prøvemateriale. Denne kontrol er afgørende for tilstedeværelsen af biologiske prøver i SARS-CoV-2-negative prøver. En amplifikation bør altid kunne detekteres. I modsat fald bør prøve kvaliteten kontrolleres.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit indeholder desuden et tredje heterologt amplifikationssystem til påvisning af potentiel real-time RT-PCR-inhibition. Dette detekteres som en intern RNA-kontrol (Internal Control, IC) i fluorescenskanalen "Red" på et RGQ MDx-instrument eller i Cy5/ATTO647N of ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 eller QuantStudio 5 Dx. Eftersom IC'en indgår i SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, skal dens amplifikation være konstant, medmindre der konstateres en real-time RT-PCR-hæmmer i prøven eller PCR-reaktionen, hvilket forsinket eller forhindrer amplifikationen.

Eksterne positive og negative kontroller (henholdsvis SARS-CoV-2 Positive Control og nukleasefrit vand brugt som NTC) medfølger i *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit for at bekræfte ydelsen af PCR-trinnet. Det anbefales kraftigt at udføre en ingen-ekstrahering-kontrol

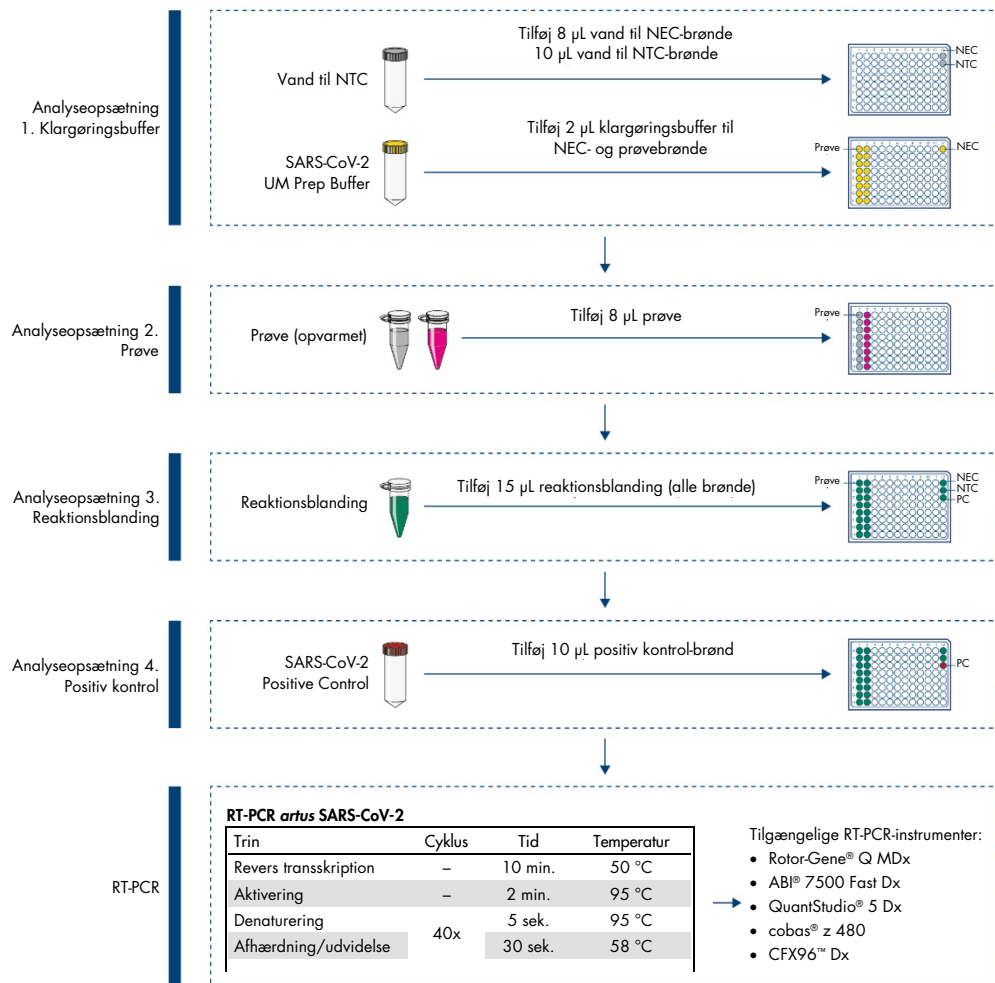
(SARS-CoV-2 UM Prep Buffer brugt som NEC) for at verificere fraværet af real-time RT-PCR-hæmmere i klargøringsbufferen.

Tilsammen anvendes disse kontroller til at overvåge effektiviteten af den reverse transkription og PCR-trinene.



(fortsættes på næste side)

(fortsat fra foregående side)



Figur 1. Workflow med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Medfølgende materialer

Kit-indhold

<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit					
Katalognr.				4511460	4511469
Antal reaktioner				768	3072
Rørfarve	Lågfارve	Identitet	Rør-id	Volumen (µL)	Volumen (µL)
Klar	Yellow	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	Preparation Buffer (Klargøringsbuffer)	2 x 930	8 x 930
Klar	Blå	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	Master Mix (Masterblanding)	4 x 1440	16 x 1440
Klar	Lilla	SARS-CoV-2 Amp Primers	Primers and Probes (Primere og prøber)	4 x 1680	16 x 1680
Klar	Green	SARS-CoV-2 Internal Control	Internal Control (Intern kontrol) (IC)	1 x 1390	4 x 1390
Klar	Red	SARS-CoV-2 Positive Control	Positive Control (Positiv kontrol)	1 x 220	4 x 220
Klar	Klar	Water for NTC (Vand til NTC)	Water (Vand) (NTC)	1 x 1900	4 x 1900
Klar	Klar	ROX Reference Dye (ROX-referencefarve)	ROX Dye (ROX-farve)	1 x 210	4 x 210

Kitkomponenter

Reagenser

Reagensvolumenerne i hvert rør er blevet optimeret til 8 batches a 96 prøver (768-reaktionskittet) eller 32 batches a 96 reaktioner (3072-reaktionskittet), inklusive en positiv kontrol (Positive Control, PC), en ingen-skabelon-kontrol (No Template Control, NTC) og en ingen-ekstrahering-kontrol (No Extraction Control, NEC).

Der kan køres færre eller flere prøver, men dette forringer brugen af reagenserne. Det anbefales at undgå flere fryse-/optøningscyklusser. Reagenser kan overføres for at undgå flere fryse-/optøningscyklusser.

Primere og prober

Primere og prober, der er målrettet mod SARS-CoV-2-sekvenser, er baseret på de primere og probere, der er designet af centeret for forebyggelse af og kontrol med sygdomme (Centers for Disease Control and Prevention, CDC).

Kontroller og kalibratorer

Analysen indeholder 5 kontroller til at overvåge effektiviteten af real-time RT-PCR.

Intern kontrol (Internal Control, IC): Den interne kontrol er en enkeltstrenget IVT-RNA, som kontrollerer tilstedeværelsen af kontaminanter, der kunne hæmme den reverse transskription. Den interne kontrol overvåger også effektiviteten af den reverse transskription i ingen-skabelon-kontrollen (No Template Control, NTC) og ingen-ekstrahering-kontrollen (No Extraction Control, NEC).

Ingen-skabelon-kontrol (No Template Control, NTC): Ingen-skabelon-kontrollen består af nukleasefrit vand. Det tilføjes PCR-pladen for at verificere indførelsen af kontaminanter under klargøring af PCR-pladen, hvilket kan medføre fejlfortolkning af SARS-CoV-2-målene.

Positiv kontrol (Positive Control, PC): Den positive kontrol er en dobbeltstrenget DNA, der er amplificeret med SARS-CoV-2-primere og -prober (P&P-blanding). Detektionen verificerer effektiviteten af det pågældende reagens på PCR-amplifikationstrinnet.

Ingen-ekstrahering-kontrol (No Extraction Control, NEC): Ingen-ekstrahering-kontrollen består af SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Den behandles sideløbende med de kliniske prøver for at verificere indførelsen af kontaminanter under prøveklargøringen, hvilket kan medføre fejlfortolkning af SARS-CoV-2.

Prøvetagningskontrol: Prøvetagningskontrollen detekterer RNase P-genet og er afgørende for tilstedeværelsen af biologiske prøver i SARS-CoV-2-negative prøver. En amplifikation af prøvetagningskontrollen bør altid kunne detekteres. I modsat fald bør prøve kvaliteten kontrolleres.

Platforme og software

Inden instrumenterne tages i brug, skal det kontrolleres, at de er vedligeholdt og kalibreret efter producentens anvisninger. Dette kit kan anvendes i fem workflows, der kræver brug af følgende real-time RT-PCR-instrumenter og den dertilhørende software:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Rotor-Gene Q-software version 2.3.1 eller nyere
- ABI 7500 Fast Dx: SDS-softwareversion 1.4.1 eller nyere
- CFX96 Dx med CFX Manager Dx-software version 3.1.3090.1022 eller nyere
- cobas z 480 med LightCycler® 480 SW UDF version 2.0.0 eller nyere
- QuantStudio 5 Dx med QuantStudio 5 Dx IVD, softwareversion 1.0.1 eller nyere, og QuantStudio 5 Dx TD, softwareversion 1.0.1 eller nyere

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Forbrugsvarer og udstyr

Almindelige forbrugsvarer og udstyr

- Bordcentrifuge med rotor til 2 mL-reagensglas
- Pipetter (justerbare)
- Vortex-mixer
- Varmebløkk
- Pudderfri engangshandsker
- Sterile og nukleasefri pipettespidser med filter
- 1,5 eller 2 mL PCR-fri rør
- Pladecentrifuge med 96 brønde

Forbrugsvarer og udstyr til hver enkelt platform

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument

- 0,1 mL PCR-rør til brug med Rotor-Gene Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, kat.-nr. 981103).
- 72-Well Rotor (kat.-nr. 9018903) og Locking Ring 72-Well Rotor (adapterlåsering til 72-brønds 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® PCR-plade med 96 brønde, lavprofil, tyndvægget, skirtdet hvid/gennemsigtig (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, hvid (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)

Advarsler og forholdsregler

Bemærk: Alvorlige hændelser med relation til brugen af udstyret skal muligvis rapporteres til producenten og den ansvarlige myndighed i det land, hvor brugeren og/eller patienten befinder sig.

Sikkerhedsinformation

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere information. Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og tilhørende komponenter.

Bær altid passende personligt beskyttelsesudstyr, herunder, men ikke begrænset til, pudderfri engangshandsker en laboratoriekittel og beskyttelsesbriller. Beskyt hud, øjne og slimhinder. Skift ofte handsker ved håndtering af prøver.

Alle prøver skal håndteres som potentielt farlige. Overhold altid sikkerhedsforanstaltninger, som beskrevet i de relevante retningslinjer, som f.eks. Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI), *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guidelines (M29)* eller andre passende dokumenter.

Prøverne kan være smittefarlige. Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.

Forholdsregler

- Overhold standardlaboratorieprocedurer for at holde arbejdsområdet rent og kontamineringsfrit. Afsæt et område med specifikt udstyr til håndtering af RNA.
- Overhold god laboratoriepraksis for at minimere krydskontaminering.
- Undgå kontaminering med RNase under forsøget, og brug RNase-fri plastprodukter.
- Sørg for, at alle fortegnelser, især identifikationer af prøver, kan spores.

Opbevaring og håndtering af reagenser

Vær opmærksom på de udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit kan opbevares ved -30 °C til -15 °C i 6 måneder eller indtil udløbsdatoen.

Prøvetransport, -opbevaring og -håndtering

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit er beregnet til brug med næsesvælgs-, næse- og svælgspodepinde og ufortyndede spytpøver. Alle prøver skal håndteres som potentielt farlige. Centeret for forebyggelse af og kontrol med sygdomme (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) og det engelske sundhedsministerium har en række retningslinjer for klinisk prøvetagning, -håndtering og -testning. Se disse retningslinjer eller andre relevante nationale referencelaboratorieprotokoller for at få flere oplysninger.

Indsamling, transport og opbevaring af næsesvælgs-, næse- og svælgspodepinde

Se producentens anbefalinger vedrørende prøvetagning med podepind samt opbevaring og transport. Podepinde skal være helt dækket af transportmedie for at opretholde prøveintegriteten. Næsesvælgsprøver på podepind forbliver stabile og kan opbevares ved:

- 4 °C (2 til 8 °C) i op til 72 timer
- -70 °C i 2 uger

Næsesvælgsprøver på podepind forbliver stabile gennem 3 fryse-/optøningscyklusser.

Prøveindsamling, transport og opbevaring af ufortyndede spytprøver

Ufortyndede spytprøver skal indsamles i sterile beholdere uden nogen form for konserveringsmidler, buffere eller andre additiver.

Vejledning i indsamling af ufortyndede spytprøver:

- Undgå at hoste, før den ufortyndede spytprøve tages.
- Undlad at spise, drikke, ryge eller vape, tygge tyggegummi eller børste tænder 30 minutter før den ufortyndede spytprøve tages.
- Der bør ikke foretages tandbehandlinger eller tandundersøgelser, 24 timer før den ufortyndede spytprøve tages.

De ufortyndede spytprøver forbliver stabile og kan opbevares ved:

- Stuetemperatur (18–26 °C) i op til 72 timer
- 4 °C (2 til 8 °C) i op til 72 timer
- Kombineret opbevaring ved stuetemperatur, derefter 4 °C, derefter –20 °C (–30 til –15 °C) i op til 12 dage
- –20 °C (–30 til –15 °C) i 1 måned

Ufortyndede spytprøver forbliver stabile gennem 3 fryse-/optøningscyklusser.

Hvis prøveopbevaringsforholdene afviger fra denne vejledning, skal du tilpasse dine opbevaringsforhold.

Protokol: Klargøring af prøver og SARS-CoV-2-detektion på RGQ MDx 5plex HRM

Denne protokol beskriver klarlægning af prøver og real-time RT-PCR for at påvise SARS-CoV-2-mål i humane næse-, næsesvælgs- og svælgspodepinde, der opbevares i transportmedie, og i ufordyndede spytp prøver på RGQ MDx 5plex HRM real-time RT-PCR-instrumentet sammen med Rotor-Gene Q-softwaren, version 2.3.1.49 (eller nyere).

Vigtige anvisninger før start

- Sørg for at overholde udløbsdatoerne og opbevaringsforholdene, som er påtrykt komponenternes æske og etiketter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Brug kun udstyr, der er korrekt vedligeholdt og kalibreret.
- Undgå kontaminering med RNaser under forsøget og brug nukleasefri plastprodukter.

Ting, der skal gøres før start

- Luftvejsprøver kan opbevares ved stuetemperatur (15–25 °C) under klarlægningstrinnene og reaktionsopsætningen, men det anbefales at opbevare dem på is eller ved 4 °C på et kølestativ.
- Spytp prøver kan opbevares på is eller ved 4 °C på et kølestativ, men det anbefales at opbevare dem ved stuetemperatur (15–25 °C) under klarlægningstrinnene og reaktionsopsætningen.
- Før brug stilles SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vand til NTC og SARS-CoV-2 Positive Control til fuldstændig optøning ved stuetemperatur. Beskyt rørene mod sollys indtil brug, mens de optøes ved stuetemperatur.

- Inden brug skal du homogenisere SARS-CoV-2 UM Prep Buffer og SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ved at vende dem 2-3 gange (de må ikke vortexblandes) efterfulgt af et hurtigt spin. Øvrige individuelle reagenser kan homogeniseres ved at puls-vortexe dem i 3-5 sekunder eller ved at vende dem 2-3 gange efterfulgt af et hurtigt spin.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hæmmer RNaser i de kliniske prøver til detektionstrinnet, men er ikke en virusinaktiverende opløsning. Alle prøver skal håndteres som potentielt farlige.
- Kontrollér, at real-time RT-PCR-plattformens cyklusforhold stemmer overens med denne protokol.
- Reagenser kan overføres for at undgå flere fryse-/optøningscyklusser.
- Klargør reaktionsblandingen (< 2 timer til RT-PCR-pladestart).
- Prøven og RT-PCR-klargøringerne skal foretages på særskilte steder for at minimere risikoen for kontaminering.

Procedure

Klargøring af prøve: Ved luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde) følges trin 1. Ved spytp prøver fortsættes til trin 2.

1. Luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde):
 - 1a. Bland prøven og podedinden kraftigt i en vortex-mixer.
 - 1b. Overfør 50-200 µL prøve til 1,5 mL PCR-fri rør.
 - 1c. Udfør opvarmningstrinnet ved 70 °C i 10 min. på en varmeblok. Læg prøverne på is i mindst 5 min., og opbevar derefter prøverne på is eller ved 4 °C.
2. Spytp prøver:
 - 2a. Væskedannelse (for at lette pipettering): opvarm spytp prøven til 95 °C i 15 min. (uspecificeret volumen, beholder eller varmeenhed).
 - 2b. Homogeniser prøven ved forsigtigt at pipettere op og ned 8–10 gange.
 - 2c. Overfør 50 µL af prøven til et 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 2d. Udfør opvarmningstrinnet ved 95 °C i 15 min. på en varmeblok, og opbevar prøven ved stuetemperatur i mindst 5 minutter, indtil den overføres til PCR-brønd eller rør.

3. Ved første brug færdiggøres SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX Reference Dye.
 - 3a. Tilføj 32,8 µL ROX-farve til 1 rør SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Luk låget med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og ROX-farve, og vend røret 3 gange.
 - 3c. Spin SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-farve ned i bunden af røret.
4. En fuld plade af RGQ MDx (72 brønde) kræver klargøring af en alikvotblanding med SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Overfør de påkrævede volumener af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control ifølge tabel 1 til et nyt 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 4b. Luk låget, og vend røret 3 gange, eller impuls-vortex røret i 3-5 sek.
 - 4c. Spin SARS-CoV-2 Amp Primers med IC ned i bunden af røret.

Tabel 1. Opsætning af SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding

SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding				Antal reaktioner – volumen (µL)	
Reagenser	Stammekonzentration	Endelig koncentration	1 reaktion	72 reaktioner (+20 % ekstravolumen*)	
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	
Samlet SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding			8,75	756	

* **Bemærk:** Juster volumenerne af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dødvolumen.

5. Forbered en reaktionsblanding ifølge tabel 2, og bland den grundigt ved at vende bunden i vejret på beholderen 3 gange.

Table 2. Opsætning af reaktionsblanding

RT-PCR-reaktionsblanding				Antal reaktioner – volumen (µL)
Reagenser	Stammekonzentration	Endelig koncentration	1 reaktion	72 reaktioner (+20 % ekstravolumen*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer +ROX-blanding	4x	1x	6,25	540
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC- blanding	2,9x	1x	8,75	756
Samlet reaktionsvolumen	–		15,00	1296

* **Bemærk:** Juster volumenerne af SARS-CoV-2 Amp Buffer og SARS-CoV-2 Amp Primers efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dædvolumen.

6. Dispensér 8 µL nukleasefrit vand i PCR-røret til NEC.
7. Tilføj 10 µL nukleasefrit vand til PCR-røret til NTC.
8. Dispensér 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i hvert PCR-rør til NEC og i de klargjorte prøver.
9. Tilføj 8 µL af den klargjorte prøve til et PCR-rør med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
10. Tilføj 15 µL reaktionsblanding fra trin 5 til rørene til prøver og kontroller (eksempel: figur 2). Bland ved at pipettere op og ned 5 gange, og sæt derefter låg på PCR-rørene, undtagen den til SARS-CoV-2 Positive Control.

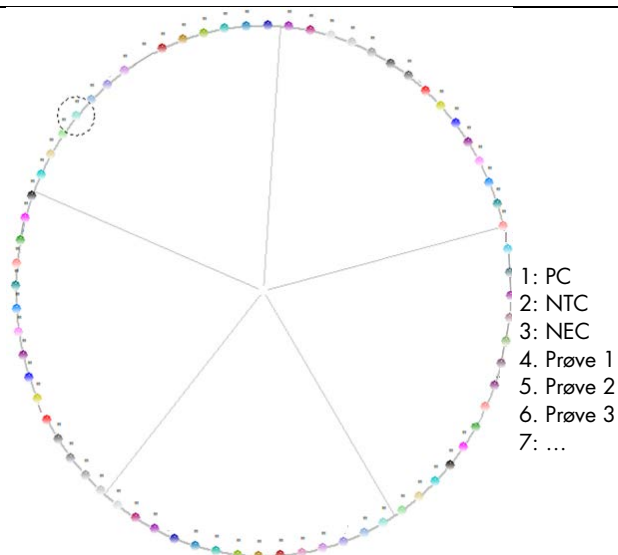
Bemærk: Kontrollér, at rørene er forsvarligt lukket for at undgå krydskontaminering.

11. Tilføj 10 µL SARS-CoV-2 Positive Control til det relevante PCR-rør. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
12. Indstil RT-PCR-programmet på RGQ MDx 5plex HRM ifølge tabel 3.
Bemærk: Datahentning skal udføres under afhærdning/forlængelse-trinnet.
13. Placer rørene i real-time-cycleren (se figur 2 for eksempel på røropsætning), og start cyklusprogrammet ifølge tabel 3.

Bemærk: Husk at have den samme rørposition og rørrækkefølge mellem analyseopsætningen og trinnene i real-time-cycleren.

Tabel 3. Programmering af SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Trin	Tid	Temperatur (°C)	Antal cyklusser	Hentning
Revers transkription	10 min.	50	1	Nej
Første aktivering af PCR-opvarmning	2 min.	95	1	Nej
2-trinscyklus				
Denaturering	5 sek.	95	40	Nej
afhærdning/forlængelse	30 sek.	58		Green, Yellow og Red



Figur 2. Eksempel på røropsætning på RGQ MDx 5plex HRM-platform

14. Klik på Gain optimization (Optimering af forstærkning) i "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel), og åbn Auto-gain Optimization Setup (Opsætning af automatisk forstærkning).

15. Kontrollér, at indsamlingskanalerne er indstillet som beskrevet i tabel 4.

Tabel 4. Konfiguration af RGQ MDx 5plex HRM

Navn	Placering af PC-rør	Min. aflæsning (FI)	Maks. aflæsning (FI)	Min. forstærkning	Maks. forstærkning
Green	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

* **Bemærk:** Dette skal ændres ifølge placeringen af røret med SARS-CoV-2 Positive Control.

16. Vælg Perform optimization before the first acquisition (Udfør optimering før første indsamling).

17. Start kørslen.

18. Analysér resultaterne ved afslutningen af kørslen (se afsnittet Resultater).

Protokol: Klargøring af prøver og SARS-CoV-2-detektion på ABI 7500 Fast Dx

Denne protokol er beregnet til klargøring og detektion af SARS-CoV-2-mål i humane næse-, næsesvælgs- og svælgsdepodepinde i transportmedie og i ufertyndede spytp prøver på ABI 7500 Fast Dx real-time RT-PCR-instrumentet.

Vigtige anvisninger før start

- Sørg for at overholde udløbsdatoerne og opbevaringsforholdene, som er påtrykt komponenternes æske og etiketter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Brug kun udstyr, der er korrekt vedligeholdt og kalibreret.
- Undgå kontaminering med RNaser under forsøget og brug nukleasefri plastprodukter.
- Ved brug af ABI 7500 Fast Dx skal ROX-farve tilføjes røret med master-blanding før første brug.

Ting, der skal gøres før start

- Luftvejsprøver kan opbevares ved stuetemperatur (15–25 °C) under klargøringstrinnene og reaktionsopsætningen, men det anbefales at opbevare dem på is eller ved 4 °C på et kølestativ.
- Spytprøver kan opbevares på is eller ved 4 °C på et kølestativ, men det anbefales at opbevare dem ved stuetemperatur (15–25 °C) under klargøringstrinnene og reaktionsopsætningen.
- ROX-farve skal bruges i forbindelse med ABI 7500 Fast Dx.
- Brug indstillingen til passiv ROX-farvning til at hente data.
- Før brug stilles SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vand til NTC og SARS-CoV-2 Positive Control til fuldstændig optøning ved stuetemperatur. Beskyt rørene mod sollys indtil brug, mens de optøes ved stuetemperatur.
- Inden brug skal du homogenisere SARS-CoV-2 UM Prep Buffer og SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ved at vende dem 2-3 gange (de må ikke vortexblandes) efterfulgt af et hurtigt spin. Øvrige individuelle reagenser kan homogeniseres ved at puls-vortexe dem i 3-5 sekunder eller ved at vende dem 2-3 gange efterfulgt af et hurtigt spin.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hæmmer RNaser i de kliniske prøver til detektionstrinnet men er ikke en virusinaktiverende opløsning. Alle prøver skal håndteres som potentielt farlige.
- Kontrollér, at real-time RT-PCR-plattformens cyklusforhold stemmer overens med denne protokol.
- Reagenser kan overføres for at undgå flere fryse-/optøningscyklusser.
- Klargør reaktionsblandingen (< 2 timer til RT-PCR-pladestart).
- Prøven og RT-PCR-klargøringerne skal foretages på særskilte steder for at minimere risikoen for kontaminering.

Procedure

Klargøring af prøve: Ved luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde) følges trin 1. Ved spytp prøver fortsættes til trin 2.

1. Luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde):
 - 1a. Bland prøven og podepinden kraftigt i en vortex-mixer.
 - 1b. Overfør 50-200 µL prøve til 1,5 mL PCR-fri rør.
 - 1c. Udfør opvarmningstrinnet ved 70 °C i 10 min. på en varmeblok.
 - 1d. Læg prøverne på is i mindst 5 min., og opbevar derefter prøverne på is eller ved 4 °C.
2. Spytp prøver:
 - 2a. Væskedannelse (for at lette pipettering): opvarm spytp prøven til 95 °C i 15 min. (uspecificeret volumen, beholder eller varmeenhed).
 - 2b. Homogeniser prøven ved forsigtigt at pipettere op og ned 8–10 gange
 - 2c. Overfør 50 µL af prøven til et 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 2d. Udfør opvarmningstrinnet ved 95 °C i 15 min. på en varmeblok, og opbevar prøven ved stuetemperatur i mindst 5 minutter, indtil den overføres til PCR-brønd eller rør.
3. Ved første brug færdiggøres SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX Reference Dye.
 - 3a. Tilføj 32,8 µL ROX-farve til et rør SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Luk låget med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og ROX-farve, og vend røret 3 gange.
 - 3c. Spin SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-farve ned i bunden af røret.
4. En fuld plade af ABI 7500 Fast Dx (96 brønde) kræver klarlægning af en alikvotblanding med SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Overfør de påkrævede volumener af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control ifølge tabel 5 til et nyt 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 4b. Luk låget, og vend røret 3 gange, eller impuls-vortex røret i 3-5 sek.
 - 4c. Spin SARS-CoV-2 Amp Primers med IC for at samle opløsningen i bunden af røret.

Tabel 5. Opsætning af SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding

SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding				Antal reaktioner – volumen (µL)	
Reagenser	Stammekoncentration	Endelig koncentration	1 reaktion	96 reaktioner (+ 20 % ekstravolumen*)	
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	
Samlet SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding			8,75	1008	

* **Bemærk:** Juster volumenerne af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dødvolumen.

5. Forbered en reaktionsblanding ifølge tabel 6, og bland den grundigt ved at vende bunden i vejret på beholderen 3 gange.

Tabel 6. Opsætning af reaktionsblanding

RT-PCR-reaktionsblanding				Antal reaktioner – volumen (µL)	
Reagenser	Stammekoncentration	Endelig koncentration	1 reaktion	96 reaktioner (+20 % ekstravolumen*)	
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX-blanding	4x	1x	6,25	720	
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding	2,9x	1x	8,75	1008	
Samlet reaktionsvolumen		–	15,00	1728	

* **Bemærk:** Juster volumen af SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og SARS-CoV-2 Amp Primers efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dødvolumen.

6. Dispensér 8 µL nukleasefrit vand i brønden til NEC.
7. Tilføj 10 µL nukleasefrit vand til brønden til NTC.
8. Dispensér 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i hver brønd til NEC og i de klargjorte prøver.
9. Tilføj 8 µL af den klargjorte prøve til en brønd med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
10. Tilsæt 15 µL reaktionsblanding fra trin 5 til brøndene til prøver og kontroller (se eksempel i figur 3). Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.

11. Tilføj 10 µL SARS-CoV-2 Positive Control til den relevante brønd. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
12. Forsegl PCR-pladebrønden for at forhindre krydskontaminering. Sørg for at fordele trykket på hele pladen for at opnå en hermetisk lukning af alle brøndene.
13. Centrifuger PCR-pladen kortvarigt for at samle væsken i bunden af brønden.
14. Indstil real-time RT-PCR-programmet på "Standard 7500"-kørselstilstanden på ABI 7500 Fast Dx i henhold til tabel 7.

Bemærk: Klik først på **file** (fil) og **new** (ny), og kontrollér derefter, at analysen er **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standardkurve (absolut kvantitering)), og at kørselstilstanden er indstillet til **Standard 7500**. Vælg FAM, VIC og Cy5 som rapportører med quencher indstillet til **None** (Ingen), og dataene skal indsamles med **ROX** indstillet til **passive reference** (passiv reference).

Bemærk: Datahentning skal udføres under afhærdning/forlængelse-trinnet.

Bemærk: Du kan få flere oplysninger i *brugsanvisningen til ABI 7500 Fast Dx*.

15. Placer pladen i real-time-cycleren (se figur 3 for et eksempel på en PCR-pladeopsætning), og start cyklusprogrammet ifølge tabel 7.
16. Vælg de brugte brønde, og anvend rapportørerne FAM, VIC og Cy5. Indstil passiv ROX-farvning til **ON** for at hente data.
17. Kontrollér, at standardkurven på ABI 7500 Fast Dx er indstillet til Absolute Quantitation (Absolut kvantitering).
18. Start kørslen.
19. Analysér resultaterne ved afslutningen af kørslen (se afsnittet Resultater).

Tabel 7. Programmering af SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Trin	Tid	Temperatur (°C)	Antal cyklusser	Hentning
Revers transskription	10 min.	50	1	Nej
Første aktivering af PCR-opvarmning	2 min.	95	1	Nej
2-trinscyklus				
Denaturering – afhærdning/forlængelse	5 sek.	95	40	Nej
	30 sek.	58		FAM, VIC og Cy5

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

Figur 3. Eksempel på pladeopsætning på ABI 7500 Fast Dx

Protokol: Klargøring af prøve og SARS-CoV-2-detektion på CFX96 Dx

Denne protokol er beregnet til klarlægning og detektion af SARS-CoV-2-mål i humane næse-, næsesvælg- og svælgspodepinde i transportmedie og i ufortyndede spytp prøver på CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., kat.-nr.1845097-IVD.(optisk reaktionsmodul) og 1841000-IVD (termocyclermodul) med CFX Manager Dx-software version 3.1.309001022 eller nyere.

Vigtige anvisninger før start

- Sørg for at overholde udløbsdatoerne og opbevaringsforholdene, som er påtrykt komponenternes æske og etiketter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Brug kun udstyr, der er korrekt vedligeholdt og kalibreret.
- Undgå kontaminering med RNaser under forsøget, og brug nukleasefri plastprodukter.

Ting, der skal gøres før start

- Luftvejsprøver kan opbevares ved stuetemperatur (15–25 °C) under klarlægningstrinnene og reaktionsopsætningen, men det anbefales at opbevare dem på is eller ved 4 °C på et kølestativ.
- Spytp prøver kan opbevares på is eller ved 4 °C på et kølestativ, men det anbefales at opbevare dem ved stuetemperatur (15–25 °C) under klarlægningstrinnene og reaktionsopsætningen.
- Før brug stilles SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vand til NTC og SARS-CoV-2 Positive Control til fuldstændig optøning ved stuetemperatur. Beskyt rørene mod sollys indtil brug, mens de optøes ved stuetemperatur.

- Inden brug skal du homogenisere SARS-CoV-2 UM Prep Buffer og SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ved at vende dem 2-3 gange (de må ikke vortexblandes) efterfulgt af et hurtigt spin. Øvrige individuelle reagenser kan homogeniseres ved at puls-vortexe dem i 3-5 sekunder eller ved at vende dem 2-3 gange efterfulgt af et hurtigt spin.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hæmmer RNaser i de kliniske prøver til detektionstrinnet, men er ikke en virusinaktiverende opløsning. Alle prøver skal håndteres som potentielt farlige.
- Kontrollér, at real-time RT-PCR-plattformens cyklusforhold stemmer overens med denne protokol.
- Reagenser kan overføres for at undgå flere fryse-/optøningscyklusser.
- Klargør reaktionsblandingen (< 2 timer til PCR-pladestart).
- Prøven og real-time RT-PCR-klargøringerne skal foretages på særskilte steder for at minimere risikoen for kontaminering.

Procedure:

Klargøring af prøve: Ved luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde) følges trin 1. Ved spytp prøver fortsættes til trin 2.

1. Luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde):
 - 1a. Bland prøven og podepinden kraftigt i en vortex-mixer
 - 1b. Overfør 50-200 µL prøve til 1,5 mL PCR-fri rør
 - 1c. Udfør opvarmningstrinnet ved 70 °C i 10 min. på en varmeblok.
 - 1d. Læg prøverne på is i mindst 5 min., og opbevar derefter prøverne på is eller ved 4 °C.
2. Spytp prøver:
 - 2a. Væskedannelse (for at lette pipettering): opvarm spytp prøven til 95 °C i 15 min. (uspecificeret volumen, beholder eller varmeenhed).
 - 2b. Homogeniser prøven ved forsigtigt at pipettere op og ned 8-10 gange.
 - 2c. Overfør 50 µL af prøven til et 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 2d. Udfør opvarmningstrinnet ved 95 °C i 15 min. på en varmeblok. Opbevar derefter prøven ved stuetemperatur i mindst 5 min. indtil overførsel til PCR-brønd eller rør.

3. Ved første brug færdiggøres SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX Reference Dye.
 - 3a. Tilføj 32,8 µL ROX-farve til 1 rør SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Luk låget med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og ROX-farve, og vend røret 3 gange.
 - 3c. Spin SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-farve ned i bunden af røret.
4. En fuld plade af CFX96 Dx (96 brønde) kræver klargøring af en alikvotblanding med SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Overfør de påkrævede volumener af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control ifølge tabel 8 til et nyt 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 4b. Luk låget, og vend røret 3 gange, eller impuls-vortex røret i 3-5 sek.
 - 4c. Spin SARS-CoV-2 Amp Primers med IC for at samle opløsningen i bunden af røret.

Tabel 8. Opsætning af SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding

Reagenser	SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding			Antal reaktioner – volumen (µL)	
	Stammekoncentration	Endelig koncentration	1 reaktion	96 reaktioner (+ 20 % ekstravolumen*)	
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	
Samlet SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding			8,75	1008	

* **Bemærk:** Juster volumenerne af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dødvolumen.

5. Forbered en reaktionsblanding ifølge tabel 9, og bland den grundigt ved at vende bunden i vejret på beholderen 3 gange.

Table 9. Opsætning af reaktionsblanding

RT-PCR-reaktionsblanding				Antal reaktioner – volumen (µL)
Reagenser	Stammekonzentration	Endelig koncentration	1 reaktion	96 reaktioner (+20 % ekstravolumen*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX- blanding	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC- blanding	2,9x	1x	8,75	1008
Samlet reaktionsvolumen	–		15,00	1728

* **Bemærk:** Juster voluminerne af SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og SARS-CoV-2 Amp Primers efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dødvolumen.

6. Dispensér 8 µL nukleasefrit vand i brønden til NEC.
7. Tilføj 10 µL nukleasefrit vand til brønden til NTC.
8. Dispensér 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i hver brønd til NEC og i de klargjorte prøver.
9. Tilføj 8 µL af den klargjorte prøve til en brønd med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
10. Tilføj 15 µL reaktionsblanding fra trin 5 til brøndene til prøver og kontroller (eksempel: figur 4). Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
11. Tilføj 10 µL SARS-CoV-2 Positive Control til den relevante brønd. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
12. Forsegl PCR-pladebrønden for at forhindre krydskontaminering. Sørg for at fordele trykket på hele pladen for at opnå en hermetisk lukning af alle brøndene.
13. Centrifuger PCR-pladen kortvarigt for at samle væsken i bunden af brønden.
14. På **CFX Manager Dx Software > Startup Wizard** (Guiden Opstart) under **run type** (kørselstype) vælges **user defined** (brugerdefineret).
15. Fanen **Protocol** (Protokol): Indstil real-time RT-PCR-programmet iht. tabel 10 til en reaktionsvolumen på 25 µL.

Bemærk: I vinduet **Protocol Editor** (Protokoleditor) klikkes på trykknappen **Step Options** (Valgmuligheder for trin) for at justere rampefrekvensen til 1,6 °C/sek. i hvert af de 4 trin i RT-PCR-programmet.

Bemærk: Dataindsamling skal udføres under afhærdning/forlængelse-trinnet.

Bemærk: Du kan få flere oplysninger i *brugsanvisningen til CFX96 Dx*.

16. Fanen **Plate** (Plade): Vælg de brugte brønde, og anvend rapportørerne FAM, HEX og Cy5.
17. Placer pladen i real-time-cycleren (se figur 4 for et eksempel på en PCR-pladeopsætning).
18. Fanen **Start Run** (Start kørsel): Klik på Start the run (Start kørsel).
19. Analysér resultaterne ved afslutningen af kørslen (se afsnittet Results).

Tabel 10. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-program til CFX96 Dx

Trin	Tid	Temperatur (°C)	Rampefrekvens (°C/sek.)	Antal gentagelser	Hentning
1. Revers transskription	10 min.	50	1,6	1	Nej
2. Første aktivering af PCR-opvarmning	2 min.	95	1,6	1	Nej
2-trinscyklus				39*	
Denaturering – afhærdning/forlængelse	5 sek.	95	1,6	1	Nej
	30 sek.	58	1,6	1	FAM, HEX og Cy5

*CFX fungerer ved gentagelse. Hvis programmet skal køre 40 cyklusser, skal man indstille 39 gentagelser for de to cyklusstrin (som trin 5 "GOTO" i softwaren).

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

Figur 4. Eksempel på pladeopsætning på CFX96 Dx

Protokol: Klargøring af prøve og SARS-CoV-2-detektion på cobas z 480

Denne protokol beskriver klarlægning af prøver og real-time RT-PCR for at påvise SARS-CoV-2-mål i humane næse-, næsesvælg- og svælgspodepinde, der opbevares i transportmedie, og i ufordyndede spytp prøver på cobas z 480 med LightCycler 480 SW UDF version 2.0.0 (eller nyere).

Vigtige anvisninger før start.

- Sørg for at overholde udløbsdatoerne og opbevaringsforholdene, som er påtrykt komponenternes æske og etiketter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Brug kun udstyr, der er korrekt vedligeholdt og kalibreret.
- Undgå kontaminering med RNaser under forsøget, og brug nukleasefri plastprodukter.

Ting, der skal gøres før start.

- Luftvejsprøver kan opbevares ved stuetemperatur under klarlægningstrinnene og reaktionsopsætningen, men det anbefales at opbevare dem på is eller ved 4 °C på et kølestativ.
- Spytp prøver kan opbevares på is eller ved 4 °C på et kølestativ, men det anbefales at opbevare dem ved stuetemperatur (15–25 °C) under klarlægningstrinnene og reaktionsopsætningen.
- Før brug stilles SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vand til NTC og SARS-CoV-2 Positive Control til fuldstændig optøning ved stuetemperatur (15–25 °C). Beskyt rørene mod sollys indtil brug, mens de optøs ved stuetemperatur.
- Inden brug skal du homogenisere SARS-CoV-2 UM Prep Buffer og SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ved at vende dem 2-3 gange (de må ikke vortexblandes) efterfulgt af et hurtigt spin. Øvrige individuelle reagenser kan homogeniseres ved at puls-vortexe dem i 3-5 sekunder eller ved at vende dem 2-3 gange efterfulgt af et hurtigt spin.

- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hæmmer RNaser i de kliniske prøver til detektionstrinnet, men er ikke en virusinaktiverende opløsning. Alle prøver skal håndteres som potentielt farlige.
- Kontrollér, at real-time RT-PCR-plattformens cyklusforhold stemmer overens med denne protokol.
- Reagenser kan overføres for at undgå flere fryse-/optøningscykluser.
- Klargør reaktionsblandingen (< 2 timer til real-time RT-PCR-pladestart).
- Prøven og real-time RT-PCR-klargøringerne skal foretages på særskilte steder for at minimere risikoen for kontaminering.

Procedure:

Klargøring af prøve: Ved luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde) følges trin 1. Ved spytp prøver fortsættes til trin 2.

1. Luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde):
 - 1a. Bland prøven og podepinden kraftigt i en vortex-mixer.
 - 1b. Overfør 50-200 µL prøve til 1,5 mL PCR-fri rør
 - 1c. Udfør opvarmningstrinnet ved 70 °C i 10 min. på en varmeblok.
 - 1d. Læg prøverne på is i mindst 5 min., og opbevar derefter prøverne på is eller ved 4 °C.
2. Spytp prøver:
 - 2a. Væskedannelse (for at lette pipettering): opvarm spytp prøven til 95 °C i 15 min. (uspecificeret volumen, beholder eller varmeenhed).
 - 2b. Homogeniser prøven ved forsigtigt at pipettere op og ned 8–10 gange.
 - 2c. Overfør 50 µL af prøven til et 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 2d. Udfør opvarmningstrinnet ved 95 °C i 15 min. på en varmeblok, og opbevar prøven ved stuetemperatur i mindst 5 minutter, indtil den overføres til PCR-brønd eller rør.
3. Ved første brug færdiggøres SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX Reference Dye.
 - 3a. Tilføj 32,8 µL ROX-farve til 1 rør SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Luk låget med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og ROX-farve, og vend røret 3 gange.
 - 3c. Spin SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-farve ned i bunden af røret.

4. En fuld plade af cobas z 480 (96 brønde) kræver klargøring af en alikvotblanding med SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Overfør de påkrævede volumener af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control ifølge tabel 11 til et nyt 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 4b. Luk låget, og vend røret 3 gange, eller impuls-vortex røret i 3-5 sek.
 - 4c. Spin SARS-CoV-2 Amp Primers med IC for at samle opløsningen i bunden af røret.

Tabel 11. Opsætning af SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding

SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding				Antal reaktioner – volumen (µL)
Reagenser	Stammekonzentration	Endelig konzentration	1 reaktion	96 reaktioner (+ 20 % ekstravolumen*)
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
Samlet SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding			8,75	1008

* **Bemærk:** Juster volumenerne af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dædvolumen.

5. Forbered en reaktionsblanding ifølge tabel 12, og bland den grundigt ved at vende bunden i vejret på beholderen 3 gange.

Tabel 12. Opsætning af reaktionsblanding

RT-PCR-reaktionsblanding				Antal reaktioner – volumen (µL)
Reagenser	Stammekonzentration	Endelig koncentration	1 reaktion	96 reaktioner (+20 % ekstravolumen*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX- blanding	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC- blanding	2,9x	1x	8,75	1008
Samlet reaktionsvolumen	–		15,00	1728

* **Bemærk:** Juster voluminerne af SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og SARS-CoV-2 Amp Primers efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dædvolumen.

- Dispensér 8 µL nukleasefrit vand i brønden til NEC.
- Tilføj 10 µL nukleasefrit vand til brønden til NTC.
- Dispensér 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i hver brønd til NEC og i de klargjorte prøver.
- Tilføj 8 µL af den klargjorte prøve til en brønd med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
- Tilføj 15 µL reaktionsblanding fra trin 5 til brøndene til prøver og kontroller (eksempel: figur 5). Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
- Tilføj 10 µL SARS-CoV-2 Positive Control til den relevante brønd. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
- Forsegl PCR-pladebrønden for at forhindre krydskontaminering. Sørg for at fordele trykket på hele pladen for at opnå en hermetisk lukning af alle brøndene.
- Centrifuger PCR-pladen kortvarigt for at samle væsken i bunden af brønden.
- Første brug:** Klik på **open tools** (Åbn værktøjer) i Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0-softwaren, og vælg **detection formats** (Detekteringsformater) for at indstille følgende magnetiserings-emissions-kombinationer: 465-510 (FAM), 540-580 (HEX), and 610-670 (ATTO647N).
- Indstil real-time RT-PCR-programmet iht. tabel 13 til en reaktionsvolumen på 25 µL.

Bemærk: Øverst på siden vælges **detection format** (Detekteringsformat) og derefter det detekteringsformat, som blev oprettet i trin 14.

Bemærk: Anvend en brugerdefineret rampefrekvens på 1,6 °C/sek. i hvert af de 5 trin af real-time RT-PCR-programmet.

Bemærk: Datahentning skal udføres under afhærdning/forlængelse-trinnet.

Bemærk: Du kan få flere oplysninger i *brugsanvisningen til cobas z 480*.

16. Placer pladen i real-time-cycleren (se figur 5 for et eksempel på en PCR-pladeopsætning).

17. Start kørslen.

18. Analysér resultaterne ved afslutningen af kørslen (se afsnittet Results).

Tablet 13. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-program til cobas z 480

Trin	Tid	Temperatur (°C)	Rampefrekvens (°C/sek.)	Antal cyklusser	Analysetilstand
Revers transskription	10 min.	50	1,6	1	Ingen
Første aktivering af PCR-opvarmning	2 min.	95	1,6	1	Ingen
2-trinscyklus				40	Kvantificering
Denaturering	5 sek.	95	1,6		Ingen
afhærdning/forlængelse	30 sek.	58	1,6		enkelt
Nedkøling	1 min.	37	1,6	1	Ingen

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

Figur 5. Eksempel på pladeopsætning på cobas z 480

Protokol: Klargøring af prøve og SARS-CoV-2-detektion på QuantStudio 5 Dx

Denne protokol er beregnet til klargøring og detektion af SARS-CoV-2-mål i humane næse-, næsesvælg- og svælgspodepinde i transportmedie og i ufortyndede spytpøver på QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR-instrumentet.

Vigtige anvisninger før start.

- Sørg for at overholde udløbsdatoerne og opbevaringsforholdene, som er påtrykt komponenternes æske og etiketter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Brug kun udstyr, der er korrekt vedligeholdt og kalibreret.
- Undgå kontaminering med RNaser under forsøget, og brug nukleasefri plastprodukter.
- Ved brug af QuantStudio 5 Dx skal ROX-farve tilføjes røret med master-blanding før første brug.

Ting, der skal gøres før start

- Luftvejsprøver kan opbevares ved stuetemperatur under klargøringstrinnene og reaktionsopsætningen, men det anbefales at opbevare dem på is eller ved 4 °C på et kølestativ.
- Spytpøven kan opbevares på is eller ved 4 °C på et kølestativ, men det anbefales at opbevare dem ved stuetemperatur (15–25 °C) under klargøringstrinnene og reaktionsopsætningen.
- ROX-farven skal bruges i forbindelse med QuantStudio 5.
- Før brug stilles SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vand til NTC og SARS-CoV-2 Positive Control til fuldstændig optøning ved (15–25 °C). Beskyt rørene mod sollys indtil brug, mens de optøs ved stuetemperatur.

- Inden brug skal du homogenisere SARS-CoV-2 UM Prep Buffer og SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ved at vende dem 2-3 gange (de må ikke vortexblandes) efterfulgt af et hurtigt spin. Øvrige individuelle reagenser kan homogeniseres ved at puls-vortexe dem i 3-5 sekunder eller ved at vende dem 2-3 gange efterfulgt af et hurtigt spin.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer hæmmer RNaser i de kliniske prøver til detektionstrinnet men er ikke en virusinaktiverende opløsning. Alle prøver skal håndteres som potentielt farlige.
- Kontrollér, at real-time RT-PCR-plattformens cyklusforhold stemmer overens med denne protokol.
- Reagenser kan overføres for at undgå flere fryse-/optøningscykluser.
- Klargør reaktionsblandingen (< 2 timer til real-time RT-PCR-pladestart).
- Prøven og real-time RT-PCR-klargøringerne skal foretages på særskilte steder for at minimere risikoen for kontaminering.

Procedure

Klargøring af prøve: Ved luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde) følges trin 1. Ved spytpøver fortsættes til trin 2.

1. Luftvejsprøver (næse-, svælgs- og næsesvælgspodepinde):
 - 1a. Bland prøven og pødepinden kraftigt i en vortex-mixer.
 - 1b. Overfør 50-200 µL prøve til 1,5 mL PCR-fri rør
 - 1c. Udfør opvarmningstrinnet ved 70 °C i 10 min. på en varmeblok.
 - 1d. Læg prøverne på is i mindst 5 min., og opbevar derefter prøverne på is eller ved 4 °C.
2. Spytprøver:
 - 2a. Væskedannelse (for at lette pipettering): opvarm spytpøven til 95 °C i 15 min. (uspecificeret volumen, beholder eller varmeenhed).
 - 2b. Homogeniser prøven ved forsigtigt at pipettere op og ned 8–10 gange.
 - 2c. Overfør 50 µL af prøven til et 1,5 mL PCR-frit rør.

- 2d. Udfør opvarmningstrinnet ved 95 °C i 15 min. på en varmeblok, og opbevar prøven ved stuetemperatur i mindst 5 minutter, indtil den overføres til PCR-brønd eller rør.
3. Ved første brug færdiggøres SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX Reference Dye.
 - 3a. Tilføj 32,8 µL ROX-farve til et rør SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
Luk låget med SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og ROX-farve, og vend røret 3 gange.
Spin SARS-CoV-2 UM Amp Buffer med ROX-farve ned i bunden af røret.
4. En fuld plade af QuantStudio 5 Dx (96 brønde) kræver klargøring af en alikvotblanding med SARS-CoV-2 Amp Primers med SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 3b.
 - 3c. 4a. Overfør de påkrævede volumener af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control ifølge tabel 14 til et nyt 1,5 mL PCR-frit rør.
 - 4b. Luk låget, og vend røret 3 gange, eller impuls-vortex røret i 3-5 sek.
 - 4c. Spin SARS-CoV-2 Amp Primers med IC for at samle opløsningen i bunden af røret.

Tabel 14. Opsætning af SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding

SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding				Antal reaktioner – volumen (µL)	
Reagenser	Stammekonzentration	Endelig koncentration	1 reaktion	96 reaktioner (+ 20 % ekstravolumen*)	
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	
Samlet SARS-CoV-2 Amp Primers + IC-blanding			8,75	1008	

* **Bemærk:** Juster volumenerne af SARS-CoV-2 Amp Primers og SARS-CoV-2 Internal Control efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dædvolumen.

5. Forbered en reaktionsblanding ifølge tabel 15, og bland den grundigt ved at vende bunden i vejret på beholderen 3 gange.

Tabel 15. Opsætning af reaktionsblanding

RT-PCR-reaktionsblanding				Antal reaktioner – volumen (µL)	
Reagenser	Stammekonzentration	Endelig koncentration	1 reaktion	96 reaktioner (+20 % ekstravolumen*)	
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX-blanding	4x	1x	6,25	720	

RT-PCR-reaktionsblanding				Antal reaktioner – volumen (µL)
SARS-CoV-2 Amp Primers + IC- blanding	2,9x	1x	8,75	1008
Samlet reaktionsvolumen	–		15,00	1728

* **Bemærk:** Juster voluminerne af SARS-CoV-2 UM Amp Buffer og SARS-CoV-2 Amp Primers efter antallet af prøver, der skal testes. Overvej at tilføje volumen for at kompensere for dædvolumen.

6. Dispensér 8 µL nukleasefrit vand i brønden til NEC.
7. Tilføj 10 µL nukleasefrit vand til brønden til NTC.
8. Dispensér 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i hver brønd til NEC og i de klargjorte prøver.
9. Tilføj 8 µL af den klargjorte prøve til en brønd med SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
10. Tilføj 15 µL reaktionsblanding fra trin 5 til brøndene til prøver og kontroller (eksempel: figur 6). Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
11. Tilføj 10 µL SARS-CoV-2 Positive Control til den relevante brønd. Bland ved at pipettere op og ned 5 gange.
12. Forsegl PCR-pladebrønden for at forhindre krydskontaminering. Sørg for at fordele trykket på hele pladen for at opnå en hermetisk lukning af alle brøndene.
13. Centrifuger PCR-pladen kortvarigt for at samle væsken i bunden af brønden.
14. **Første brug:** Skabelonen skal genereres i QuantStudio 5 Dx TD-softwaren version 1.0.1 eller nyere og publiceres, før kørslen startes i QuantStudio 5 Dx IVD-softwaren. Konfigurer skabelonen i overensstemmelse hermed:

Bemærk: I fanen **Properties** (Egenskaber) konfigureres **Experiment type** (Eksperimenttype) til **Standard Curve** (Standardkurve) og **Run mode** (Kørselstilstand) til **Standard**.

Bemærk: På fanen **Method** (Metode) indstilles real-time RT-PCR-programmet til en reaktionsvolumen på 25 µL (Tabel 16)

Bemærk: Datahentning skal udføres under afhærdning/forlængelse-trinnet.

Bemærk: I fanen **Plate** (Plade) vælges **ROX** som **Passive Reference** (Passiv referene), og FAM, VIC og Cy5 indstilles som mål uden quencher (vælg **None** (Ingen)).

Bemærk: Du kan få flere oplysninger i *brugsanvisningen til QuantStudio 5 Dx*.

-
15. I QuantStudio 5 Dx IVD-softwaren indlæses den skabelon, der tidligere blev oprettet i trin 14. Vælg de brugte brønde, og anvend målene FAM, VIC og Cy5.
 16. Placer pladen i real-time-cycleren (se figur 6 for et eksempel på en PCR-pladeopsætning).
 17. Start kørslen.
 18. Analysér resultaterne ved afslutningen af kørslen (se afsnittet Results).

Tabel 16. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-program til QuantStudio 5 Dx

Stadie	Trin	Tid	Temperatur (°C)	Antal cyklusser	Hentning
Hold	1. Revers transskription	10 min.	50	1	Nej
	2. Første aktivering af PCR-opvarmning	2 min.	95	1	Nej
PCR	2-trinscyklus			40	
	Denaturering – afhærdning/forlængelse	5 sek.	95	1	Nej
		30 sek.	58	1	FAM, VIC og Cy5

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

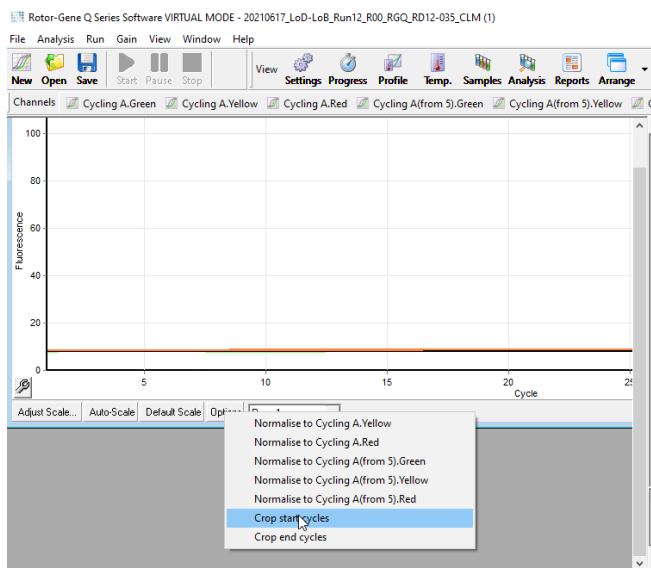
Figur 6. Eksempel på pladeopsætning på QuantStudio 5 Dx

Resultater

Analyse på RGQ MDx 5plex HRM

På RGQ MDx 5plex HRM analyseres dataene med Rotor-Gene Q-softwareversion 2.3.1 (eller nyere) i henhold til producentens anvisninger (brugervejledning til Rotor-Gene Q MDx, revision 7, september 2018).

Ved dataanalyse skal beskæringscyklussen anvendes (figur 7): Åbn kanalen med ubehandlede data **Cycling A.Green**. Gå til Options (Valgmuligheder) > **Crop Start Cycles** (Beskær startcyklusser), og indtast **5** i dialogboksen. Der genereres en ny kanal kaldet Cycling A(from 5).Green (Cyklus med A (fra 5).Grøn). Det samme skal gøres for råkanalerne Red og Yellow for at generere kanalerne **Cycling A(from 5).Red** og **Cycling A(from 5).Yellow**.



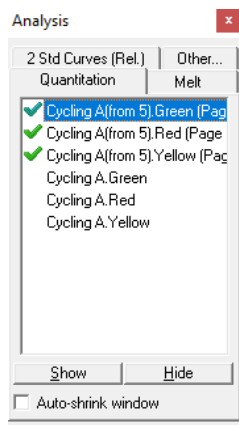
Figur 7. Skærbillede af opsætning af beskæringscyklusser for RGQ MDx 5plex HRM-kørselsanalyse

Åbn analysemenueen (figur 8), og anvend følgende analyseparametre for hver genereret kanal Cycling A(from 5) for at sikre konsistensen mellem de forskellige analyser (tabel 17).

Tabel 17. Analyseparametre til RGQ MDx 5plex HRM

Kanaler	Green	Red	Yellow
Fluorescensstærskel	0,03	0,03	0,03
Hældningskorrigering	Ja	Ja	Ja
Dynamisk rør	Ja	Ja	Ja
Udgangspunkt	Nej	10-20	10-20
Fjernelse af afvigelse: Tærskelværdi for reaktionseffektivitet	Ja Aktiveret 0 %	Nej	Nej
Beskårne startcyklusser	5	5	5
Afskæringscyklusser	Ct > 38,00 anses for 40,00	Nej	Ct > 35,00 anses for 40,00

I RGQ-softwaren er det muligt at se kørselsresultater i tabellen over kvantiteringsresultater, der åbnes under analysen. Dataene kan eksporteres som en .csv-fil med kommaseparerede værdier: Vælg **File (Fil) > Save as (Gem som) > Excel analysis sheet (Excel-analyseark)** i RGQ-softwarevinduet. Sørg for, at alle prøver er valgt, før resultaterne eksporteres (figur 8).



Figur 8. Skærmbillede af valgte kanaler til anvendelse af analyseparametre og eksport af resultater (RGQ MDx 5plex HRM udfører analysen).

Analyse på ABI 7500 Fast Dx

Dataene analyseres på ABI 7500 Fast Dx ved hjælp af 7500 Fast System, softwareversion 1.4.1 (eller nyere), ifølge producentens anvisninger. Vælg en gruppe af brønde eller hele pladen til analyse på fanen **Setup** (Opsætning), og højreklik for at åbne vinduerne til kontrol af brønde. Sørg for, at de 3 fluoroforer (FAM, VIC og Cy5) er valgt, og vælg **ROX** som **Passive reference** (Passiv reference). Følgende parametre er nødvendige for at sikre overensstemmelse mellem de forskellige analyser (tabel 18).

Tabel 18. Analyseparametre til ABI 7500 Fast Dx

Kanaler	FAM	Cy5	VIC
Passiv farvning	ROX	ROX	ROX
Fluorescensstærkskel	0,13	0,025	0,05
Baseline-sæt	Auto	Auto	Auto
Afskæringscyklusser	Ct > 39,00 anses for 40,00	Nej	Ct > 35,00 anses for 40,00

I ABI SDS-softwaren er det muligt at se Ct-værdierne for en valgt brøndgruppe eller hele pladen i arket **Data** på hovedsiden **Results** (Resultater). Dataene kan eksporteres som en .csv-fil med kommaseparerede værdier: Vælg **File** (Fil) > **Export** (Eksportér) > **Results** (Resultater) (alternativt menupunktet **Ct**) i SDS-softwarevinduet. Vælg .csv som eksportfilformat.

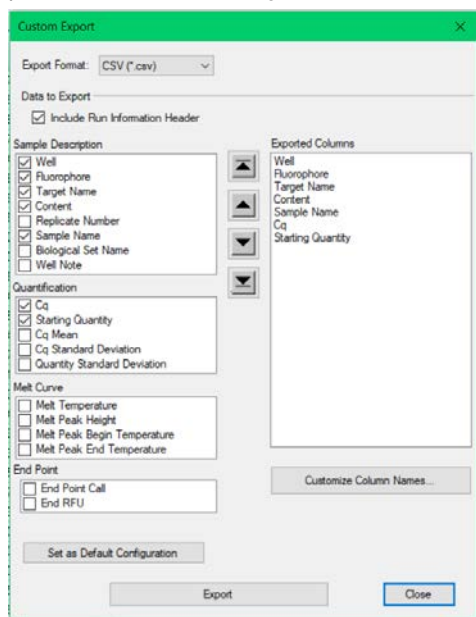
Analyse på CFX96 Dx

Dataene analyseres derefter på CFX96 Dx-instrumentet ved hjælp af CFX Manager Dx, softwareversion 3.1.3090.1022 (eller nyere), ifølge producentens anvisninger. Sørg for, at FAM, HEX og Cy5 er valgt for alle brøndene, der bruges i dette eksperiment. Følgende parametre er nødvendige for at sikre overensstemmelse mellem de forskellige analyser (tabel 19).

Tabel 19. Analyseparametre til CFX96 Dx

Kanaler	FAM	HEX	Cy5
Cq-bestemmelsestilstand:	Ja	Ja	Ja
Enkelt tærskel			
Baseline-indstilling:			
• fratrukket kurvetilpasning	Ja	Ja	Ja
• Korrigjer for fluorescensforskydning	Ja	Ja	Ja
Tærskel (RFU)	250	300	100
Afskæringscyklusser	Ct > 39,00 anses for 40,00	Ct > 35,00 anses for 40,00	Nej

I CFX Manager Dx-softwaren er det muligt at se Ct-værdierne (**Cq** i softwaren) for en valgt brøndgruppe eller hele pladen i dataarket i sektionen **Quantification Data** (Kvantificeringsdata). Dataene kan eksporteres som kommaseparerede tekstværdier (.csv) ved at vælge **Export** (Eksportér) > **Custom Export** (Brugerdefineret eksport) og vælge parametre i henhold til figur 9.



Figur 9. Filparametre for rådata til CFX96 Dx

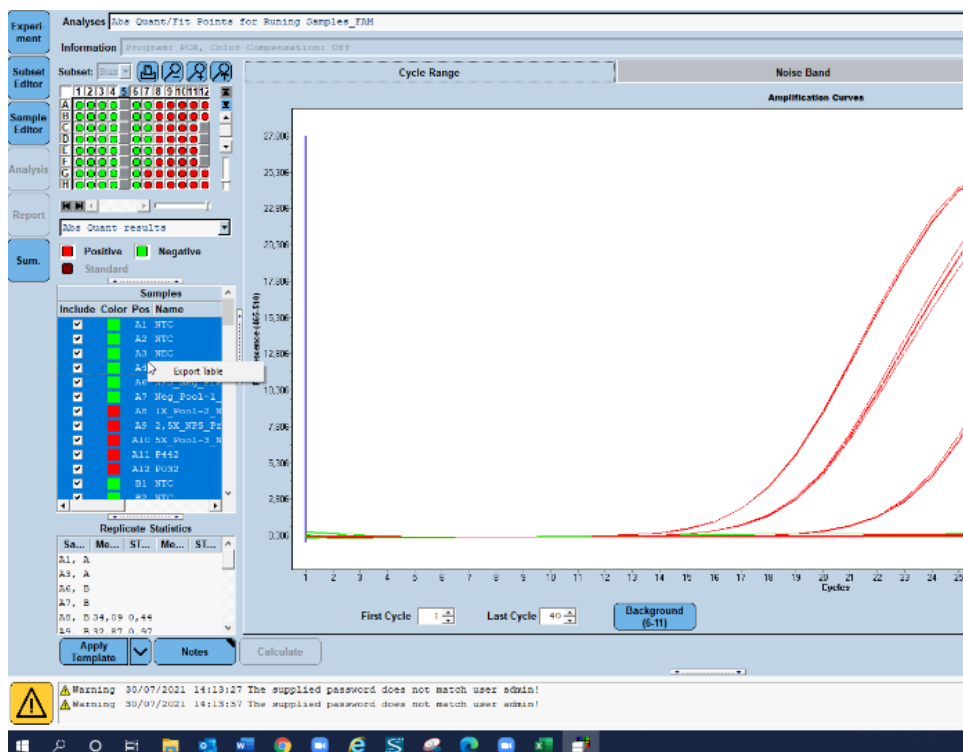
Analyse på cobas z 480

Dataene analyseres på cobas z 480-instrumentet ved hjælp af LightCycler 480 SW UDF, softwareversion 2.0.0 (eller nyere), ifølge producentens anvisninger. Opret et undersæt af prøver, der kun indeholder de brønde, som bruges i eksperimentet. Opret en analyseside med **Abs Quant/Fit Points** (Absolut kvantificering/Tilpas punkter) for hver kanal, og brug følgende parametre for at sikre konsistens mellem de forskellige eksperimenter (tabel 20).

Tabel 20. Analyseparametre til cobas z 480

Kanaler	FAM (465-510)	HEX (540-580)	ATTO647N (610-670)
Fane med cyklusintervaller			
• Første - sidste cyklus	1-40	1-40	6-40
• Baggrund	5/10	5/10	6/11
Fane med støjbånd			
• Metode	STD Multiplier	STD Multiplier	STD Multiplier
• STD Multiplier-værdi	50	40	25
Fane med analyser	2	2	2
• Tilpas punkter			
• Tærskelmetode	Auto	Auto	Auto
Afskæringscyklus	Ct > 39,00 anses for 40,00	Ct > 35,00 anses for 40,00	Nej

I LightCycler 480 SW UDF, version 2.0.0 (eller nyere), findes Ct-værdierne (**Cp** i softwaren) for en valgt brøndgruppe i sektionen **Analysis** (Analyse) (figur 10). Dataene kan eksporteres som en tekstfil (**.txt**) pr. kanal ved at højreklikke på resultattabellen og vælge **Export table** (Eksportér tabel).



Figur 10. Skærbillede af eksporterede data i LightCycler 480 SW UDF, version 2.0.0 (eller nyere).

Analyse på QuantStudio 5 Dx

Dataene analyseres på QuantStudio 5 Dx ved hjælp af QuantStudio 5 Dx IVD, softwareversion 1.0.1 (eller nyere), ifølge producentens anvisninger. Sørg for, at de 3 fluoroforer (FAM, VIC og Cy5) er valgt for alle brøndene, der bruges i dette eksperiment, i vinduet **Assign Targets and Samples** (Tildel mål og prøver), samt at **ROX** er valgt som **Passive reference** (Passiv reference). Følgende parametre er nødvendige for at sikre overensstemmelse mellem de forskellige analyser (tabel 21).

Tabel 21. Analyseparametre til QuantStudio 5 Dx

Kanaler	FAM	VIC	Cy5
Passiv farvning	ROX	ROX	ROX
Fluorescensstærskel	0,21	0,062	0,04
Baseline-sæt	Auto	Auto	Auto
Afskæringscyklusser	Ct > 39,00 anses for 40,00	Ct > 35,00 anses for 40,00	Nej

Dataene kan eksporteres som et regneark eller i tekstformat (.xls, .xlsx, .txt). Vælg alle valgmulighederne i sektionen **Content** (Indhold) på fanen **Export** (Eksport) i QuantStudio 5 Dx IVD-softwarevinduet, og vælg derefter **Unify the above content into one file** (Saml ovenstående i én fil).

Fortolkning af resultater

Positiv kontrol- (PC), N1- og N2-generne detekteres på fluorescenskanalen Green med RGQ MDx 5plex HRM eller på fluorescenskanalen FAM på ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 og QuantStudio 5 Dx.

Prøvetagningskontrollen, der består af RNase P, detekteres på fluorescenskanalen Yellow med RGQ MDx 5plex HRM eller på fluorescenskanalen VIC/HEX med ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 og QuantStudio 5 Dx. Hver kliniske prøve bør udvise en prøvekontrolamplifikation. For PC ses en Yellow-amplifikation på trods af fraværet af humane sekvenser. I dette tilfælde kan et signal på PC's Yellow-kanal ignoreres, da det stærke fluorescenssignal på Green-kanalen kan interferere med Yellow-kanalen. Den interne kontrol (IC) er inkluderet i SARS-CoV-2 Amp Primers. Den detekteres i kontrol uden skabelon (No Template Control, NTC), kontrol uden ekstrahering (No Extraction Control, NEC), positiv kontrol (Positive Control, PC) og kliniske prøver med fluorescenskanalen Red med RGQ MDx 5plex HRM eller på fluorescenskanalen Cy5/ATTO647N med ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 og QuantStudio 5 Dx. For at en real-time RT-PCR er gyldig, skal PC-, NTC- og NEC-kontrollerne fungere som vist i tabel 22 og tabel 23.

Tabel 22. Kør validitetskriterier og resultatfortolkning for RGQ MDx 5plex HRM

Kontrol	Detektion på kanalen Green	Detektion på kanalen Yellow	Detektion på kanalen Red	Fortolkning
Positiv kontrol (Positive Control, PC)	Ct ≤ 38,00	Indifferent	Indifferent	PC er gyldig.
	Ct > 38,00 eller ingen Ct	Indifferent	Indifferent	PC er ugyldig.
Ingen-skabelon-kontrol (No Template Control, NTC) eller Ingen-ekstrahering-kontrol (No Extraction Control, NEC)	Ct > 38,00 eller ingen Ct	Ct > 35,00 eller ingen Ct	Ja	NTC/NEC er gyldig.
	vrige kombinationer med amplifikation i Green eller Yellow		Indifferent	NTC/NEC er ugyldig.

Tabel 23. Kør validitetskriterier og resultatfortolkning for real-time RT-PCR-instrumenterne ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 og QuantStudio 5 Dx

Kontrol	Detektion i FAM-farve*	Detektion i VIC-/HEX-farve*	Detektion i Cy5/ATTO647N-farve*	Fortolkning
Positiv kontrol (Positive Control, PC)	Ct ≤ 39,00	Indifferent	Indifferent	PC er gyldig.
	Ct > 39,00 eller ingen Ct	Indifferent	Indifferent	PC er ugyldig.
Ingen-skabelon-kontrol (No Template Control, NTC) eller	Ct > 39,00 eller ingen Ct	Ct > 35,00 eller ingen Ct	Ja	NTC/NEC er gyldig.
Ingen-ekstrahering-kontrol (No Extraction Control, NEC)	Øvrige kombinationer med amplifikation i FAM eller VIC/HEX		Indifferent	NTC/NEC er ugyldig.

For at validere de testede prøver skal prøverne amplificeres og detekteres som forventet.

Tabel 24. Validitetskriterier for prøver og resultatfortolkning for RGQ MDx 5plex HRM

Detektion på kanalen Green	Detektion på kanalen Yellow	Detektion på kanalen Red	Fortolkning
Ct ≤ 38,00	Indifferent	Indifferent	Prøven er positiv for SARS-CoV-2-RNA.
Ct > 38,00 eller ingen Ct	Ct ≤ 35,00	Indifferent	Prøven er negativ, SARS-CoV-2-RNA blev ikke påvist.
Ct > 38,00 eller ingen Ct	Ct > 35,00 eller ingen Ct	Ja	Ugyldig prøve. Intet eller utilstrækkeligt humant materiale påvist. Ny prøvetagning påkrævet.
Ct > 38,00 eller ingen Ct	Ct > 35,00 eller ingen Ct	Nej	Ugyldig prøve. Real-time-RT-PCR-reaktion er hæmmet. Ny test påkrævet.

Tabel 25. Prøvevaliditetskriterier og resultatfortolkning for real-time-RT-PCR-instrumenterne ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 og QuantStudio 5 Dx.

Detektion i FAM-farve*	Detektion i VIC-/HEX-farve*	Detektion i Cy5/ATTO647N-farve*	Fortolkning
Ct ≤ 39,00	Indifferent	Indifferent	Prøven er positiv.
Ct > 39,00 eller ingen Ct	Ct ≤ 35,00	Indifferent	Prøven er negativ, SARS-CoV-2 ikke påvist.
Ct > 39,00 eller ingen Ct	Ct > 35,00 eller ingen Ct	Ja	Ugyldig prøve. Intet humant materiale påvist. Ny prøvetagning påkrævet.
Ct > 39,00 eller ingen Ct	Ct > 35,00 eller ingen Ct	Nej	Ugyldig prøve. Real-time-RT-PCR-reaktion er hæmmet. Ny test påkrævet.

Begrænsninger

- Kun til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Resultater fra *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit er ikke beregnet til at blive brugt som eneste grundlag for diagnose, behandling eller andre beslutninger i forbindelse med patientbehandling. Et negativt resultat udelukker ikke en infektion med SARS-CoV-2 og bør derfor ikke anvendes som eneste behandlingsgrundlag for behandling.
- Produktet skal anvendes af personale, som er specielt instrueret og uddannet i *in vitro*-diagnostiske procedurer.
- Brugsanvisningen til real-time-RT-PCR-plattformen (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 eller QuantStudio 5 Dx) skal følges nøje for at opnå optimale PCR-resultater.
- Bemærk nøje udløbsdatoerne, der er trykt på æsken og etiketterne til alle komponenter. Brug ikke komponenter, der er for gamle.
- Testens ydeevne er ikke blevet fastslået for spytp prøver fra patienter uden tegn og symptomer på respiratorisk infektion.
- For at undgå risikoen for et falsk negativ-resultat i tilfælde af en lav positiv klinisk prøve, hvis der observeres blodrester i røret, bør det noteres, og hvis prøven giver et negativt resultat ved brug af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, skal der tages en ny prøve fra patienten, som igen testes med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Ydelse

Analysesensitivitet (påvisningsgrænse)

Analysesensitiviteten eller påvisningsgrænsen defineres som den laveste koncentration, hvorved ≥ 95 % af de testede prøver genererer en positiv melding. Påvisningsgrænsen blev vurderet ved at analysere seriefortyndinger af negative næsesvælgprøver på podepind og flydende ufertyndede spytp prøver, der blev klargjort med lagre af inaktiverede virale partikler med høj titer, som blev indhentet hos kommercielle leverandører (ZeptoMetrix®). I eksperimenterne med påvisningsgrænsen blev der brugt to prøve-pools for hvert præparat. For at bekræfte den fastslåede påvisningsgrænsekonzentration skal alle replikaters påvisningsrate være ≥ 95 % (mindst 19/20 replikater skal generere et positivt signal).

Konzentrationen for påvisningsgrænsen blev bekræftet ud fra næsesvælgrumsprøver og ufertyndede spytp prøver på de hævdede real-time-RT-PCR-platforms (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx og cobas z 480).

Næse-, svælg- og næsesvælgprøver

Påvisningsgrænsen hævdes at være 950 cp/mL for RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx og QuantStudio 5 Dx og 475 cp/mL for cobas z 480 (se tabel 26)

Ufertyndede spytp prøver

Påvisningsgrænsen hævdes at være 950 cp/mL for RGQ MDx og 1200 cp/mL for ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx og CFX96 Dx (se tabel 26).

Tabel 26. Resultatoversigt over påvisningsgrænsen for hver real-time-RT-PCR-plattform

Platform	Prøvetype	Påvisningsgrænse bekræftet (cp/mL)
RGQ MDx	NPS	950
	Ufortyndet spyt	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Ufortyndet spyt	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Ufortyndet spyt	1200
cobas z 480	NPS	475
	Ufortyndet spyt	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Ufortyndet spyt	1200

Undersøgelser af analysespecificitet (inkludativitet og eksklusivitet/krydsreaktivitet)

Inklusivitet

Inklusiviteten hos *artus* SARS-CoV-2 Amp-primere og -prober er blevet vurderet ved en *in silico*-analyse af sekvenser fra GISAID-databaser (www.gisaid.org). I alt 722.488 sekvenser (tilgængelige 23/03/2021) blev analyseret på COVID CG (<https://covidcg.org>), alimenteret ved hjælp af GISAID-metadata. Sekvenser blev tilpasset WIV04-referencesekvenser (100 % identisk med Wuhan-Hu-1/NC_045512.2 med undtagelse af længden på poly-A-halen), og enkeltnukleotidvariationerne (Single Nucleotide Variations, SNVs) blev analyseret i det genomiske område, som *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit-primere og -prober målrettede mod. Prævalensen af de identificerede SNV'er blev under 1 %, og det samme gjorde frekvensen af de mutationer, der forekom samtidig. Der var ingen SNV på de sidste 1 til 3 nukleotider fra 3'-enden i de respektive nukleotider, hvilket ville være forventet, hvis ydeevne skulle være påvirket. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit anses for at kunne påvise 100 % af de offentliggjorte sekvenser.

Eksklusivitet/krydsreaktivitet

In silico-analyse

Eksklusiviteten hos *artus* SARS-CoV-2 Amp-primere og -prober er blevet vurderet ved en *in silico*-analyse af sekvenser gemt i NCBI-databasen. *In silico*-analysen viste, at nogle af de testede patogener havde over 80 % homologi med en af *artus* SARS-CoV-2-primere eller -proberne. Blandt disse er *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* og *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* havde under 80 % homologi med en af primere/proberne i SARS-CoV-2-analysen. *artus* SARS-CoV-2 Amp-primere og -proberne viste dog ingen mulig amplifikation med forskellige sekvenser gemt i NCBI nr/nt-databasen.

I alt 36 bakterie-, virus- og svampestammer er blevet analyseret (tabel 27) via *in silico*-PCR med en begrænset potentiel amplikonstørrelse på 500 bp. Der blev indsamlet patogensekvenser fra NCBI-databasen, men ingen af disse patogener viste amplifikation *in silico*. Tabel 27 viser listen over patogener, der er testet *in silico*.

Tabel 27. Liste over *in silico*-testede patogener.

Patogener	Stamme/type	Taksonomi-id	<i>In silico</i> -PCR-resultater
Adenovirus Type 3	Type 3	45659	Intet match
Adenovirus Type 4	Type 4	28280	Intet match
Adenovirus Type 5	Type 5	28285	Intet match
Adenovirus Type 7A	Type 7A	85755	Intet match
Adenovirus Type 14	Type 14	10521	Intet match
Adenovirus Type 31	Type 31	10529	Intet match
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Intet match
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Ingen mulig amplifikation*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Intet match
Enterovirus	Type 68	42789	Intet match

* Sekvensmatch med en af primere/proberne viste < 80 % homologi.

† Sekvensmatch med en af primere/proberne viste ≥80 % homologi.

(fortsættes på næste side)

Tabel 27. (fortsat fra foregående side)

Patogener	Stamme/type	Taksonomi-id	<i>In silico</i> -PCR-resultater
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Intet match
Human coronavirus	229E	11137	Intet match
Human coronavirus	NL63	277944	Intet match
Human coronavirus	HKU-1	290028	Intet match
Human coronavirus OC43	OC43	31631	Intet match
Human coronavirus	MERS-CoV	1335626	Intet match
Human metapneumovirus	i/r	162145	Intet match
Influenza A	H1N1	114727	Intet match
Influenza A	H3N2	119210	Intet match
Influenza B	i/r	11520	Intet match
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Intet match
Parainfluenzavirus	Type 1	12730	Intet match
Parainfluenzavirus	Type 2	2560525	Intet match
Parainfluenzavirus	Type 3	11216	Intet match
Parainfluenzavirus	Type 4	2560526	Intet match
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Intet match
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Ingen mulig amplifikation*
Respiratorisk syncytial-virus	Type A (RSV-A)	208893	Intet match
Respiratorisk syncytial-virus	Type B (RSV-B)	208895	Intet match
Rhinovirus	Type A	147711	Intet match
Rhinovirus	Type B	147712	Intet match
SARS-coronavirus	Tor2	694009	Ingen mulig amplifikation†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	i/r	1282	Intet match
<i>Streptococcus pyogenes</i>	i/r	1314	Ingen mulig amplifikation†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Ingen mulig amplifikation†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Intet match

* Sekvensmatch med en af primerne/proberne viste < 80 % homologi.

† Sekvensmatch med en af primerne/proberne viste ≥80 % homologi.

In vitro-analyse

Krydsreaktiviteten blev verificeret *in vitro* med patogener med $\geq 80\%$ homologi med SARS-CoV-2 Amp Primers i *in silico*-analysen. Prøverne blev klargjort ved at tilsætte potentielt krydsreaktive organismer i næsesvælgsprøvematricen ved 10^6 cp/mL, undtagen med SARS-CoV-1, der blev testet ufortyndet i henhold til leverandørens anbefaling. Ingen af disse patogener viste *in vitro*-krydsreaktivitet.

Den mikrobielle interferens ved *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit-analysen er blevet vurderet *in vitro* på et panel med anbefalede (tabel 28). Prøverne blev klargjort ved at tilsætte maksimalt 5 patogener ved 105 TCID50/mL for virale mål, 10^6 cp/mL for bakterielle mål og svampemål, eller ved den højest mulige koncentration baseret på stammekonzentrationen, i negative næsesvælgsprøver ved $2,87 \times \text{LoD}$ med inaktiverede SARS-CoV-2-partikler (Zeptomatrix). NATrol™ Panels og SARS-CoV-1 blev tilsat direkte med inaktiverede SARS-CoV-2-viruspartikler (Zeptomatrix) ved $2,87 \times \text{LoD}$. Resultaterne for alle testede mikroorganismepuljer og deres respektive koncentrationer fremgår herunder.

Tabel 28 viser listen over testede patogener i mikrobiel interferens.

Tabel 28. Liste over *in vitro*-testede patogener i mikrobiel interferens.

Pool-id/ prøve-id	Mikroorganisme	Kilde	Endelig koncentration	Enhed	Resultat
Pulje 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/mL	Ingen interferens
	Human coronavirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/mL	
	Human coronavirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/mL	
	Human coronavirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID50/mL	
	Adenovirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID50/mL	
	Parainfluenzavirus 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID50/mL	
Pulje 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/mL	Ingen interferens
	Adenovirus T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/mL	
	Parainfluenzavirus 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/mL	
	Influenza B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/mL	
	Rhinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/mL	

(fortsættes på næste side)

Tablet 28 (fortsat fra foregående side)

Pool-id/ prøve-id	Mikroorganisme	Kilde	Endelig koncentration	Enhed	Resultat
Pulje 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/mL	Ingen interferens
	Parainfluenzavirus 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	
Pulje 4	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	
Pulje 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/mL	Ingen interferens
	Respiratorisk syncytialvirus RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/mL	
	Influenza A H1N1 California	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/mL	
	Enterovirus Type 68 Major Group	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/mL	
	Adenovirus T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/mL	
Pulje 6	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	
	Human metapneumovirus (hMPV) type B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/mL	
	Respiratorisk syncytialvirus type B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/mL	

(fortsættes på næste side)

Tablet 28 (fortsat fra foregående side)

Pool-id/ prøve-id	Mikroorganisme	Kilde	Endelig koncentration	Enhed	Resultat
Pulje 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/mL	Ingen interferens
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/mL	
	Parainfluenzavirus 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/mL	
	Influenza A H3N2 Switzerland/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/mL	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/mL	
Pulje 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/mL	Ingen interferens
	NATrol Panel RP1 (Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY/02/2009), Rhinovirus (Type 1A), Adenovirus T3, Parainfluenza T1, Parainfluenzavirus T4, Metapneumovirus (Peru 6- 2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Coxsackievirus (Type A1)	Zeptomatrix (MDZ001)	Ukendt*	Ikke relevant	
Pulje 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/mL	Ingen interferens
	NATrol Panel RP2 (Influenza A H1 (New Caledonia/20/99), Influenza B (Florida/02/06), RSV-A, Parainfluenza T2, Parainfluenza T3, Coronavirus HKU rekombinant, Coronaviruses (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639)	Zeptomatrix (MDZ001)	Ukendt*	Ikke relevant	
Pulje 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/mL	Ingen interferens
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Ukendt*	Ikke relevant	

* Koncentration ikke oplyst af leverandør.

Interfererende stoffer

Næse-, svælg- og næsesvælgspøve på pødepind

Effekten af formodede interfererende stoffer (i forhold til stofferne i tabel 29) er bedømt på ydelsen af artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Der blev udført test i 3 puljer med negative næsesvælgspøvepinde og i 3 puljer med positive næsesvælgspøvepinde tilsat ved 4 x LoD med inaktiverede SARS-CoV-2-viruspartikler (Zeptomatrix). Eksperimenterne blev udført på RQG MDx 5plex HRM-plattformen (på 4 instrumenter) af 1 operatør med 1 pilotkit.

Hver pulje blev opdelt i 2 for at teste enten det interfererende stof opløst i et opløsningsmiddel (testprøve) eller i opløsningsmidlet alene (kontrolprøve). Genfindelsesforhold i fluorescenskanalerne Green og Red blev sammenlignet med testen og dens tilsvarende kontrolprøver. Ved fravær af interferens har testen og dens tilsvarende kontrolprøver samme genfindelsesforhold.

Tabel 29 viser, at ingen af de testede stoffer påvirker ydelsen af artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i fluorescenskanalen Green.

Tabel 29. Liste over interfererende stoffer og genfindelsesforhold opnået på kanalen Green.

Interfererende stoffer	Funktion	Testet koncentration	Resultater for genfindelsesforhold med negativ næsesvælgspøvepind	Resultater for genfindelsesforhold for positiv (4 x LoD) næsesvælgspøvepind
Tobramycin	Systemisk antibiotikum	1 mg/mL	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
Mupirocin	Antibiotikum, næsesalve	6,6 mg/mL	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
Fluticason	Næsekortikosteroider	5 % (v/v)	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
Menthol (halstabletter)	Oralt anæstetikum og analgetikum	0,5 mg/mL	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
Oxymetazolin	Næsespray	10 % (v/v)	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15

Fortsættes på næste side

Tabel 29 (fortsat fra foregående side)

Interfererende stoffer	Funktion	Testet koncentration	Resultater for genfindelsesforhold med negativ næsesvælgspodepind	Resultater for genfindelsesforhold for positiv næsesvælgspodepind (4 x LoD)
Osetamivir	Antiviralt lægemiddel	3,3 mg/mL	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
Mucin (bovin submaksillær kirtel type I-S)		2,5 mg/mL	Ingen interferens 0/15	Ingen interferens 15/15
Helblod		4 % (v/v)	Ingen interferens 1/15*	Ingen interferens 15/15

* Der er registreret en amplifikation, der svarer til en artefakt.

Ufortyndede spytp prøver

Effekten af otte formodede interfererende stoffer (i forhold til stofferne i tabel 30) er blevet bedømt på ydelsen af artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Der blev udført tests i pool 1 med negative ufortyndede spytp prøver, der er delt i to for at opnå to fortyndingsniveauer: (1) negative ufortyndede spytp prøver og (2) kunstigt positive ufortyndede spytp prøver (opnået med tilsætning ved 3x LoD (3600 cp/mL) med inaktiverede SARS-CoV-2-virale partikler (Zeptomatrix) i negativ-poolen). Ufortyndede spytp prøver blev testet med cobas z 480-plattform med 3 brugere med ét kommercielt kit.

For hvert interfererende stof blev prøvereplikaterne opdelt i 2 for at teste enten det interfererende stof opløst i et opløsningsmiddel (testprøve) eller i opløsningsmidlet alene (kontrolprøve). Genfindelsesforhold i fluorescenskanalerne Green, Red og Yellow blev sammenlignet med testen og dens tilsvarende kontrolprøver. Ved fravær af en interferens har testen og dens tilsvarende kontrolprøver samme genfindelsesforhold.

Hvad angår en kvalitativ analyse (prøvestatus), påvirker de otte testede interfererende stoffer (se tabel 30) ikke resultaterne af artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit på positive og negative spytp prøver.

Tabel 30 viser, at ingen af de testede stoffer påvirker ydelsen af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i fluorescenskanalen Green.

Tabel 30. Liste over det interfererende stof og genfindelsesforholdene opnået på kanalen Green.

Interfererende stof*	Funktion	Testet koncentration	Resultater for genfindelsesforhold i negative ufortyndede spytprøver	Resultater for genfindelsesforhold i positive (3 til 5 x LoD) ufortyndede spytprøver
Helblod	Endogent stof: Humant gDNA, leukocytter, erythrocytter	1 % v/v	Ingen interferens* 0/8	Ingen interferens* 8/8
Altoids®	Slik	2 % w/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
Aspirin	Antiinflammatorisk lægemiddel	1 % w/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
Listerine®	Antiseptisk mundskyllevæske	1 % v/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
Ricola®	Slik	1 % w/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
Colgate® Total SF Whitening™-tandpasta	Tandpasta med blegningseffekt	0,1 % w/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
Tussidane®-sirup	Lægemiddel mod tør hoste	1 % v/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8
Pulmofluide®	Lægemiddel mod våd hoste	1 % v/v	Ingen interferens 0/8	Ingen interferens 8/8

* Med helblodsanalysen blev der observeret en interfererende effekt fra IC-detektionen på kanalen Red (10-40 % hæmning), uden at det dog påvirkede prøvens validitet. På kanalen Green blev prøvens status ikke påvirket af helblodet, men der blev observeret en lille Ct-forskydning (gennemsnitligt 1,35 Ct senere med helblod sammenlignet med kontrolprøven).

For at undgå risikoen for et falsk negativ-resultat i tilfælde af en lav positiv klinisk prøve, hvis der observeres blodrester i røret, bør det noteres, og hvis prøven giver et negativt resultat ved brug af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, skal der tages en ny ufortyndet spytp prøve fra patienten, som igen testes med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Undersøgelse af prøvestabilitet

Undersøgelsen af prøvestabilitet blev udført for at vurdere effekten af forskellige prøveopbevaringsforhold hos de kvalitative (genfindelsesforholdsanalyse) og de kvantitative (Ct-forskydningsanalyse) resultater med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kits. Eksperimenterne blev udført ved at analysere to fortyndingsniveauer: (1) negative prøver og (2) kunstigt positive prøver, der blev opnået ved at tilsætte inaktiverede SARS-CoV-2-virale partikler (Zeptomatrix). For at bekræfte prøvernes stabilitet (spyt og NPS) var det påkrævet, at ≥ 95 % af replikaterne gav samme genfindelsesforhold og en Ct-forskydning på ≤ 10 % i forhold til tidspunktet 0 for hver stabilitetsbetingelse, der forekommer.

Næse-, svælgs- og næsesvælgsprøver:

De forskellige afprøvede stabilitetsbetingelser er angivet i tabel 31. Der blev anvendt 3 prøve-pools ved de udførte tests. Negative NPS-prøver, 5x LoD (4750 cp/mL) kunstige positive NPS-prøver og tre lot med batchfrigivelsesprøver BRS1 (N2-streng, 1000 cp/10 μ L), BRS2 (RNAse P gblock, 1000 cp/10 μ L) og BRS3 (N1-streng, 1000 cp/10 μ L) blev testet med ABI 7500 Fast Dx-plattformen.

Ud fra de kvalitative og kvantitative analyseresultater påvirkede NPS-prøvernes opbevaringsbetingelser ikke genfindelsesforholdet (den forventede status blev påvist), og de førte ikke til signifikante Ct-forskytninger hos resultaterne for *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM kit. Dermed var kittets ydeevne stabil på trods af, at de testede NPS-prøver blev opbevaret under forskellige betingelser (se tabel 31).

Tabel 31 viser stabilitetsbetingelser for næsesvælgsprøver

Tabel 31. Stabilitetsbetingelser for næsesvælgprøver.

Betingelser	Påstået prøvestabilitet
F/T	3 F/T
4 °C (2 °C til 8 °C)	72 t
-70 °C	2 uger

Ufortyndede spytpøver

De forskellige afprøvede stabilitetsbetingelser er angivet i tabel 32. Der blev anvendt 2 prøve-pools ved de udførte tests. Negative ufortyndede spytpøver og 3xLoD (3600 cp/mL) kunstige positive ufortyndede spytpøver blev testet med ABI 7500 Fast Dx-plattformen.

Ud fra de kvalitative og kvantitative analyseresultater påvirkede opbevaringsbetingelserne ikke genfindelsesforholdet (den forventede status blev påvist), og de førte ikke til signifikante Ct-forskytninger hos resultaterne for *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM kit*. Dermed var kittets ydeevne stabil på trods af, at de testede ufortyndede spytpøver blev opbevaret under forskellige betingelser.

Tabel 32 viser prøvestabilitetsbetingelser for ufortyndet spyt.

Tabel 32. Prøvestabilitetsbetingelser for ufortyndet spyt

Betingelser	Påstået prøvestabilitet
F/T	3 F/T
Stuetemperatur (18 °C til 26 °C)	72 t
4 °C (2 °C til 8 °C)	72 t
Kombinerede forhold: (6 t ved stuetemperatur kombineret med 72 t ved 4 °C (2 til 8 °C) kombineret med 8 dage ved -20 °C (-30 °C til -15 °C)	6 t stuetemperatur, derefter 72 t ved 4 °C (2 til 8 °C), derefter 7 dage ved -20 °C (-30 °C til -15 °C)
-20 °C (-30 °C til -15 °C)	1 måned (30,5 dage)

Præcision

Præcisionsundersøgelsen bedømte reproducerbarheden (samme prøve gentages i forskellige kørsler og under forskellige forhold: 5 dage, 3 kit-lot, 3 operatører og 2 instrumenter) og repeterbarhed (samme prøve gentages i samme kørsel og under samme forhold). Der blev udført test på negative næsesvælgsprøver på podepinde og på negative næsesvælgsprøver på podepinde tilsat 5 x LoD på RGQ MDx.

Der blev indsamlet 204 datapunkter pr. fortyndingsniveau. Repeterbarheds- og reproducerbarhedsdata blev anvendt til at bestemme standardafvigelsen (Standard Deviation, SD) og variationskoefficienten (Coefficient of Variation, %CV) hos SARS-CoV-2 målene i den grønne, gule og røde kanal. Tabel 33 viser, at *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit har en samlet præcision på 0,63 SD (2,03 %CV) i den grønne kanal, 0,54 SD (2,22 %CV) i den gule kanal og 1,28 SD (4,10 %CV) i den røde kanal.

Tabel 33. Standardafvigelse og variationskoefficient for *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Prøver og detektionskanal	I alt	Dag til dag	Batch til batch	Operatør til operatør	Instrument til instrument	Kørsel til kørsel	Inden for kørsel
Standardafvigelse (SD) (Variationskoefficient (% CV))							
Negativ NPS Kanalen Yellow	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
Negativ NPS Kanalen Red	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
Tilsat NPS Kanalen Green	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
Tilsat NPS Kanalen Yellow	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
Tilsat NPS Kanalen Red	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

Klinisk ydeevne

Næsesvælgspodepinde

Den kliniske ydeevne af *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-analysen blev evalueret ved hjælp af retrospektive næsesvælgsprøver på podepind i transportmedie bestående af 150 kliniske prøver.

Alle prøver blev taget hos patienter med tegn og symptomer på COVID-19-infektion og opbevaret nedfrosset indtil brug.

Den kliniske validering blev udført på ABI 7500 Fast Dx. Tabel 34 viser ydeevnen af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i forhold til referencemetoden.

Tabel 34. Klinisk ydeevne af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i forhold til en referencemetode.

Prøvestatus	N	% positive	95 % CI	% negative	95 % CI
Positiv	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Negativ	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7–97,8

Uoverensstemmende resultater blev vurderet ud fra en tredje metode og genanalyseret ved hjælp af en kontingenstabel. De samlede resultater for den kliniske ydeevne vises som positiv procentvis overensstemmelse (Positive Percent Agreement, PPA) og negativ procentvis overensstemmelse (Negative Percent Agreement, NPA) i tabel 35.

Tabel 35. Klinisk ydeevne af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit efter uoverensstemmende resultatanalyse.

Prøvestatus	N	% positive	95 % CI	% negative	95 % CI
Positiv	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	–
Negativ	98	5,1 (5/98)	–	94,9 (93/98)	88,7–97,8

Nedenfor er den brøkdelt af prøver, der stemmer overens, og positive og negative procentvise overensstemmelse (henholdsvis PPA og NPA) med de forventede prøvestatusser:

Positiv procentvis overensstemmelse

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

Negativ procentvis overensstemmelse

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

Næsesvælgspodepinde inkl. personer uden symptomer

Den kliniske ydeevne af *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-analysen blev evalueret ved hjælp af retrospektive næsesvælgsprøver på podepind i transportmedie bestående af 153 kliniske prøver.

Alle prøver blev indsamlet fra patienter uden symptomer eller andre årsager, der kunne give mistanke om COVID-19-infektion.

Den kliniske validering blev udført på ABI 7500 Fast Dx. Seksten prøver blev ekskluderet fra analysen efter testning med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit på grund af en ugyldig status i henhold til prøvevaliditetskriterierne (tabel 23).

Tabel 36 viser ydeevnen af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i forhold til referencemetoden, der vises som positiv procentvis overensstemmelse (Positive Percent

Agreement, PPA) og negativ procentvis overensstemmelse (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabel 36. Klinisk ydeevne af *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* i forhold til en referencemetode

Prøvestatus	N	% positive	95 % CI	% negative	95 % CI
Positiv	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	36,0 (18/50)	-
Negativ	87	1,15 (1/87)	-	98,85 (86/87)	93,8–99,8

Nitten uoverensstemmende resultater blev vurderet ud fra en tredje metode og genanalyseret ved hjælp af en kontingenstabel. De samlede resultater for den kliniske ydeevne vises som positiv procentvis overensstemmelse (Positive Percent Agreement, PPA) og negativ procentvis overensstemmelse (Negative Percent Agreement, NPA) i tabel 37.

Tabel 37. Klinisk ydeevne af *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* efter uoverensstemmende resultatanalyse

Prøvestatus	N	% positive	95 % CI	% negative	95 % CI
Positiv	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0 (0/32)	-
Negativ	105	0,95 (1/105)	-	99,05 (104/105)	94,8–99,8

Atten falsk negative prøver blev omklassificeret som sandt negative, mens den ene falsk positive forblev falsk positiv.

Nedenfor er den brøkdelt af prøver, der stemmer overens, og positive og negative procentvise overensstemmelse (henholdsvis PPA og NPA) med de forventede prøvestatusser:

Positiv procentvis overensstemmelse

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

Negativ procentvis overensstemmelse

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

Ufortyndede spytp prøver

Den kliniske ydeevne af *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-analysen blev evalueret ved hjælp af ufortyndede spytp prøver bestående af 142 spytp prøver.

Alle prøver blev taget hos patienter med tegn og symptomer på COVID-19-infektion. Den kliniske validering blev udført på ABI 7500 Fast Dx. Tolv prøver blev ekskluderet fra analysen efter testning med *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit samt referencemetoden på grund af, at begge test viste ugyldig status i henhold til prøvevaliditetskriterierne.

Tabel 38 viser ydeevnen af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i forhold til referencemetoden.

Tabel 38. Klinisk ydeevne af *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit i forhold til en referencemetode.

Prøvestatus	N	% positive	95 % CI	% negative	95 % CI
Positiv	45	93,33 (42/45)	82,14–97,71	6,67 (3/45)	-
Negativ	85	0 (0/85)	-	100 (85/85)	95,68–100,00

Tre uoverensstemmende resultater blev vurderet ud fra en tredje metode og genanalyseret ved hjælp af en kontingenstabel. De samlede resultater for den kliniske ydeevne vises som positiv procentvis overensstemmelse (Positive Percent Agreement, PPA) og negativ procentvis overensstemmelse (Negative Percent Agreement, NPA) i tabel 39.

Tabel 39. Klinisk ydeevne af artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit efter uoverensstemmende resultatanalyse.

Prøvestatus	N	% positive	95 % CI	% negative	95 % CI
Positiv	43	97,67 (42/43)	87,94–99,59	2,32 (1/43)	-
Negativ	87	0 (0/87)	-	100 (87/87)	95,77–100,00

To falsk negative prøver blev omklassificeret som sandt negative, mens den ene falsk negative forblev falsk negativ.

Nedenfor er den brøkdelt af prøver, der stemmer overens, og positive og negative procentvise overensstemmelse (henholdsvis PPA og NPA) med de forventede prøvestatusser:

Positiv procentvis overensstemmelse

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

Negativ procentvis overensstemmelse

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

Litteraturhenvisninger

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>

Fejlsøgningsvejledning

Denne fejlsøgningsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden med hyppigt stillede spørgsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) hos vores tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Kommentarer og forslag

Svagt eller intet grønt signal (FAM) i positiv kontrol (Positive Control, PC)

- | | |
|---|--|
| a) Den valgte fluorescenskanal for RT-PCR-dataanalyse stemmer ikke overens med protokollen. | Ved dataanalyse vælges fluorescenskanalen FAM (grøn) til de analytiske SARS-CoV-2 RT-PCR-mål, fluorescenskanalen HEX/VIC/JOE (gul) til prøvekontrollen og Cy5/Atto (rød) for den interne kontrol. |
| b) Forkert programmering af temperaturprofilen. | Sammenlign RT-PCR-programmet med protokollen. |
| c) Forkert konfiguration af PCR-reaktionen | Kontrollér dine arbejdsstrin ved hjælp af pipetteringsskemaet, og gentag i givet fald PCR'en. |
| d) Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med instruktionerne, eller også er <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR-kittet udløbet. | Følg opbevaringsforholdene, kontrollér reagensets udløbsdato, og anvend om nødvendigt et nyt kit. |
| e) Forkert konfiguration af real-time RT-PCR-plattformen under datakonfigurationen. | Anvend de anbefalede konfigurationer, der relaterer sig til din real-time RT-PCR-plattform, og som er beskrevet i denne brugsanvisning. |
| f) PCR blev hæmmet. | Følg god praksis for molekylærbiologiske laboratorier for at undgå introduktionen af forurenende stoffer. Sørg for, at arbejdsstedet og apparaterne regelmæssigt dekontamineres. Følg den protokol, der er nævnt i denne brugsanvisning. Kontrollér reagensets udløbsdato, og brug om nødvendigt et nyt kit. Gentag analysen med en anden prøve. |

Grønt signal (FAM) i kontrollen uden skabelon eller i ingen-ekstrahering-kontrollen

Der opstod kontaminering ved SARS-CoV-2-sekvenser under klargøring af RT-PCR-pladen.

Gentag RT-PCR med nye reagenser. Følg god praksis for molekylærbiologiske laboratorier for at undgå introduktionen af forurenende stoffer. Følg den protokol, der er nævnt i denne håndbog. Sørg for, at arbejdsstedet og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.

Kommentarer og forslag

Svagt eller intet rødt signal (Cy5/Atto) fra den interne kontrol











- a) Der er introduceret et interfererende stof i RT-PCR-reaktionen. PCR er hæmmet.
- Følg god praksis for molekylærbiologiske laboratorier for at undgå introduktionen af forurenende stoffer.
- Sørg for, at arbejdsstedet og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.
- Følg den protokol, der er nævnt i denne brugsanvisning.
- Gentag eksperimentet med en nyindsamlet prøve.
- b) Den interne kontrol er nedbrudt.
- Følg god praksis for molekylærbiologiske laboratorier for at undgå introduktionen af RNaser. Følg de anbefalinger, der er nævnt i denne brugsanvisning.
- Sørg for, at arbejdsstedet og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.
- Følg opbevaringsforholdene, kontrollér reagensets udløbsdato, og anvend om nødvendigt et nyt kit.
- c) Forkert konfiguration af real-time RT-PCR-platformen under datakonfigurationen.
- Anvend de anbefalede konfigurationer, der relaterer sig til din real-time RT-PCR-platform, og som er beskrevet i denne brugsanvisning.





Svagt eller intet gult signal (VIC/HEX) fra prøvekontrollen

- a) Den kliniske prøve er nedbrudt.
- Følg anbefalingerne fra producenten af prøvetagningsenheden i forbindelse med opbevaring, håndtering og transport.
- Følg den protokol, der er nævnt i denne brugsanvisning, herunder prøveklargøringstrinnene til SARS-CoV-2 UM Prep Buffer.
- Følg opbevaringsforholdene, og kontrollér reagensets udløbsdato, eksempelvis SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, og anvend om nødvendigt et nyt kit.
- b) Prøven blev ikke indsamlet på korrekt vis. Der blev ikke indsamlet tilstrækkeligt med humane celler på podedipinden, eller også blev der ikke overført tilstrækkeligt med humane celler i transportmediet.
- Følg anbefalingerne fra producenten af prøvetagningsenheden i forbindelse med indsamling og håndtering af prøver.
- c) Forkert konfiguration af real-time RT-PCR-platformen under datakonfigurationen.
- Anvend de konfigurationer, der relaterer sig til din real-time RT-PCR-platform, og som er beskrevet i denne brugsanvisning.

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes i brugsanvisningen eller på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
	Indeholder reagenser til 768 eller 3072 reaktioner
	Holdbarhedsdato
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
	Globalt handelsvarenummer
Rn	R står for revision af brugsanvisningen, og n står for revisionsnummeret
	Temperaturbegrænsning

Symbol	Symboldefinition
	Producent
	Læs brugsanvisningen
	Opbevares uden for sollys
	Advarsel/forsigtig

Kontaktoplysninger

Kontakt QIAGEN Teknisk Service på **support.qiagen.com** for at få teknisk assistance og yderligere oplysninger.

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Til 768 reaktioner: Klargøringsbuffer, ROX-farve, master-blanding, primere og prober, intern kontrol, vand (NTC) og positiv kontrol	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Til 3072 reaktioner: Klargøringsbuffer, ROX-farve, master-blanding, primere og prober, intern kontrol, vand (NTC) og positiv kontrol	4511469
Instrument og tilbehør		
PCR tubes, 0,1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Til brug med 72-Well Rotor, båndrør og - hætter	981103
Rotor-Gene Q software	Rotor-Gene Q software v2.3.1 (eller nyere)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Realtids-PCR-cycler med 5 kanaler, High- Resolution Melt analyzer, software, bærbar computer og tilbehør, 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation	9002032
72-Well Rotor	Til opbevaring af Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, reaktionsvolumener på 10–50 µL	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Til at låse Strip Tubes and Caps, 0,1 ml i 72-Well Rotor	9018904

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser findes i håndbogen eller brugsvejledningen til det pågældende QIAGEN-kit. Håndbøger og brugsvejledninger til

QIAGEN-kits kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale distributør.

Revisionshistorik for dokumentet

Revision	Beskrivelse
R1, april 2021	Første udgivelse.
R2, juli 2021	Udvidelse af påstået ydeevne: Test er blevet fastslået for personer uden symptomer. Tilsigtet anvendelse er blevet opdateret til at omfatte personer uden symptomer eller andre årsager, der kunne give mistanke om COVID-19-infektion. Afsnit om klinisk ydeevne, når personer uden symptomer inkluderes, er føjet til Ydeevnedata.
R3, september 2021	Udvidelse af påstået ydeevne: <ol style="list-style-type: none">1. Tilføjelse af test af spytpøver.2. Modifikation af workflowet.3. Til 3 yderligere platforme og deres respektive software: CFX96 Dx med CFX Manager Dx-software version 3.1.3090.1022 (eller nyere), cobas z 480 med LightCycler 480 SW UDF version 2.0.0 (eller nyere) og QuantStudio 5 Dx med QuantStudio 5 Dx IVD-software version 1.0.1 (eller nyere).4. Påvisningsgrænsen for de 3 ekstra platforme (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) blev tilføjet til afsnittet Ydeevne for prøver taget med næse-, næsesvælgs- og svælgspelepinde.5. Afsnittet Ydelseskarakteristika er blevet opdateret.6. Det er kun RGQ-instrumentets fluorescenskanaler (Green, Red, Yellow), der er bevaret (farvenavnene i parentes er blevet slettet).7. Farvenavnene er kun bevaret ved CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 og QuantStudio 5 Dx.8. Fluorescensfiltrene A/1, B/2 og E/5 blev slettet ved ABI7500 Fast Dx. Det er kun farvenavnene, der er bevaret (Fam, Vic og Cy5).9. Tydeliggørende ændringer i afsnittet om klinisk ydeevne, tabel 34-37.
R4, januar 2022	Rettelse af stavefejl i tabel 39.

Aftale om begrænset licens for *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i panelet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette panel med komponenter, der ikke er inkluderet i dette panel, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogle af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette panel, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette panel og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af panelet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og sagsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med panelet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com.

Varemærker: 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 dets datterselskaber); Altoids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Registrerede navne, varemærker osv., der bruges i dette dokument, er beskyttet af den relevante lovgivning, også når de ikke er specifikt markeret som sådan.

01/2022 R4 HB-2850-004 © 2021 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Websted www.qiagen.com