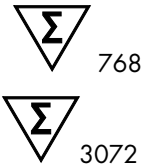


September 2021

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



Versie 1



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik in Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-,
ABI[®] 7500 Fast Dx-, QuantStudio[®] 5 Dx-, cobas[®] z 480- of
CFX96[™] Dx-instrumenten



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DUITSLAND

R3

Inhoud

Beoogd gebruik.....	4
Beschrijving en principe	5
Informatie met betrekking tot het pathogeen.....	5
Samenvatting en uitleg	6
Meegeleverde materialen	9
Inhoud van de kit.....	9
Componenten van de kit	10
Platformen en software.....	11
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	12
Verbruiksartikelen en apparatuur.....	12
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	14
Veiligheidsinformatie	14
Voorzorgsmaatregelen.....	15
Opslag en verwerking van reagentia	16
Transporteren, bewaren en hanteren van specimen	16
Protocol: monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in de RGQ MDx 5plex HRM.....	18
Protocol: monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in ABI 7500 Fast Dx.....	23
Protocol: Monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in de CFX96 Dx.....	29
Protocol: Monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in de cobas z 480	34
Protocol: monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in QuantStudio 5 Dx.....	39
Resultaten	45

Analyse in RGQ MDx 5plex HRM	45
Analyse in ABI 7500 Fast Dx	47
Analyse in CFX96 Dx.....	48
Analyse in cobas z 480	50
Analyse in QuantStudio 5 Dx.....	51
Interpretatie van de resultaten	53
Beperkingen.....	55
Prestaties	56
Analytische gevoeligheid (detectielimiet)	56
Onderzoeken naar analytische specificiteit (Inclusiviteit en exclusiviteit/kruisreactiviteit).....	57
Precisie	68
Klinische prestaties	69
Referenties	74
Probleemoplossingsgids.....	75
Symbolen	77
Contactgegevens	79
Bestelgegevens.....	80
Revisiegeschiedenis van document.....	81

Beoogd gebruik

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

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

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

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

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is bestemd voor gebruik met het Rotor-Gene Q MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 of CFX96 Dx als real-time PCR-systemen.

Beschrijving en principe

Informatie met betrekking tot het pathogeen

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

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

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

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

Samenvatting en uitleg

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is een gebruiksklaar systeem met een eenvoudige stap van monsterbereiding, gevolgd door de detectie van RNA van SARS-CoV-2 met behulp van real-time RT-PCR in het RGQ MDx-systeem, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 of QuantStudio 5 Dx (afbeelding 1).

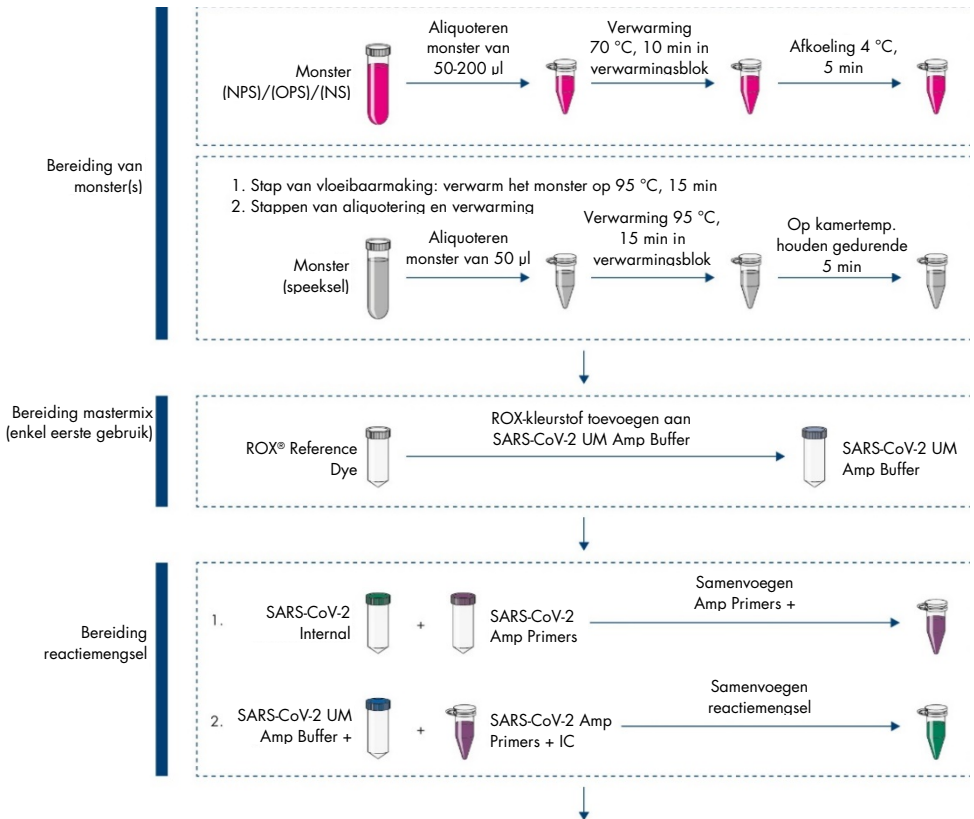
De SARS-CoV-2 UM Amp Buffer bevat reagentia en enzymen voor de specifieke amplificatie van een gebied met 72 basenparen (bp) en een gebied met 67 basenparen (bp) van het RNA-genoom van SARS-CoV-2 en voor hun rechtstreekse detectie in het fluorescentiekanaal 'Green' van de RGQ MDx-instrumenten en in het fluorescentiekanaal 'FAM' van de ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 of QuantStudio 5 Dx.

Het mengsel van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, bestaande uit primers en probes, bevat tevens de oligonucleotiden die nodig zijn voor de RNase P-amplificaties. Bij detectie in het fluorescentiekanaal 'Yellow' van het RGQ MDx-instrument, in de VIC/HEX van ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 of QuantStudio 5 Dx, zorgen deze amplificaties ervoor dat voldoende biologisch monster is verzameld. Deze controle is cruciaal om de aanwezigheid van biologische monsters in SARS-CoV-2-negatieve monsters te waarborgen. Een amplificatie moet altijd detecteerbaar zijn; anders bestaat er twijfel over de kwaliteit van het monster.

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit bevat ook een derde heteroloog amplificatiesysteem om mogelijke real-time RT-PCR-remming aan het licht te brengen. Dit wordt gedetecteerd als een interne RNA-controle (Internal Control, IC) in het fluorescentiekanaal 'Red' van de RGQ MDx-instrumenten of in de Cy5/ATTO647N van ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 of QuantStudio 5 Dx. Omdat de IC is opgenomen in de SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, moet de amplificatie constant zijn tenzij een real-time RT-PCR-remmer aanwezig is in het monster of in de PCR-reactie, hetgeen de amplificatie vertraagt of voorkomt.

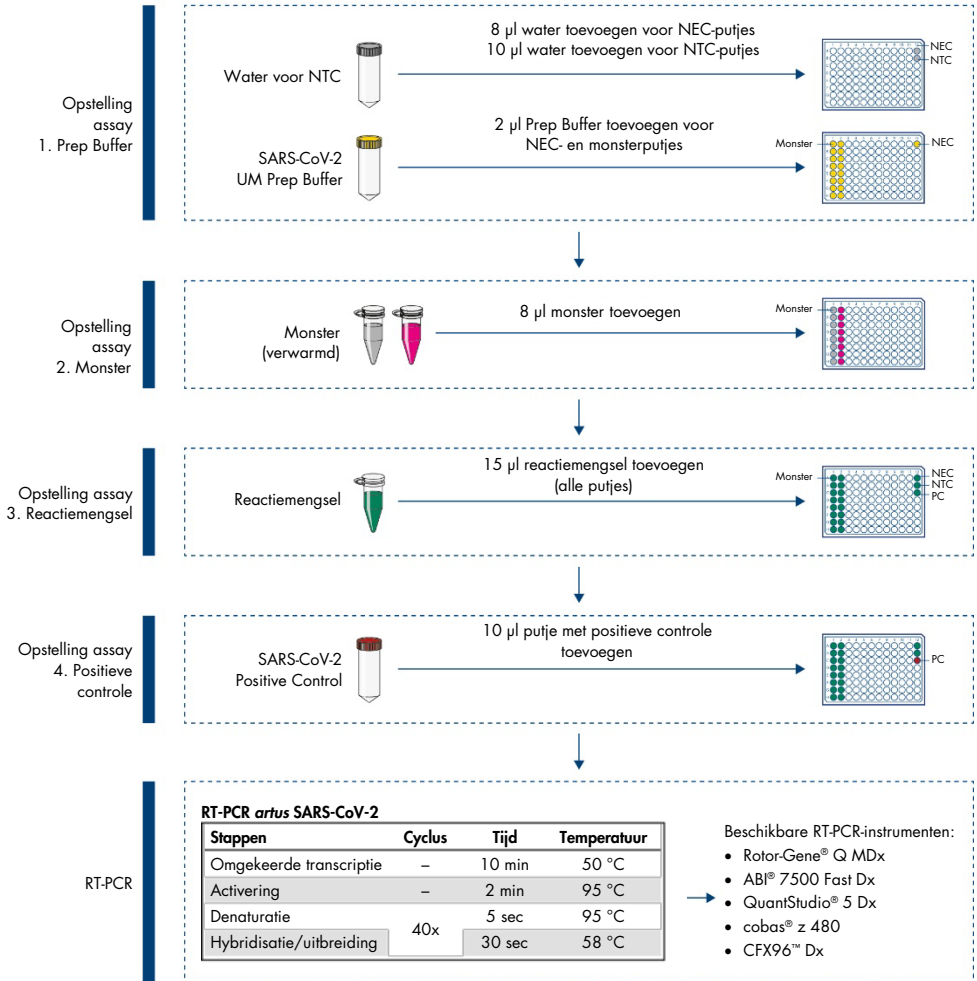
Externe positieve en negatieve controles (SARS-CoV-2 Positive Control en nucleasevrij water dat wordt gebruikt als NTC, respectievelijk) zijn inbegrepen in de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit om de prestatie van de PCR-stap te bevestigen. Een controle zonder extractie (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer gebruikt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

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



(Vervolgd op de volgende pagina)

(vervolg van vorige pagina)



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

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

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

Componenten van de kit

Reagentia

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

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

Primers en probes

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

Controles en kalibrators

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

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

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

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

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

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

Platformen en software

Verzeker u er voor gebruik van dat de apparaten zijn onderhouden en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant. Deze kit kan worden gebruikt in vijf workflows, die de volgende real-time RT-PCR-instrumenten en hun software vereisen:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Rotor-Gene Q-software versie 2.3.1 of hoger
- ABI 7500 Fast Dx: SDS-software versie 1.4.1 of hoger
- CFX96 Dx met CFX Manager Dx Software versie 3.1.3090.1022 of hoger
- cobas z 480 met LightCycler® 480 SW UDF versie 2.0.0 of hoger
- QuantStudio 5 Dx met QuantStudio 5 Dx IVD Software versie 1.0.1 of hoger en QuantStudio 5 Dx TD-software versie 1.0.1 of hoger

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Verbruiksartikelen en apparatuur

Gemeenschappelijke verbruiksartikelen en apparatuur

- Tafelcentrifuge met rotor voor reageerbuisjes van 2 ml
- Pipetten (afstelbaar)
- Vortexmixer
- Verwarmingsblok
- Poedervrije wegwerphandschoenen
- Steriele en nucleasevrije pipetpunten met filters
- PCR-vrije buisjes van 1,5 ml of 2 ml
- Centrifuge voor plaat met 96 putjes

Verbruiksartikelen en apparatuur voor elk platform

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-apparaat

- PCR-buisjes van 0,1 ml voor gebruik met de Rotor-Gene Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, cat.nr. 981103).
- 72-Well Rotor (cat.nr. 9018903) en Locking Ring 72-Well Rotor (cat.nr. 9018904)

ABI 7500 Fast Dx-apparaat

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

CFX96 Dx-apparaat

- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, laag profiel, dunne wand, witte/doorschijnende rand (Bio-Rad Laboratories Inc., cat.nr. HSP9601)
- Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, zelfklevend, optisch (Bio-Rad Laboratories Inc., cat.nr. MSB1001).

cobas z 480-apparaat

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

QuantStudio 5 Dx-apparaat

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

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

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

Veiligheidsinformatie

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

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

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

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

Vorzorgsmaatregelen

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

Opslag en verwerking van reagentia

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

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

Transporteren, bewaren en hanteren van specimens

De *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is bestemd voor gebruik met nasofaryngeale, nasale en orofaryngeale uitstrijkjes en onverdunde speeksel-specimens. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk. De Amerikaanse Centra voor ziektebestrijding en -preventie (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) en de Engelse volksgezondheid (Public Health England, PHE) hebben richtlijnen verstrekt voor het verzamelen, behandelen en testen van klinische specimens. Raadpleeg deze richtlijnen of andere relevante referentieprotocollen van nationale laboratoria voor aanvullende informatie.

Verzamelen, transporteren en opslaan van nasofaryngeale, nasale en orofaryngeale uitstrijkjes

Raadpleeg de aanbevelingen van de leverancier voor het verzamelen, opslaan en transporteren van uitstrijkjes. Uitstrijkjes moeten volledig zijn ondergedompeld in transportmedia om de integriteit van specimens te garanderen. Nasofaryngeale uitstrijkjes blijven stabiel en kunnen worden bewaard op:

- 4 °C (2 tot 8 °C) gedurende 72 uur
- -70 °C gedurende 2 weken

Nasofaryngeale uitstrijkjes blijven stabiel tijdens 3 vries-dooicycli.

Verzamelen, transporteren en opslaan van onverdunde speekselmonsters

Onverdunde speekselmonsters moeten worden afgenomen in steriele houders zonder bewaarmiddelen, buffers of andere additieven.

Instructies voor het verzamelen van onverdund speeksel:

- Probeer niet te hoesten voordat het onverdunde speeksel wordt verzameld.
- U mag niet eten, drinken, roken of vaperen, kauwgom kauwen of uw tanden poetsen in de 30 minuten voordat het onverdunde speeksel wordt verzameld.
- Er mag geen tandheelkundige ingreep of onderzoek plaatsvinden 24 uur voordat het onverdunde speeksel wordt verzameld.

De onverdunde speekselmonsters blijven stabiel en kunnen worden bewaard op:

- Kamertemperatuur (18-26 °C) gedurende 72 uur
- 4 °C (2 tot 8 °C) gedurende 72 uur
- Een gecombineerde opslag op kamertemperatuur, dan 4 °C en dan -20 °C (-30 tot -15 °C) gedurende 12 dagen
- -20 °C (-30 tot -15 °C) gedurende 1 maand

Onverdunde speekselmonsters blijven stabiel tijdens 3 vries-dooicycli.

Indien de monsters in andere omstandigheden worden opgeslagen dan hier beschreven, moeten deze omstandigheden worden gevalideerd.

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

Dit protocol beschrijft de bereiding van monsters en real-time RT-PCR voor detectie van SARS-CoV-2-doelwitten in menselijke nasale, nasofaryngeale of orofaryngeale uitstrijkjes die zijn bewaard in transportmedia en in onverdunde speekselmonsters met behulp van het RGQ MDx 5plex HRM real-time RT-PCR-instrument gekoppeld aan de Rotor-Gene Q-software versie 2.3.1.49 (of hoger).

Wat u moet weten voor u begint

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

Wat u moet doen voor u begint

- Monsters uit de luchtwegen kunnen op kamertemperatuur (15-25 °C) worden bewaard tijdens de bereiding en de opstelling van de reactie; het wordt echter aanbevolen om ze op ijs of bij 4 °C in een koelrek te bewaren.
- Speekselmonsters kunnen op ijs of op 4 °C in een koelrek worden bewaard, maar het wordt aanbevolen om ze op kamertemperatuur (15-25 °C) te houden tijdens de voorbereidingsstappen en opstelling van de reactie.
- Laat de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, water voor NTC en SARS-CoV-2 Positive Control voor gebruik volledig ontdooien op kamertemperatuur. Houd de buisjes op kamertemperatuur en beschermd tegen licht tot het gebruik.

- Homogeniseer de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer voorafgaand aan gebruik door ze 2-3 maal om te keren (niet vortexen) en daarna even snel te draaien. Alle andere individuele reagentia kunnen gehomogeniseerd worden door middel van puls-vortexen gedurende 3-5 seconden of door ze 2-3 maal om te keren en daarna even snel te draaien.
- De SARS-CoV-2 UM Prep Buffer remt RNasen in de klinische monsters voor de detectiestap, maar is geen oplossing die virussen inactieveert. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.
- Verifieer dat de cyclusvoorwaarden van het real-time RT-PCR-platform overeenkomen met de specificaties in dit protocol.
- Reagentia kunnen in aliquots worden verdeeld om opeenvolgende vries-dooicycli te vermijden.
- Bereid het verse reactiemengsel (<2 u voor de start van de RT-PCR-plaat).
- Om de verontreiniging te beperken, moeten de bereidingen van het monster en de RT-PCR in gescheiden zones plaatsvinden.

Procedure

Monsterbereiding: Voor specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes) volgt u stap 1. Voor speeksel-specimens gaat u naar stap 2.

1. Specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes):
 - 1a. Vortex het uitstrijkje met het monster krachtig.
 - 1b. Aliquoteer 50-200 µl van het monster in PCR-vrije buisjes van 1,5 ml.
 - 1c. Verwarm op 70 °C gedurende 10 minuten in een verwarmingsblok. Koel de monsters af op ijs gedurende minstens 5 minuten, bewaar ze dan op ijs of bij 4 °C.
2. Speekselmonsters:
 - 2a. Vloeibaarmaking (om vlot te kunnen pipetteren): verwarm het speekselmonster op 95 °C gedurende 15 min (onbepaald volume, houder of verwarmingstoestel).
 - 2b. Homogeniseer het mengsel door de pipet voorzichtig 8-10 maal op en neer te bewegen.

- 2c. Aliquoteer 50 µl van het monster in een PCR-vrij buisje van 1,5 ml.
- 2d. Voer de verwarmingsstap op 95 °C gedurende 15 min uit in een verwarmingsblok, bewaar het monster dan minstens 5 min op kamertemperatuur tot u het in het PCR-putje of -buisje laadt.
3. Vul de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer na het eerste gebruik aan met de ROX Reference Dye.
 - 3a. Voeg 32,8 µl van de ROX-kleurstof toe aan 1 buis SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Sluit het deksel met de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en de ROX-kleurstof, en draai de buis 3 maal om.
 - 3c. Draai de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer met ROX-kleurstof af op de bodem van de buis.
4. Voor een volledige RGQ MDx-plaat (72 putjes) bereidt u een aliquotmengsel van de SARS-CoV-2 Amp Primers met de SARS-CoV-2 Internal Control voor.
 - 4a. Breng de vereiste volumes SARS-CoV-2 Amp Primers en SARS-CoV-2 Internal Control volgens tabel 1 over naar een nieuwe PCR-vrije buis van 1,5 ml.
 - 4b. Sluit het deksel en keer de buis 3 maal om, of pulse-vortex de buis gedurende 3-5 s.
 - 4c. Draai de SARS-CoV-2 Amp Primers met IC af op de bodem van de buis.

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

Mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Aantal reacties volume (µl)	
Reagentia	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	72 rxns (+20% extra volume*)
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
Totaal mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	756

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

5. Bereid een reactiemengsel volgens tabel 2 en meng grondig door de buis 3 maal om te keren.

Tabel 2. Opstelling van reactiemengsel

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

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

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

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

11. Laad 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control in de betreffende PCR-buis. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
12. Stel het RT-PCR-programma van de RGQ MDx 5plex HRM in volgens de specificaties in tabel 3.

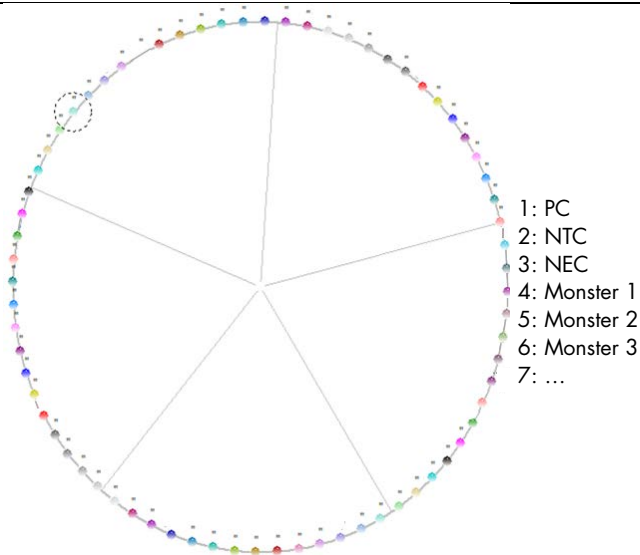
Opmerking: de gegevensregistratie moet plaatsvinden tijdens de stap van hybridisatie/uitbreiding.

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

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

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

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



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

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

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

Tabel 4. Configuratie RGQ MDx 5plex HRM

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

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

16. Selecteer 'Perform optimization before the first acquisition' (Optimalisatie uitvoeren voor eerste acquisitie).

17. Start de run.

18. Analyseer de resultaten op het einde van de run (zie paragraaf Resultaten).

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

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

Wat u moet weten voor u begint

- Verifieer dat de uiterste gebruiksdatums en opslagvoorwaarden die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld, worden nageleefd. Gebruik geen componenten na de uiterste gebruiksdatum of die op de verkeerde manier zijn bewaard.

- Gebruik goed onderhouden en gekalibreerde apparatuur.
- Let erop dat u verontreiniging met RNasen tijdens het experiment vermijdt en gebruik nucleasevrije kunststof artikelen.
- Bij gebruik van ABI 7500 Fast Dx moet ROX-kleurstof worden toegevoegd aan de buis met mastermix voor het eerste gebruik.

Wat u moet doen voor u begint

- Monsters uit de luchtwegen kunnen op kamertemperatuur (15-25 °C) worden bewaard tijdens de bereiding en de opstelling van de reactie; het wordt echter aanbevolen om ze op ijs of bij 4 °C in een koelrek te bewaren.
- Speekselmonsters kunnen op ijs of op 4 °C in een koelrek worden bewaard, maar het wordt aanbevolen om ze op kamertemperatuur (15-25 °C) te houden tijdens de voorbereidingsstappen en opstelling van de reactie.
- De ROX-kleurstof is nodig bij gebruik van de ABI 7500 Fast Dx.
- De acquisitie van gegevens moet plaatsvinden met instelling van passieve ROX-kleurstof.
- Laat de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, water voor NTC en SARS-CoV-2 Positive Control voor gebruik volledig ontdooien op kamertemperatuur. Houd de buisjes op kamertemperatuur en beschermd tegen licht tot het gebruik.
- Homogeniseer de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer voorafgaand aan gebruik door ze 2-3 maal om te keren (niet vortexen) en daarna even snel te draaien. Alle andere individuele reagentia kunnen gehomogeniseerd worden door middel van puls-vortexen gedurende 3-5 seconden of door ze 2-3 maal om te keren en daarna even snel te draaien.
- De SARS-CoV-2 UM Prep Buffer remt RNasen in de klinische monsters voor de detectiestap, maar is geen oplossing die virussen inactieveert. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.
- Verifieer dat de cyclusvoorwaarden van het real-time RT-PCR-platform overeenkomen met de specificaties in dit protocol.

- Reagentia kunnen in aliquots worden verdeeld om opeenvolgende vries-dooicycli te vermijden.
- Bereid het verse reactiemengsel (<2 u voor de start van de RT-PCR-plaat).
- Om de verontreiniging te beperken, moeten de bereidingen van het monster en de RT-PCR in gescheiden zones plaatsvinden.

Procedure

Monsterbereiding: Voor specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes) volgt u stap 1. Voor speekselmonsters gaat u naar stap 2.

1. Specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes):
 - 1a. Vortex het uitstrijkje met het monster krachtig.
 - 1b. Aliquoteer 50-200 µl van het monster in PCR-vrije buisjes van 1,5 ml.
 - 1c. Verwarm op 70 °C gedurende 10 minuten in een verwarmingsblok.
 - 1d. Koel de monsters af op ijs gedurende minstens 5 minuten, bewaar ze dan op ijs of bij 4 °C.
2. Speekselmonsters:
 - 2a. Vloeibaarmaking (om vlot te kunnen pipetteren): verwarm het speekselmonster op 95 °C gedurende 15 min (onbepaald volume, houder of verwarmingstoestel).
 - 2b. Homogeniseer het mengsel door de pipet voorzichtig 8-10 maal op en neer te bewegen.
 - 2c. Aliquoteer 50 µl van het monster in een PCR-vrij buisje van 1,5 ml.
 - 2d. Voer de verwarmingsstap op 95 °C gedurende 15 min uit in een verwarmingsblok, bewaar het monster dan minstens 5 min op kamertemperatuur tot u het in het PCR-putje of -buisje laadt.
3. Vul de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer na het eerste gebruik aan met de ROX Reference Dye.
 - 3a. Voeg 32,8 µl van de ROX-kleurstof toe aan een buis SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Sluit het deksel met de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en de ROX-kleurstof, en draai de buis 3 maal om.
 - 3c. Draai de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer met ROX-kleurstof af op de bodem van de buis.

4. Voor een volledige ABI 7500 Fast Dx-plaat (96 putjes) bereidt u een aliquotmengsel van de SARS-CoV-2 Amp Primers met de SARS-CoV-2 Internal Control voor.
 - 4a. Breng het vereiste volume SARS-CoV-2 Amp Primers en SARS-CoV-2 Internal Control volgens tabel 5 over naar een nieuwe PCR-vrije buis van 1,5 ml.
 - 4b. Sluit het deksel en keer de buis 3 maal om, of pulse-vortex de buis gedurende 3-5 s.
 - 4c. Draai de SARS-CoV-2 Amp Primers met IC af om de oplossing naar de bodem van de buis te brengen.

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

Mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Aantal reacties volume (µl)	
Reagentia	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	96 rxns (+ 20% extra volume*)
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
Totaal mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

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

5. Bereid een reactiemengsel volgens tabel 6 en meng grondig door de buis 3 maal om te keren.

Tabel 6. Opstelling van reactiemengsel

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

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

6. Breng 8 µl nucleasevrij water over naar het putje dat is toegewezen aan de NEC.
7. Laad 10 µl nucleasevrij water in het putje dat is toegewezen aan de NTC.

8. Verdeel 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer over elke putje dat is toegewezen aan de NEC en aan de bereide monsters.
9. Voeg 8 µl van het bereide monster toe aan een putje dat SARS-CoV-2 UM Prep Buffer bevat. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
10. Voeg 15 µl van het reactiemengsel bereid in stap 5 toe aan de putjes voor monsters en controles (zie voorbeeld in afbeelding 3). Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
11. Laad 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control in het betreffende putje. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
12. Sluit de PCR-plaat af om kruisbesmetting te voorkomen. Oefen gelijkmatig druk uit over de volledige plaat om een hechte afsluiting over individuele putjes te krijgen.
13. Centrifugeer kort de PCR-plaat om vloeistof op de bodem van het putje te verzamelen.
14. Stel het real-time RT-PCR-programma van de 'Standard 7500' Run Mode van de ABI 7500 Fast Dx in volgens tabel 7.

Opmerking: Na het klikken op **file** (bestand) en **new** (nieuw) controleert u of de assay **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standaardcurve (Absolute kwantificering)) is en of Run Mode is ingesteld op **Standard 7500** (Standaard 7500). Selecteer de FAM, VIC en Cy5 als reporters met Quencher ingesteld op **None** (Geen); de acquisitie van gegevens moet plaatsvinden met de **ROX** als **passieve referentie**.

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

Opmerking: raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing ABI 7500 Fast Dx* voor meer informatie.

15. Zet de plaat in de real-time cycler (een voorbeeld voor indeling van de PCR-plaat wordt weergegeven in afbeelding 3) en start het cyclusprogramma zoals beschreven in tabel 7.
16. Selecteer de gebruikte putjes en pas de FAM-, VIC- en Cy5-reporters toe. De acquisitie van gegevens moet plaatsvinden met passieve ROX-kleurstof op **ON** (AAN).
17. Verifieer dat de Standard Curve (Standaardcurve) van de ABI 7500 Fast Dx is geconfigureerd als Absolute Quantitation (Absolute kwantificering).
18. Start de run.

19. Analyseer de resultaten op het einde van de run (zie paragraaf Resultaten).

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

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

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

Afbeelding 3. Voorbeeld van plaatindeling in ABI 7500 Fast Dx

Protocol: Monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in de CFX96 Dx

Dit protocol is bestemd voor het bereiden en detecteren van SARS-CoV-2-doelwitten in menselijke nasale, nasofaryngeale of orofaryngeale uitstrijkjes die zijn bewaard in transportmedia en in onverdunde speekselmonsters met behulp van de CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., cat.nr. 1845097-IVD (optische reactiemodule) en 1841000-IVD (thermocyclermodule) met CFX Manager Dx Software versie 3.1.309001022 of hoger.

Wat u moet weten voor u begint

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

Wat u moet doen voor u begint

- Monsters uit de luchtwegen kunnen op kamertemperatuur (15-25 °C) worden bewaard tijdens de bereiding en de opstelling van de reactie; het wordt echter aanbevolen om ze op ijs of bij 4 °C in een koelrek te bewaren.
- Speekselmonsters kunnen op ijs of op 4 °C in een koelrek worden bewaard, maar het wordt aanbevolen om ze op kamertemperatuur (15-25 °C) te houden tijdens de voorbereidingsstappen en opstelling van de reactie.
- Laat de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, water voor NTC en SARS-CoV-2 Positive Control voor gebruik volledig ontdooien op kamertemperatuur. Houd de buisjes op kamertemperatuur en beschermd tegen licht tot het gebruik.

- Homogeniseer de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer voorafgaand aan gebruik door ze 2-3 maal om te keren (niet vortexen) en daarna even snel te draaien. Alle andere individuele reagentia kunnen gehomogeniseerd worden door middel van puls-vortexen gedurende 3-5 seconden of door ze 2-3 maal om te keren en daarna even snel te draaien.
- De SARS-CoV-2 UM Prep Buffer remt RNasen in de klinische monsters voor de detectiestap, maar is geen oplossing die virussen inactieveert. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.
- Verifieer dat de cyclusvoorwaarden van het real-time RT-PCR-platform overeenkomen met de specificaties in dit protocol.
- Reagentia kunnen in aliquots worden verdeeld om opeenvolgende vries-dooicycli te vermijden.
- Bereid het verse reactiemengsel (< 2 u voor de start van de PCR-plaat).
- Om de verontreiniging te beperken, moeten de bereidingen van het monster en de real-time RT-PCR in gescheiden zones plaatsvinden.

Procedure:

Monsterbereiding: Voor specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes) volgt u stap 1. Voor speeksel-specimens gaat u naar stap 2.

1. Specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes):
 - 1a. Vortex het uitstrijkje met het monster krachtig.
 - 1b. Aliquoteer 50-200 μ l van het monster in PCR-vrije buisjes van 1,5 ml.
 - 1c. Verwarm op 70 °C gedurende 10 minuten in een verwarmingsblok.
 - 1d. Koel de monsters af op ijs gedurende minstens 5 minuten, bewaar ze dan op ijs of bij 4 °C.
2. Speekselmonsters:
 - 2a. Vloeibaarmaking (om vlot te kunnen pipetteren): verwarm het speekselmonster op 95 °C gedurende 15 min (onbepaald volume, houder of verwarmingstoestel).

- 2b. Homogeniseer het mengsel door de pipet voorzichtig 8-10 maal op en neer te bewegen.
- 2c. Aliquoteer 50 µl van het monster in een PCR-vrij buisje van 1,5 ml.
- 2d. Verwarm op 95 °C gedurende 15 minuten in een verwarmingsblok. Bewaar het monster dan minstens 5 minuten op kamertemperatuur voordat u het in het PCR-potje of -buisje laadt.
3. Vul de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer na het eerste gebruik aan met de ROX Reference Dye.
 - 3a. Voeg 32,8 µl van de ROX-kleurstof toe aan 1 buis SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Sluit het deksel met de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en de ROX-kleurstof, en draai de buis 3 maal om.
 - 3c. Draai de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer met ROX-kleurstof af op de bodem van de buis.
4. Voor een volledige CFX96 Dx-plaat (96 potjes), bereidt u een aliquotmengsel van de SARS-CoV-2 Amp Primers met de SARS-CoV-2 Internal Control voor.
 - 4a. Breng het vereiste volume SARS-CoV-2 Amp Primers en SARS-CoV-2 Internal Control volgens tabel 8 over naar een nieuwe PCR-vrije buis van 1,5 ml.
 - 4b. Sluit het deksel en keer de buis 3 maal om, of pulse-vortex de buis gedurende 3-5 s.
 - 4c. Draai de SARS-CoV-2 Amp Primers met IC af om de oplossing naar de bodem van de buis te brengen.

Tabel 8. Opstelling mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Reagentia	Mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Aantal reacties volume (µl)	
	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	96 rxns (+ 20% extra volume*)	
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	
Totaal mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008	

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

5. Bereid een reactiemengsel volgens tabel 9 en meng grondig door de buis 3 maal om te keren.

Tabel 9. Opstelling van reactiemengsel

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

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

6. Breng 8 µl nucleasevrij water over naar het putje dat is toegewezen aan de NEC.
7. Laad 10 µl nucleasevrij water in het putje dat is toegewezen aan de NTC.
8. Verdeel 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer over elke putje dat is toegewezen aan de NEC en aan de bereide monsters.
9. Voeg 8 µl van het bereide monster toe aan een putje dat SARS-CoV-2 UM Prep Buffer bevat. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
10. Voeg 15 µl van het reactiemengsel bereid in stap 5 toe aan de putjes voor monsters en controles (afbeelding 4 dient als voorbeeld). Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
11. Laad 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control in het betreffende putje. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
12. Sluit de PCR-plaat af om kruisbesmetting te voorkomen. Oefen gelijkmatig druk uit over de volledige plaat om een hechte afsluiting over individuele putjes te krijgen.
13. Centrifugeer kort de PCR-plaat om vloeistof op de bodem van het putje te verzamelen.
14. In de **CFX Manager Dx Software > Startup Wizard** (Opstartassistent) selecteert u onder **run type** (runtype) de optie **user defined** (door gebruiker gedefinieerd).
15. Tabblad **Protocol**: stel het real-time RT-PCR-programma in volgens tabel 10 voor 25 µl reactievolume.

Opmerking: in het venster **Protocol Editor** (Protocoleditor) klikt u op de knop **Step Options** (Stapopties) om de verwarmingssnelheid op 1,6 °C/sec te zetten in elk van de 4 stappen van het RT-PCR-programma.

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

Opmerking: raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing CFX96 Dx* voor meer informatie.

16. Tabblad **Plate** (Plaat): selecteer de gebruikte putjes en pas de FAM-, HEX- en Cy5-reporters toe.
17. Zet de plaat in de real-time cycler (een voorbeeld voor indeling van de PCR-plaat wordt weergegeven in afbeelding 4).
18. Tabblad **Start Run** (Run starten): klik om de run te starten.
19. Analyseer de resultaten op het einde van de run (zie paragraaf Resultaten).

Tabel 10. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-programma voor de CFX96 Dx

Stappen	Tijd	Temperatuur (°C)	Verwarmingssnelheid (°C/sec)	Aantal herhalingen	Acquisitie
1. Omgekeerde transcriptie	10 min	50	1,6	1	Nee
2. Initiële warmte-activering PCR	2 min	95	1,6	1	Nee
2-stapscyclus				39*	
Denaturatie	5 s	95	1,6	1	Nee
hybridisatie/uitbreiding	30 s	58	1,6	1	FAM, HEX en Cy5

*De CFX werkt met herhaling. Om 40 cycli uit te voeren met het programma, moeten 39 herhalingen worden ingesteld voor de cyclus in twee stappen (zoals stap 5 'GOTO' in de software).

	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												

Afbeelding 4. Voorbeeld van plaatindeling in CFX96 Dx

Protocol: Monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in de cobas z 480

Dit protocol beschrijft de bereiding van monsters en real-time RT-PCR voor detectie van SARS-CoV-2-doelwitten in menselijke nasale, nasofaryngeale of orofaryngeale uitstrijkjes die zijn bewaard in transportmedia en in onverdunde speekselmonsters met behulp van de cobas z 480 met LightCycler 480 SW UDF versie 2.0.0 (of hoger).

Wat u moet weten voor u begint.

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

Wat u moet doen voor u begint.

- Monsters uit de luchtwegen kunnen op kamertemperatuur worden bewaard tijdens de bereiding en de opstelling van de reactie; het wordt echter aanbevolen om ze op ijs of bij 4 °C in een koelrek te bewaren.
- Speekselmonsters kunnen op ijs of op 4 °C in een koelrek worden bewaard, maar het wordt aanbevolen om ze op kamertemperatuur (15-25 °C) te houden tijdens de voorbereidingsstappen en opstelling van de reactie.
- Laat de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, water voor NTC en SARS-CoV-2 Positive Control voor gebruik volledig ontdooien op kamertemperatuur (15-25 °C). Houd de buisjes op kamertemperatuur en beschermd tegen licht tot het gebruik.

- Homogeniseer de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer voorafgaand aan gebruik door ze 2-3 maal om te keren (niet vortexen) en daarna even snel te draaien. Alle andere individuele reagentia kunnen gehomogeniseerd worden door middel van puls-vortexen gedurende 3-5 seconden of door ze 2-3 maal om te keren en daarna even snel te draaien.
- De SARS-CoV-2 UM Prep Buffer remt RNasen in de klinische monsters voor de detectiestap, maar is geen oplossing die virussen inactieveert. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.
- Verifieer dat de cyclusvoorwaarden van het real-time RT-PCR-platform overeenkomen met de specificaties in dit protocol.
- Reagentia kunnen in aliquots worden verdeeld om opeenvolgende vries-dooicycli te vermijden.
- Bereid het verse reactiemengsel (< 2 u voor de start van de real-time RT-PCR-plaat).
- Om de verontreiniging te beperken, moeten de bereidingen van het monster en de real-time RT-PCR in gescheiden zones plaatsvinden.

Procedure:

Monsterbereiding: Voor specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes) volgt u stap 1. Voor speekselspecimens gaat u naar stap 2.

1. Specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes):
 - 1a. Vortex het uitstrijkje met het monster krachtig.
 - 1b. Aliquoteer 50-200 µl van het monster in PCR-vrije buisjes van 1,5 ml.
 - 1c. Verwarm op 70 °C gedurende 10 minuten in een verwarmingsblok.
 - 1d. Koel de monsters af op ijs gedurende minstens 5 minuten, bewaar ze dan op ijs of bij 4 °C.
2. Speekselmonsters:
 - 2a. Vloeibaarmaking (om vlot te kunnen pipetteren): verwarm het speekselmonster op 95 °C gedurende 15 min (onbepaald volume, houder of verwarmingstoestel).

- 2b. Homogeniseer het mengsel door de pipet voorzichtig 8-10 maal op en neer te bewegen.
- 2c. Aliquoteer 50 µl van het monster in een PCR-vrij buisje van 1,5 ml.
- 2d. Voer de verwarmingsstap op 95 °C gedurende 15 min uit in een verwarmingsblok, bewaar het monster dan minstens 5 min op kamertemperatuur tot u het in het PCR-putje of -buisje laadt.
3. Vul de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer na het eerste gebruik aan met de ROX Reference Dye.
 - 3a. Voeg 32,8 µl van de ROX-kleurstof toe aan 1 buis SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Sluit het deksel met de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en de ROX-kleurstof, en draai de buis 3 maal om.
 - 3c. Draai de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer met ROX-kleurstof af op de bodem van de buis.
4. Voor een volledige cobas z 480-plaat (96 putjes), bereidt u een aliquotmengsel van de SARS-CoV-2 Amp Primers met de SARS-CoV-2 Internal Control voor.
 - 4a. Breng het vereiste volume SARS-CoV-2 Amp Primers en SARS-CoV-2 Internal Control volgens tabel 11 over naar een nieuwe PCR-vrije buis van 1,5 ml.
 - 4b. Sluit het deksel en keer de buis 3 maal om, of pulse-vortex de buis gedurende 3-5 s.
 - 4c. Draai de SARS-CoV-2 Amp Primers met IC af om de oplossing naar de bodem van de buis te brengen.

Tabel 11. Opstelling mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Aantal reacties volume (µl)	
Reagentia	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	96 rxns (+ 20% extra volume*)	
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	
Totaal mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008	

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

5. Bereid een reactiemengsel volgens tabel 12 en meng grondig door de buis 3 maal om te keren.

Tabel 12. Opstelling van reactiemengsel

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

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

- Breng 8 µl nucleasevrij water over naar het putje dat is toegewezen aan de NEC.
- Laad 10 µl nucleasevrij water in het putje dat is toegewezen aan de NTC.
- Verdeel 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer over elke putje dat is toegewezen aan de NEC en aan de bereide monsters.
- Voeg 8 µl van het bereide monster toe aan een putje dat SARS-CoV-2 UM Prep Buffer bevat. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
- Voeg 15 µl van het reactiemengsel bereid in stap 5 toe aan de putjes voor monsters en controles (afbeelding 5 dient als voorbeeld). Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
- Laad 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control in het betreffende putje. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
- Sluit de PCR-plaat af om kruisbesmetting te voorkomen. Oefen gelijkmatig druk uit over de volledige plaat om een hechte afsluiting over individuele putjes te krijgen.
- Centrifugeer kort de PCR-plaat om vloeistof op de bodem van het putje te verzamelen.
- Eerste gebruik:** In de Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0-software klikt u op **open tools** (hulpmiddelen openen) en dan selecteert u **detection formats** (detectievormen) om de volgende combinaties van excitatie en emissie in te stellen: 465-510 (FAM), 540-580 (HEX) en 610-670 (ATTO647N).
- stel het real-time RT-PCR-programma in volgens tabel 13 voor 25 µl reactievolume.

Opmerking: aan de bovenzijde van de pagina selecteert u **detection format** (detectievorm) om de detectievorm gecreëerd in stap 14 te kiezen.

Opmerking: gebruik een aangepaste verwarmingsnelheid van 1,6 °C/sec in elk van de 5 stappen van het real-time RT-PCR-programma.

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

Opmerking: raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing cobas z 480* voor meer informatie.

16. Zet de plaat in de real-time cycler (een voorbeeld voor indeling van de PCR-plaat wordt weergegeven in afbeelding 5).
17. Start de run.
18. Analyseer de resultaten op het einde van de run (zie paragraaf Results).

Tabel 13. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-programma voor de cobas z 480

Stappen	Tijd	Temperatuur (°C)	Verwarmingsnelheid (°C/sec)	Aantal cycli	Analysemodus
Omgekeerde transcriptie	10 min	50	1,6	1	Geen
Initiële warmte-activering PCR	2 min	95	1,6	1	Geen
2-stapscyclus				40	Kwantificering
Denaturatie	5 s	95	1,6		Geen
Hybridisatie/uitbreiding	30 s	58	1,6		Enkel
Afkoeling	1 min	37	1,6	1	Geen

	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												

Afbeelding 5. Voorbeeld van plaatindeling in cobas z 480

Protocol: monsterbereiding en detectie van SARS-CoV-2 in QuantStudio 5 Dx

Dit protocol is bestemd voor het bereiden en detecteren van SARS-CoV-2 in menselijke nasale, nasofaryngeale of orofaryngeale uitstrijkjes die zijn bewaard in transportmedia en in onverdunde speekselmonsters met behulp van het QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR-instrument.

Wat u moet weten voor u begint.

- Verifieer dat de uiterste gebruiksdatums en opslagvoorwaarden die op de verpakking en etiketten van alle componenten staan vermeld, worden nageleefd. Gebruik geen componenten na de uiterste gebruiksdatum of die op de verkeerde manier zijn bewaard.
- Gebruik goed onderhouden en gekalibreerde apparatuur.
- Let erop dat u verontreiniging met RNAsen tijdens het experiment vermijdt en gebruik nucleasevrije kunststof artikelen.
- Bij gebruik van QuantStudio 5 Dx moet ROX-kleurstof worden toegevoegd aan de buis met mastermix voor het eerste gebruik.

Wat u moet doen voor u begint

- Monsters uit de luchtwegen kunnen op kamertemperatuur worden bewaard tijdens de bereiding en de opstelling van de reactie; het wordt echter aanbevolen om ze op ijs of bij 4 °C in een koelrek te bewaren.
- Speekselmonsters kunnen op ijs of op 4 °C in een koelrek worden bewaard, maar het wordt aanbevolen om ze op kamertemperatuur (15-25 °C) te houden tijdens de voorbereidingsstappen en opstelling van de reactie.
- De ROX-kleurstof is nodig bij gebruik van de QuantStudio 5.
- Laat de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, water voor NTC en SARS-CoV-2 Positive Control voor gebruik volledig ontdooien op 15-25 °C. Houd de buisjes op kamertemperatuur en beschermd tegen licht tot het gebruik.

- Homogeniseer de SARS-CoV-2 UM Prep Buffer en de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer voorafgaand aan gebruik door ze 2-3 maal om te keren (niet vortexen) en daarna even snel te draaien. Alle andere individuele reagentia kunnen gehomogeniseerd worden door middel van puls-vortexen gedurende 3-5 seconden of door ze 2-3 maal om te keren en daarna even snel te draaien.
- De SARS-CoV-2 UM Prep Buffer remt RNasen in de klinische monsters voor de detectiestap, maar is geen oplossing die virussen inactieveert. Alle monsters moeten worden behandeld als mogelijk gevaarlijk.
- Verifieer dat de cyclusvoorwaarden van het real-time RT-PCR-platform overeenkomen met de specificaties in dit protocol.
- Reagentia kunnen in aliquots worden verdeeld om opeenvolgende vries-dooicycli te vermijden.
- Bereid het verse reactiemengsel (< 2 u voor de start van de real-time RT-PCR-plaat).
- Om de verontreiniging te beperken, moeten de bereidingen van het monster en de real-time RT-PCR in gescheiden zones plaatsvinden.

Procedure

Monsterbereiding: Voor specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes) volgt u stap 1. Voor speekselspecimens gaat u naar stap 2.

1. Specimens uit de luchtwegen (nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes):
 - 1a. Vortex het uitstrijkje met het monster krachtig.
 - 1b. Aliquoteer 50-200 µl van het monster in PCR-vrije buisjes van 1,5 ml.
 - 1c. Verwarm op 70 °C gedurende 10 minuten in een verwarmingsblok.
 - 1d. Koel de monsters af op ijs gedurende minstens 5 minuten, bewaar ze dan op ijs of bij 4 °C.
2. Speekselmonsters:
 - 2a. Vloeibaarmaking (om vlot te kunnen pipetteren): verwarm het speekselmonster op 95 °C gedurende 15 min (onbepaald volume, houder of verwarmingstoestel).
 - 2b. Homogeniseer het mengsel door de pipet voorzichtig 8-10 maal op en neer te bewegen.

- 2c. Aliquoteer 50 µl van het monster in een PCR-vrij buisje van 1,5 ml.
- 2d. Voer de verwarmingsstap op 95 °C gedurende 15 min uit in een verwarmingsblok, bewaar het monster dan minstens 5 min op kamertemperatuur tot u het in het PCR-putje of -buisje laadt.
3. Vul de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer na het eerste gebruik aan met de ROX Reference Dye.
 - 3a. Voeg 32,8 µl van de ROX-kleurstof toe aan een buis SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Sluit het deksel met de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer en de ROX-kleurstof, en draai de buis 3 maal om.
 - 3c. Draai de SARS-CoV-2 UM Amp Buffer met ROX-kleurstof af op de bodem van de buis.
4. Voor een volledige QuantStudio 5 Dx-plaat (96 putjes) bereidt u een aliquotmengsel van de SARS-CoV-2 Amp Primers met de SARS-CoV-2 Internal Control voor.
 - 4a. Breng het vereiste volume SARS-CoV-2 Amp Primers en SARS-CoV-2 Internal Control volgens tabel 14 over naar een nieuwe PCR-vrije buis van 1,5 ml.
 - 4b. Sluit het deksel en keer de buis 3 maal om, of pulse-vortex de buis gedurende 3-5 s.
 - 4c. Draai de SARS-CoV-2 Amp Primers met IC af om de oplossing naar de bodem van de buis te brengen.

Tabel 14. Opstelling mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Aantal reacties volume (µl)	
Reagentia	Voorraadconcentratie	Uiteindelijke concentratie	1 rxn	96 rxns (+ 20% extra volume*)	
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	
Totaal mengsel SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008	

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

5. Bereid een reactiemengsel volgens tabel 15 en meng grondig door de buis 3 maal om te keren.

Tabel 15. Opstelling van reactiemengsel

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

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

6. Breng 8 µl nucleasevrij water over naar het putje dat is toegewezen aan de NEC.
7. Laad 10 µl nucleasevrij water in het putje dat is toegewezen aan de NTC.
8. Verdeel 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer over elke putje dat is toegewezen aan de NEC en aan de bereide monsters.
9. Voeg 8 µl van het bereide monster toe aan een putje dat SARS-CoV-2 UM Prep Buffer bevat. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
10. Voeg 15 µl van het reactiemengsel bereid in stap 5 toe aan de putjes voor monsters en controles (afbeelding 6 dient als voorbeeld). Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
11. Laad 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control in het betreffende putje. Meng door de pipet 5 maal op en neer te bewegen.
12. Sluit de PCR-plaat af om kruisbesmetting te voorkomen. Oefen gelijkmatig druk uit over de volledige plaat om een hechte afsluiting over individuele putjes te krijgen.
13. Centrifugeer kort de PCR-plaat om vloeistof op de bodem van het putje te verzamelen.
14. **Eerste gebruik:** de template moet worden gegenereerd in de QuantStudio 5 Dx TD-software versie 1.0.1 of hoger en gepubliceerd voordat de run wordt gestart in de QuantStudio 5 Dx IVD-software. Stel de template overeenkomstig in:

Opmerking: in het tabblad **Properties** (Eigenschappen) stelt u **Experiment type** (Experimenttype) in op **Standard Curve** (Standaardcurve) en **Run mode** (Runmodus) op **Standard** (Standaard).

Opmerking: in het tabblad **Method** (Methode), stelt u het real-time RT-PCR-programma in voor een reactievolume van 25 µl (tabel 16).

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

Opmerking: in het tabblad **Plate** (Plaat) selecteert u **ROX** als **Passive Reference** (Passieve referentie) en stelt u FAM, VIC en Cy5 in als doelwitten zonder quencher (selecteer **None** (Geen)).

Opmerking: raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing QuantStudio 5 Dx* voor meer informatie.

15. In de QuantStudio 5 Dx IVD Software laadt u de template die u eerder heeft gecreëerd in stap 14. Selecteer de gebruikte putjes en pas de FAM-, VIC- en Cy5-doelwitten toe.
16. Zet de plaat in de real-time cycler (een voorbeeld voor indeling van de PCR-plaat wordt weergegeven in afbeelding 6).
17. Start de run.
18. Analyseer de resultaten op het einde van de run (zie paragraaf Results).

Tabel 16. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM-programma voor de QuantStudio 5 Dx

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

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

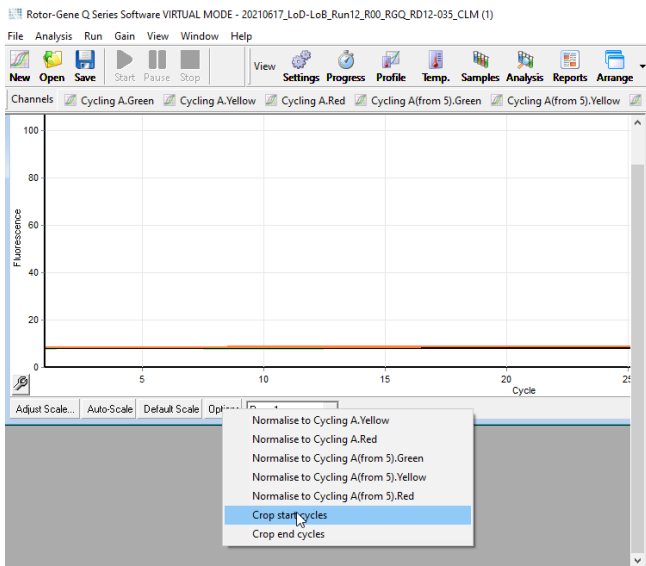
Afbeelding 6. Voorbeeld van plaatindeling in QuantStudio 5 Dx

Resultaten

Analyse in RGQ MDx 5plex HRM

In de RGQ MDx 5plex HRM worden de gegevens geanalyseerd met de Rotor-Gene Q-software versie 2.3.1 (of hoger) volgens de instructies van de fabrikant (gebruikershandleiding Rotor-Gene Q MDx, revisie 7, september 2018).

Voor gegevensanalyse moet 'cyclus uitsnijden' worden gebruikt (afbeelding 7): open het onbewerkte kanaal **Cycling A.Green**. Ga naar Options (Opties) > **Crop Start Cycles** (Startcycli uitsnijden) en voer **5** in het dialoogvenster in. Een nieuw kanaal zal worden gegenereerd met de naam Cycling A(from 5).Green. Hetzelfde moet worden gedaan voor onbewerkte kanalen Red en Yellow om kanalen **Cycling A(from 5).Red** en **Cycling A(from 5).Yellow** te genereren.



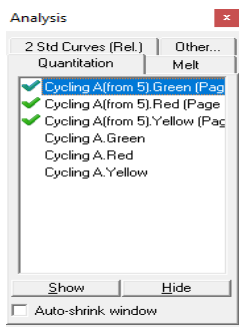
Afbeelding 7. Schermafbeelding van instelling van cycli uitsnijden voor de analyse van RGQ MDx 5plex HRM-runs

Open het analysemenu (Afbeelding 8), en voor elk gegenereerde kanaal Cycling A(from 5), past u de volgende analyseparameters toe om consistentie tussen verschillende analyses te behouden (tabel 17).

Tabel 17. Analyseparameters voor de RGQ MDx 5plex HRM

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

In de RGQ-software zijn resultaten van de verwerking beschikbaar in het rooster van kwantificeringsresultaten dat is geopend tijdens de analyse. Gegevens kunnen worden geëxporteerd als een bestand met door komma's gescheiden waarden (.csv): In het venster van de RGQ-software selecteert u **File** (Bestand) > **save as** (opslaan als) > **Excel analysis sheet** (Excel Analyse-blad). Zorg dat alle monsters zijn geselecteerd voordat u de resultaten exporteert (afbeelding 8).



Afbeelding 8. Schermopname van geselecteerde kanalen voor het toepassen van de analyseparameters en de export van resultaten (analyse van RGQ MDx 5plex HRM-runs).

Analyse in ABI 7500 Fast Dx

In de ABI 7500 Fast Dx worden de gegevens geanalyseerd met de 7500 Fast System-software versie 1.4.1 (of hoger) volgens de instructies van de fabrikant. In het tabblad **setup** (instelling) selecteert u de groep putjes of volledige plaat die beschikbaar is in de analyse, klik dan op de rechtermuisknop om de vensters van de putjescontroleur te openen. De 3 fluoroforen (FAM, VIC en Cy5) moeten worden geselecteerd en **ROX** moet worden gekozen als **Passive reference** (Passieve referentie). De volgende parameters zijn nodig voor consistentie tussen verschillende analyses (tabel 18).

Tabel 18. Analyseparameters voor de ABI 7500 Fast Dx

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

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

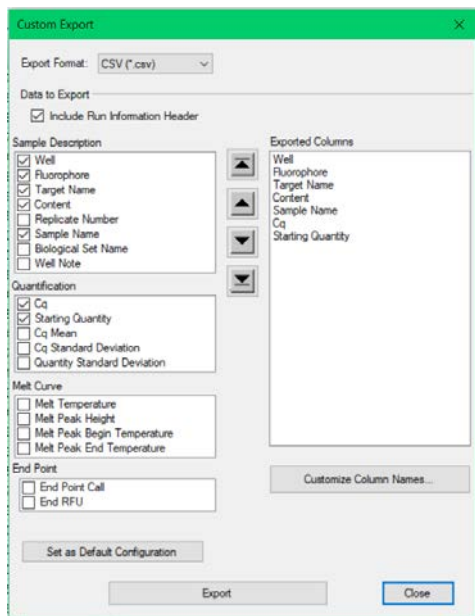
Analyse in CFX96 Dx

In de CFX96 Dx worden de gegevens geanalyseerd met CFX Manager Dx Software versie 3.1.3090.1022 (of hoger) volgens de instructies van de fabrikant. FAM, HEX en Cy5 moeten worden geselecteerd voor alle putjes die in het experiment worden gebruikt. De volgende parameters zijn nodig voor consistentie tussen verschillende analyses (tabel 19).

Tabel 19. Analyseparameters voor de CFX96 Dx

Kanalen	FAM	HEX	Cy5
Cq-bepalingsmodus:	Ja	Ja	Ja
Enkele drempel			
Basislijn-instelling:			
• afgetrokken fitting van curve	Ja	Ja	Ja
• Correctie van fluorescentiedrift toepassen	Ja	Ja	Ja
Drempel (RFU)	250	300	100
Grenscycli	Ct > 39,00 wordt beschouwd als 40,00	Ct > 35,00 wordt beschouwd als 40,00	Nee

In de CFX Manager Dx Software zijn Ct-waarden (**Cq** genoemd in de software) van een geselecteerde groep putjes of de volledige plaat beschikbaar in het gegevensblad van de sectie **Quantification Data** (Kwantificeringsgegevens). Gegevens kunnen worden geëxporteerd als een bestand met door komma's gescheiden waarden (**.csv**) door selectie van **Export** > **Custom Export** (Aangepaste export) en instelling van de parameters volgens afbeelding 9.



Afbeelding 9. Parameters van onbewerkt gegevensbestand voor CFX96 Dx

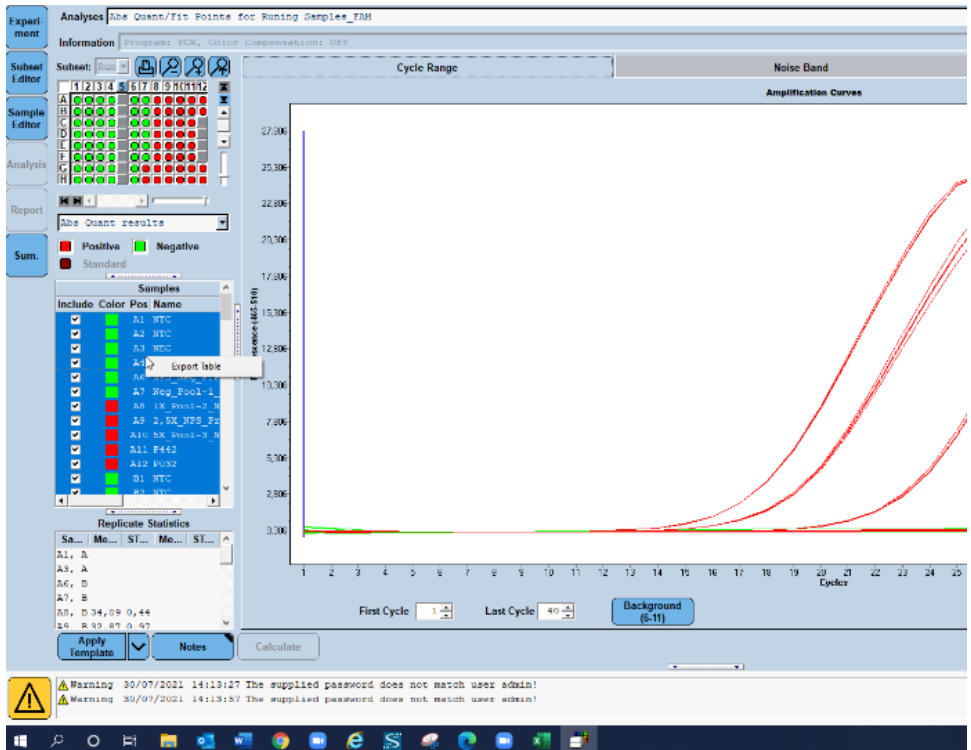
Analyse in cobas z 480

In de cobas z 480 worden de gegevens geanalyseerd met LightCycler 480 SW UDF versie 2.0.0 (of hoger) volgens de instructies van de fabrikant. Creëer een subset van monsters, enkel met de putjes die in het experiment worden gebruikt. Voor elk kanaal creëert u een analysepagina **Abs Quant/Fit Points** (Absolute kwantificering/Fitpunten) en gebruikt u de volgende parameters voor consistentie tussen verschillende experimenten (tabel 20).

Tabel 20. Analyseparameters voor de cobas z 480

Kanalen	FAM (465-510)	HEX (540-580)	ATTO647N (610-670)
Tabblad Cycle range (Cyclusbereik)			
• Eerste-laatste cyclus	1-40	1-40	6-40
• Achtergrond	5/10	5/10	6/11
Tabblad Noise band (Geluidsband)	STD-multiplicator	STD-multiplicator	STD-multiplicator
• Methode			
• Waarde voor STD-multiplicator	50	40	25
Tabblad Analysis (Analyse)			
• Fitpunten	2	2	2
• Drempelmethode	Auto	Auto	Auto
Grenscyclus	Ct > 39,00 wordt beschouwd als 40,00	Ct > 35,00 wordt beschouwd als 40,00	Nee

In de LightCycler 480 SW UDF versie 2.0.0 (of hoger) zijn Ct-waarden (**Cp** genoemd in de software) van een geselecteerde groep putjes of de volledige plaat beschikbaar in de sectie **analysis** (analyse) (afbeelding 10). Gegevens kunnen worden geëxporteerd als een tekstbestand (**.txt**) per kanaal door met de rechtermuisknop te klikken op de resultatentabel en **Export table** (Tabel exporteren) te selecteren.



Afbeelding 10. Schermafbeelding van geëxporteerde gegevens in de LightCycler 480 SW UDF versie 2.0.0 (of hoger).

Analyse in QuantStudio 5 Dx

In de QuantStudio 5 Dx worden de gegevens geanalyseerd met QuantStudio 5 Dx IVD Software versie 1.0.1 (of hoger) volgens de instructies van de fabrikant. In het venster **Assign Targets and Samples** (Doelwitten en monsters toewijzen) moeten de 3 fluoroforen (FAM, VIC en Cy5) worden geselecteerd voor alle putjes die in het experiment worden gebruikt en **ROX** moet worden gekozen als **Passive reference** (Passieve referentie). De volgende parameters zijn nodig voor consistentie tussen verschillende analyses (tabel 21).

Tabel 21. Analyseparameters voor de QuantStudio 5 Dx

Kanalen	FAM	VIC	Cy5
Passieve kleurstof	ROX	ROX	ROX
Fluorescentiedrempel	0,21	0,062	0,04
Instelling baseline	Auto	Auto	Auto
Grenscycli	Ct > 39,00 wordt beschouwd als 40,00	Ct > 35,00 wordt beschouwd als 40,00	Nee

Gegevens kunnen worden geëxporteerd als een spreadsheet of tekst (.xls, .xlsx, .txt). In het tabblad **Export** van het venster van de QuantStudio 5 Dx IVD Software selecteert u alle opties in de sectie **content** (inhoud) en dan kiest u de optie **unify the above content into one file** (bovenstaande inhoud samenbrengen in één bestand).

Interpretatie van de resultaten

De positieve controle (Positive Control, PC), de N1- en de N2-genen worden gedetecteerd in het fluorescentiekanaal Green met de RGQ MDx 5plex HRM of in het fluorescentiekanaal FAM in de ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 en QuantStudio 5 Dx.

De bemonsteringscontrole, die bestaat uit de RNase P, wordt gedetecteerd in het fluorescentiekanaal Yellow met de RGQ MDx 5plex HRM of in de fluorescentie VIC/HEX met de ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 en QuantStudio 5 Dx. Elk klinisch monster moet een amplificatie van de bemonsteringscontrole weergeven. In de PC kan een gele amplificatie zichtbaar zijn zonder dat menselijke sequenties aanwezig zijn. In dit geval kan een signaal in het gele kanaal van de PC genegeerd worden, omdat het sterke fluorescentiesignaal in het kanaal Green kan overlopen in het kanaal Yellow. De interne controle (Internal Control, IC) is opgenomen in de SARS-CoV-2 Amp Primers. Ze wordt gedetecteerd in de controle zonder template (No Template Control, NTC), de controle zonder extractie (No Extraction Control, NEC), de positieve controle (Positive Control, PC) en de klinische monsters met het fluorescentiekanaal Red met de RGQ MDx 5plex HRM of in het fluorescentiekanaal Cy5/ATTO647N met de ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 en QuantStudio 5 Dx. Een real-time RT-PCR-run is pas geldig als PC-, NTC-, en NEC-controles worden uitgevoerd zoals in tabel 22 en tabel 23.

Tabel 22. Criteria voor runvaliditeit en interpretatie van de resultaten voor de RGQ MDx 5plex HRM

Controle	Detectie in Green kanaal	Detectie in Yellow kanaal	Detectie in Red kanaal	Interpretatie
Positieve controle (Positive Control, PC)	Ct ≤ 38,00	Onverschillig	Onverschillig	PC is geldig.
	Ct > 38,00 of Geen Ct	Onverschillig	Onverschillig	PC is ongeldig.
Controle zonder template (No Template Control, NTC) of	Ct > 38,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Ja	NTC/NEC is geldig.
Controle zonder extractie (No Extraction Control, NEC)	Andere combinaties met amplificatie in Green of Yellow		Onverschillig	NTC/NEC is ongeldig.

Tabel 23. Criteria voor geldigheid van runs en interpretatie van resultaten voor de ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 en QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR-instrumenten

Controle	Detectie in FAM-kleurstof*	Detectie in VIC/HEX-kleurstof*	Detectie in Cy5/ATTO647N-kleurstof*	Interpretatie
Positieve controle (Positive Control, PC)	Ct ≤ 39,00	Onverschillig	Onverschillig	PC is geldig.
	Ct > 39,00 of Geen Ct	Onverschillig	Onverschillig	PC is ongeldig.
Controle zonder template (No Template Control, NTC) of	Ct > 39,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Ja	NTC/NEC is geldig.
Controle zonder extractie (No Extraction Control, NEC)	Andere combinaties met amplificatie in FAM of VIC/HEX		Onverschillig	NTC/NEC is ongeldig.

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

Tabel 24. Criteria voor monstervaliditeit en interpretatie van de resultaten voor de RGQ MDx 5plex HRM

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

Tabel 25. Criteria voor geldigheid van monsters en interpretatie van resultaten voor de ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 en QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR-instrumenten.

Detectie in FAM-kleurstof*	Detectie in VIC/HEX-kleurstof*	Detectie in Cy5/ATTO647N-kleurstof*	Interpretatie
Ct ≤ 39,00	Onverschillig	Onverschillig	Monster is positief.
Ct > 39,00 of Geen Ct	Ct ≤ 35,00	Onverschillig	Monster is negatief, SARS-CoV-2 niet gedetecteerd.
Ct > 39,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Ja	Ongeldig monster. Geen menselijk materiaal gedetecteerd. Nieuwe bemonstering vereist.
Ct > 39,00 of Geen Ct	Ct > 35,00 of Geen Ct	Nee	Ongeldig monster. real-time RT-PCR-reactie is geremd. Een nieuwe test is vereist.

Beperkingen

- Uitsluitend voor *in-vitro*diagnostisch gebruik.
- Resultaten van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zijn niet bedoeld om te worden gebruikt als de enige basis voor de diagnose, behandeling of andere beslissingen over de behandeling van de patiënt. Negatieve resultaten sluiten infectie met SARS-CoV-2 niet uit en mogen niet worden gebruikt als enige onderbouwing voor behandelingsbesluiten voor de patiënt.
- Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat speciale instructies en training heeft gekregen in de procedures voor *in-vitro*diagnostiek.
- Een strikte naleving van de gebruikershandleiding van het real-time RT-PCR-platform (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 of QuantStudio 5 Dx) is vereist voor optimale PCR-resultaten.
- Let goed op de uiterste gebruiksdatums op het etiket van de doos en op de etiketten van alle onderdelen. Gebruik geen componenten waarvan de uiterste gebruiksdatum is verstreken.
- De prestaties van deze test zijn niet vastgesteld voor speeksel-specimens van patiënten zonder de symptomatologie van een luchtweginfectie.
- Om het risico op een fout-negatief resultaat te vermijden in het geval een laagpositief klinisch monster wordt getest wanneer bloedsporen worden waargenomen in de buis, moet dit worden geregistreerd; indien het monster een negatief resultaat oplevert bij gebruik van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, moet het opnieuw worden afgenomen bij de patiënt en nogmaals worden getest met de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Prestaties

Analytische gevoeligheid (detectielimiet)

De analytische gevoeligheid of detectielimiet (Limit of Detection, LoD) is gedefinieerd als de laagste concentratie waarbij bij $\geq 95\%$ van de geteste monsters een positief resultaat wordt gevonden. De LoD werd geëvalueerd door de analyse van seriële verdunningen van negatieve nasofaryngeale monsters en vloeibaar gemaakte, onverdunde speekselmonsters die zijn bereid met voorraden met hoge titer van geïnactiveerde virusdeeltjes verkregen van commerciële leveranciers (ZeptoMetrix®). Twee monsterpoolen werden voor elk specimen gebruikt voor de LoD-experimenten. Om de vastgelegde LoD-concentratie te bevestigen, moet het detectiepercentage van alle replicaten $\geq 95\%$ zijn (minstens 19/20 van de replicaten moeten een positief signaal genereren).

De LoD-concentratie werd geverifieerd in nasofaryngeale en onverdunde speekselmonsters op de geclaimde real-time RT-PCR-platformen (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx en cobas z 480).

Nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale monsters

De LoD wordt geclaimd op 950 cp/ml voor de RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx en QuantStudio 5 Dx en 475 cp/ml voor de cobas z 480 (zie tabel 26)

Onverdunde speekselmonsters

De LoD wordt geclaimd op 950 cp/ml voor RGQ MDx en 1200 cp/ml voor ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx en CFX96 Dx (zie tabel 26).

Tabel 26. Samenvatting van LoD-resultaten voor elk real-time RT-PCR-platform

Platform	Type specimen	LoD-geverifieerd (cp/ml)
RGQ MDx	NPS	950
	Onverdund speeksel	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Onverdund speeksel	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Onverdund speeksel	1200
cobas z 480	NPS	475
	Onverdund speeksel	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Onverdund speeksel	1200

Onderzoeken naar analytische specificiteit (Inclusiviteit en exclusiviteit/kruisreactiviteit)

Inclusiviteit

De inclusiviteit van de *artus* SARS-CoV-2 Amp-primers en -probes werd geëvalueerd aan de hand van een *in-silico* analyse op sequenties die beschikbaar zijn in de GISAID-database (www.gisaid.org). In totaal werden 722.488 sequenties (beschikbaar op 23/03/2021) geanalyseerd op COVID CG (<https://covidcg.org>) op basis van GISAID-metadata. Sequenties werden afgestemd op de WIV04-referentiesequentie (100% identiek aan Wuhan-Hu-1/NC_045512.2, met uitzondering van de lengte van de poly-A-staart) en de enkelvoudige nucleotidevariëaties (Single Nucleotide Variations, SNV's) werden geanalyseerd in de genomische gebieden waarop de primers en probes van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zich richtten. De prevalentie van de geïdentificeerde SNV's bleef onder de 1%, evenals de frequentie van de mutaties die zich tegelijkertijd voordeden. Er bevond zich geen SNV op de achterste 1 tot 3 nucleotiden op het 3'-uiteinde van de respectieve oligonucleotiden, waarvan zou worden verwacht dat ze invloed zouden hebben op de prestaties. Van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wordt beschouwd dat deze 100% van de gepubliceerde sequenties detecteert.

Exclusiviteit/kruisreactiviteit

In-silico analyse

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

In totaal zijn 36 bacterie-, virus- en schimmelstammen (tabel 27) geanalyseerd met *in-silico* PCR, met een beperkte potentiële amplicongrootte van 500 bp. Pathogensequenties werden opgenomen uit de NCBI-database, maar geen van deze pathogenen vertoonde amplificatie *in silico*. Tabel 27 toont de lijst met pathogenen die *in-silico* zijn getest.

Tabel 27. Lijst met *in-silico* geteste pathogenen.

Pathogenen	Stam/type	Taxonomie-ID	<i>In-silico</i> PCR-resultaten
Adenovirus type 3	Type 3	45659	Geen overeenkomst
Adenovirus type 4	Type 4	28280	Geen overeenkomst
Adenovirus type 5	Type 5	28285	Geen overeenkomst
Adenovirus type 7A	Type 7A	85755	Geen overeenkomst
Adenovirus type 14	Type 14	10521	Geen overeenkomst
Adenovirus type 31	Type 31	10529	Geen overeenkomst
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Geen overeenkomst
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Geen mogelijke amplificatie* [†]
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Geen overeenkomst
Enterovirus	Type 68	42789	Geen overeenkomst

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

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

(Vervolgd op de volgende pagina)

Tabel 27. (Vervolg van vorige pagina)

Pathogenen	Stam/type	Taxonomie-ID	<i>In-silico</i> PCR-resultaten
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus	229E	11137	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus	NL63	277944	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus	HKU-1	290028	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus OC43	OC43	31631	Geen overeenkomst
Humaan coronavirus	MERS-CoV	1335626	Geen overeenkomst
Humaan metapneumovirus	n.v.t.	162145	Geen overeenkomst
Influenza A	H1N1	114727	Geen overeenkomst
Influenza A	H3N2	119210	Geen overeenkomst
Influenza B	n.v.t.	11520	Geen overeenkomst
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Geen overeenkomst
Para-influenzavirus	Type 1	12730	Geen overeenkomst
Para-influenzavirus	Type 2	2560525	Geen overeenkomst
Para-influenzavirus	Type 3	11216	Geen overeenkomst
Para-influenzavirus	Type 4	2560526	Geen overeenkomst
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Geen overeenkomst
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Geen mogelijke amplificatie*
Respiratoir syncytieel virus	Type A (RSV-A)	208893	Geen overeenkomst
Respiratoir syncytieel virus	Type B (RSV-B)	208895	Geen overeenkomst
Rhinovirus	Type A	147711	Geen overeenkomst
Rhinovirus	Type B	147712	Geen overeenkomst
SARS-coronavirus	Tor2	694009	Geen mogelijke amplificatie†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	n.v.t.	1282	Geen overeenkomst
<i>Streptococcus pyogenes</i>	n.v.t.	1314	Geen mogelijke amplificatie†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Geen mogelijke amplificatie†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Geen overeenkomst

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

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

In-vitro analyse

De kruisreactiviteit werd *in-vitro* geverifieerd met pathogenen die $\geq 80\%$ homologie met de SARS-CoV-2 Amp Primers vertoonden in de *in-silico* analyse. Monsters werden bereid door potentieel kruisreactieve organismen toe te voegen aan een nasofaryngeale uitstrijkmatrix bij 10^6 cp/ml, met uitzondering van SARS-CoV-1, welke onverdund werd getest in overeenstemming met de aanbevelingen van de leverancier. Geen van deze pathogenen vertoonde *in-vitro* kruisreactiviteit.

De microbiële interferentie van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit-assay is *in-vitro* geëvalueerd op een panel van aanbevolen pathogenen (tabel 28). Monsters werden bereid door maximaal 5 pathogenen toe te voegen (bij 105 TCID50/ml voor virusdoelen, 10^6 cp/ml voor bacterie- en schimmeldoelen, of bij de hoogst mogelijke concentratie op basis van de concentratie van de voorraad) in negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes waaraan geïnactiveerde SARS-CoV-2-deeltjes (Zeptomatrix) waren toegevoegd bij $2,87 \times \text{LoD}$. De NATrol™-panelen en de SARS-CoV-1 waren rechtstreeks verrijkt met geïnactiveerde SARS-CoV-2-virusdeeltjes (Zeptomatrix) bij $2,87 \times \text{LoD}$. De resultaten voor alle geteste micro-organismepools en de bijbehorende concentraties zijn hieronder samengevat.

Tabel 28 toont de lijst van geteste pathogenen in microbiële interferentie.

Tabel 28. Lijst met *in-vitro* geteste pathogenen in microbiële interferentie.

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

(Vervolg op de volgende pagina)

Tabel 28 (Vervolg van vorige pagina)

Pool-ID/ monster-ID	Micro-organisme	Bron	Uiteindelijke concentratie	Eenheid	Resultaat
Pool 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Para-influenzavirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3,30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4,60E+06	CFU/ml	
Pool 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Adenovirus T7A	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1,02E+06	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1,00E+08	CFU/ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
Pool 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Respiratoir syncytieel virus RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H1N1 California	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterovirus type 68 hoofdgroep	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Adenovirus T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Pool 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	MERS-coronavirus	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	AdenoVirus T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Humaan Metapneumovirus (hMPV) type B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Respiratoir syncytieel virus type B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(Vervolg op de volgende pagina)

Tabel 28 (Vervolg van vorige pagina)

Pool-ID/ monster-ID	Micro-organisme	Bron	Uiteindelijke concentratie	Eenheid	Resultaat
Pool 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Para-influenzavirus 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H3N2 Switzerland/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Pool 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	NATrol Panel RP1 (Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY/02/2009), Rhinovirus (type 1A), Adenovirus T3, Para-influenza T1, Para-influenzavirus T4, Metapneumovirus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Coxsackievirus (Type A1)	Zeptomatrix (MDZ001)	Onbekend*	N.v.t.	
Pool 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	NATrol Panel RP2 (Influenza A H1 (New Caledonia/20/99), Influenza B (Florida/02/06), RSV-A, Para-influenza T2, Para-influenza T3, Coronavirus HKU recombinant, Coronavirussen (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639)	Zeptomatrix (MDZ001)	Onbekend*	N.v.t.	
Pool 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Geen interferentie
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Onbekend*	N.v.t.	

* Concentratie niet doorgegeven door de leverancier.

Interfererende stoffen

Nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale uitstrijkjes

Het effect van vermeende interfererende stoffen (voor de stoffen vermeld in tabel 29) op de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is geëvalueerd. Tests werden uitgevoerd in 3 pools van negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes en in 3 pools van positieve nasofaryngeale uitstrijkjes, verrijkt bij 4 x LoD met geïnactiveerde SARS-CoV-2-virusdeeltjes (Zeptomatrix). De experimenten werden uitgevoerd op het RGQ MDx 5plex HRM-platform (met 4 instrumenten) door 1 operator met 1 pilotkit.

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

Uit tabel 29 blijkt dat geen van de geteste stoffen een storende werking had op de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit in het Green fluorescentiekanaal.

Tabel 29. Lijst van interfererende stoffen en slagingspercentages in het Green kanaal.

Interfererende stoffen	Funcie	Geteste concentratie	Resultaten voor slagingspercentage in een negatief nasofaryngeaal uitstrijkje	Resultaten voor slagingspercentage in een positief (4 x LoD) nasofaryngeaal uitstrijkje
Tobramycine	Systemisch antibioticum	1 mg/ml	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 15/15
Mupirocine	Antibiotische neuszalf	6,6 mg/ml	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 15/15
Fluticasone	Nasale corticosteroïde	5% (vol.)	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 15/15
Menthol (keelpastilles)	Oraal verdovingsmiddel en pijnstiller	0,5 mg/ml	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 15/15
Oxymetazoline	Neusspray	10% (vol.)	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 15/15

Vervolgd op de volgende pagina

Tabel 29 (vervolg van vorige pagina)

Interfererende stoffen	Functie	Geteste concentratie	Resultaten voor slagingspercentage in een negatief nasofaryngeaal uitstrijkje	Resultaten voor slagingspercentage in een positief (4 x LoD) nasofaryngeaal uitstrijkje
Osetamivir	Antiviraal geneesmiddel	3,3 mg/ml	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 15/15
Mucine (boviene submaxillaire klier, type I-S)		2,5 mg/ml	Geen interferentie 0/15	Geen interferentie 15/15
Volbloed		4% (vol.)	Geen interferentie 1/15*	Geen interferentie 15/15

* Een amplificatie die overeenkomt met een artefact is gedetecteerd.

Onverdunde speekselmonsters

Het effect van acht vermeende interfererende stoffen (voor de stoffen vermeld in tabel 30) op de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit is geëvalueerd. De tests werden uitgevoerd in 1 pool van negatieve onverdunde speekselmonsters, die in tweeën gesplitst is om twee verdunningsniveaus te bereiken: (1) negatieve onverdunde speekselmonsters, en (2) kunstmatige positieve onverdunde speekselmonsters (verkregen door verrijking bij 3x LoD (3600 cp/ml) met geïnactiveerde SARS-CoV-2-virusdeeltjes (Zeptomatrix) in de negatieve pool). Onverdunde speekselmonsters werden getest met het cobas z 480-platform door 3 operatoren met één commerciële kit.

Voor elke interfererende stof werden de monsterreplica's in tweeën verdeeld om ofwel de interfererende stof in een oplosmiddel (testmonster) of alleen het oplosmiddel (controlemonster) te testen. De slagingspercentages in de fluorescentiekanalen Green, Red en Yellow werden vergeleken tussen de test en de bijbehorende controlemonsters. Bij afwezigheid van een storende werking hebben de test en de bijbehorende controlemonsters hetzelfde slagingspercentage.

Voor de kwalitatieve analyse (monsterstatus) hebben de acht geteste interfererende stoffen (zie tabel 30) geen impact op de resultaten van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit voor positieve en negatieve speekselmonsters.

Uit tabel 30 blijkt dat geen van de geteste stoffen een storende werking had op de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit in het Green fluorescentiekanal.

Tabel 30. Lijst van interfererende stoffen en slagingspercentages in het kanaal Green.

Interfererende stof*	Funcie	Geteste concentratie	Resultaten van slagingspercentage in negatieve onverdunde speekselmonsters	Resultaten van slagingspercentage in positieve (3 tot 5x LoD) onverdunde speekselmonsters
Volbloed	Endogene stof: menselijk gDNA, leukocyten, erythrocyten	1% vol.	Geen interferentie* 0/8	Geen interferentie* 8/8
Altoids®	Snoep	2% w/v	Geen interferentie 0/8	Geen interferentie 8/8
Aspirine	Anti-inflammatoir geneesmiddel	1% w/v	Geen interferentie 0/8	Geen interferentie 8/8
Listerine®	Antiseptische mondspoeling	1% vol.	Geen interferentie 0/8	Geen interferentie 8/8
Ricola®	Snoep	1% w/v	Geen interferentie 0/8	Geen interferentie 8/8
Colgate® Total SF Whitening™ tandpasta	Tandwittende tandpasta	0,1% w/v	Geen interferentie 0/8	Geen interferentie 8/8
Tussidane® siroop	Geneesmiddel voor droge hoest	1% vol.	Geen interferentie 0/8	Geen interferentie 8/8
Pulmofluide®	Geneesmiddel voor natte hoest	1% vol.	Geen interferentie 0/8	Geen interferentie 8/8

* Voor het volbloed werd een interfererend effect waargenomen voor de IC-detectie in het kanaal Red (10-40% remming) zonder dat dit een impact had op de geldigheid van de monsters. In het kanaal Green werd de monsterstatus niet beïnvloed door het volbloed, maar wel werd een lichte Ct-verschuiving waargenomen (gemiddeld 1,35 Ct later bij volbloed dan bij het controlemonster).

Om het risico op een fout-negatief resultaat te vermijden in het geval een laagpositief klinisch monster wordt getest wanneer bloedsporen worden waargenomen in de buis, moet dit worden geregistreerd; indien het monster een negatief resultaat oplevert bij gebruik van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, moet opnieuw onverdund speeksel worden afgenomen bij de patiënt en het monster nogmaals worden getest met de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Monsterstabiliteitsonderzoek

De stabiliteit van de monsters werd bestudeerd om de impact van verschillende opslagomstandigheden op de kwalitatieve (analyse van slagingspercentage) en kwantitatieve (analyse van Ct-verschuiving) resultaten van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kits te evalueren. De experimenten werden uitgevoerd door twee verdunningsniveaus te analyseren: (1) negatieve monsters en (2) kunstmatige positieve monsters verkregen door verrijking van geïnactiveerde SARS-CoV-2-virusdeeltjes (Zeptomatrix). Om de stabiliteit van de monsters (speeksel en NPS) te bevestigen, diende $\geq 95\%$ van de replica's hetzelfde slagingspercentage op te leveren en een Ct-verschuiving $\leq 10\%$ t.o.v. het tijdstip 0 voor elke stabiliteitsconditie.

Nasale, orofaryngeale en nasofaryngeale monsters:

De verschillende stabiliteitscondities die zijn getest staan in tabel 31. De tests werden uitgevoerd met 3 monsterpools. Negatieve NPS-monsters, 5x LoD (4750 cp/ml) van kunstmatige positieve NPS-monsters en drie partijen van vrijgavemonsters BRS1 (N2-string, 1000 cp/10 μ l), BRS2 (RNAse P gblock, 1000 cp/10 μ l) en BRS3 (N1-string, 1000 cp/10 μ l) werden getest met het ABI 7500 Fast Dx-platform.

Uit de resultaten van de kwalitatieve en kwantitatieve analyse blijkt dat de geteste opslagomstandigheden voor NPS-monsters geen impact hadden op het slagingspercentage (zelfde status gedetecteerd als verwacht) en niet leidden tot aanzienlijke Ct-verschuivingen van de resultaten van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. De prestatie van de kit was dus stabiel, ondanks de erg verschillende opslagomstandigheden van NPS-monsters die zijn getest (zie tabel 31).

Tabel 31 toont de stabiliteitscondities van nasofaryngeale monsters

Tabel 31. Stabiliteitscondities voor nasofaryngeale monsters.

Conditie	Geclaimde monsterstabiliteit
F/T	3 F/T
4 °C (2 °C tot 8 °C)	72 u
-70 °C	2 weken

Onverdunde speekselmonsters

De verschillende stabiliteitscondities die zijn getest staan in tabel 32. De tests werden uitgevoerd met 2 monsterpools. Negatieve onverdunde speekselmonsters en 3xLoD (3600 cp/ml) kunstmatige positieve onverdunde speekselmonsters werden getest met het ABI 7500 Fast Dx-platform.

Uit de resultaten van de kwalitatieve en kwantitatieve analyse blijkt dat de geteste opslagomstandigheden geen impact hadden op het slagingspercentage (zelfde status gedetecteerd als verwacht) en niet leidden tot aanzienlijke Ct-verschuivingen van de resultaten van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. De prestatie van de kit was dus stabiel, ondanks de verschillende opslagomstandigheden van onverdunde speekselmonsters die zijn getest.

Tabel 32 toont de stabiliteitscondities van onverdund speeksel.

Tabel 32. Stabiliteitscondities van onverdunde speekselmonsters

Conditie	Geclaimde monsterstabiliteit
F/T	3 F/T
KT (18 °C tot 26 °C)	72 u
4 °C (2 °C tot 8 °C)	72 u
Gecombineerde conditie: (6 uur op KT gecombineerd met 72 uur op 4 °C (2 tot 8 °C) gecombineerd met 8 dagen op -20 °C (-30 °C tot -15 °C)	6 uur KT dan 72 uur op 4 °C (2 tot 8 °C), dan 7 dagen -20 °C (-30 °C tot -15 °C)
-20 °C (-30 °C tot -15 °C)	1 maand (30,5 dagen)

Precisie

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

Voor elk verdunningsniveau werden 204 datapunten verzameld. De gegevens van de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid werden gebruikt om de standaardafwijking (Standard Deviation, SD) en variatiecoëfficiënt (Coefficient of Variation, %CV) voor de SARS-CoV-2-doelen in de kanalen Green, Yellow en Red te bepalen. Tabel 33 toont aan dat de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit een algehele precisie van 0,63 SD (2,03% CV) in het kanaal Green, 0,54 SD (2,22 %CV) in het kanaal Yellow en 1,28 SD (4,10 %CV) in het kanaal Red heeft.

Tabel 33. Standaardafwijking en variatiecoëfficiënt van de artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

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

Klinische prestaties

Nasofaryngeale uitstrijkjes

De klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-assay werd geëvalueerd met retrospectieve specimens van nasofaryngeale uitstrijkjes in transportmedium, bestaande uit 150 klinische specimens.

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

De klinische validatie werd uitgevoerd op de ABI 7500 Fast Dx. In tabel 34 staan de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ten opzichte van een referentiemethode vermeld.

Tabel 34. Klinische prestaties van de *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* ten opzichte van een referentiemethode.

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

Afwijkende resultaten werden geëvalueerd aan de hand van een derde methode en opnieuw geanalyseerd met een kruistabel. De algehele klinische prestatieresultaten worden uitgedrukt als percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA) en percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA) en staan vermeld in tabel 35.

Tabel 35. Klinische prestaties van de *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* na analyse van afwijkende resultaten.

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

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

Percentage positieve overeenstemming

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

Percentage negatieve overeenstemming

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

Nasofaryngeale uitstrijkjes met inbegrip van asymptomatische personen

De klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-assay werd geëvalueerd met retrospectieve specimens van nasofaryngeale uitstrijkjes in transportmedium, bestaande uit 153 klinische specimens.

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

De klinische validatie werd uitgevoerd op de ABI 7500 Fast Dx. 16 monsters zijn na het testen met de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit uitgesloten wegens een ongeldige status volgens de geldigheidscriteria voor monsters (tabel 23).

In tabel 36 staan de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ten opzichte van een referentiemethode vermeld, uitgedrukt als percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA) en percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabel 36. Klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ten opzichte van een referentiemethode

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

19 afwijkende resultaten werden geëvalueerd aan de hand van een derde methode en opnieuw geanalyseerd met een kruistabel. De algehele klinische prestatieresultaten worden uitgedrukt als percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA) en percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA) en staan vermeld in tabel 37.

Tabel 37. Klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit na analyse van afwijkende resultaten.

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

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

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

Percentage positieve overeenstemming

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

Percentage negatieve overeenstemming

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

Onverdunde speekselmonsters

De klinische prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp-assay werd geëvalueerd met onverdunde speekselmonsters, bestaande uit 142 speekselmonsters.

Alle specimens werden afgenomen bij patiënten met tekenen en symptomen van een COVID-19-infectie. De klinische validatie werd uitgevoerd op de ABI 7500 Fast Dx. 12 monsters zijn na het testen met de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit alsmede de referentiemethode uitgesloten wegens een ongeldige status volgens de geldigheidscriteria voor monsters.

In tabel 38 staan de prestaties van de *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ten opzichte van een referentiemethode vermeld.

Tabel 38. Klinische prestaties van de *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* ten opzichte van een referentiemethode.

Monsterstatus	N	% positief	95%-BI	% negatief	95%-BI
Positief	45	93,33 (42/45)	82,14 - 97,71	6,67 (3/45)	-
Negatief	85	0 (0/85)	-	100 (85/85)	95,68 - 100,00

3 afwijkende resultaten werden geëvalueerd aan de hand van een derde methode en opnieuw geanalyseerd met een kruistabel. De gehele klinische prestatieresultaten worden uitgedrukt als percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA) en percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA) en staan vermeld in tabel 39.

Tabel 39. Klinische prestaties van de *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* na analyse van afwijkende resultaten.

Monsterstatus	N	% positief	95%-BI	% negatief	95%-BI
Positief	43	97,67 (42/43)	87,94 - 99,59	2,32 (1/43)	-
Negatief	87	0 (0/87)	-	100 (87/87)	95,68 - 100,00

De classificatie van 2 fout-negatieve resultaten werd gewijzigd naar werkelijk negatief. Het enkele fout-negatieve monster bleef fout-negatief.

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

Percentage positieve overeenstemming

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

Percentage negatieve overeenstemming

(Negative Percent Agreement, NPA): $87/87 = 100,00\%$ (95%-BI: 95,68% - 100,00%)

Referenties

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

Probleemoplossingsgids

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

Opmerkingen en suggesties

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

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

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

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

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

Opmerkingen en suggesties

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











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

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

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

Symbolen

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

Symbol	Symbooldefinitie
	Bevat voldoende reagentia voor 768 of 3072 reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Componenten
	Bevat
	Nummer
	Global Trade Item Number
R_n	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing; 'n' is het revisienummer
	Temperatuurbepering

Symbol

Symboldefinitie



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Verwijderd houden van zonlicht



Waarschuwing/voorzichtig

Contactgegevens

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

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Voor 768 reacties: bereidingsbuffer, ROX-kleurstof, Master Mix, primers en probes, interne controle, water (NTC) en positieve controle	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Voor 3072 reacties: bereidingsbuffer, ROX-kleurstof, Master Mix, primers en probes, interne controle, water (NTC) en positieve controle	4511469
Instrumenten en accessoires		
PCR tubes, 0.1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Voor gebruik met rotor met 72 putjes, stripbuisjes en doppen	981103
Rotor-Gene Q software	Rotor-Gene Q-software v2.3.1 (of hoger)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Realtime PCR-cycler met 5 kanalen, uitsmeltanalysator met hoge resolutie, software, laptopcomputer en accessoires; 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie	9002032
72-Well Rotor	Voor het vasthouden van Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, met reactievolumes van 10–50 µl	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Voor het vergrendelen van Strip Tubes and Caps, 0.1 ml in de 72-Well Rotor	9018904

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

Revisiegeschiedenis van document

Revisie	Beschrijving
R1, april 2021	Eerste uitgave.
R2, juli 2021	Claimuitbreiding: Test is opgesteld voor asymptomatische personen. Beoogd gebruik is bijgewerkt met personen zonder symptomen of met andere redenen om COVID-19-infectie te vermoeden. Gedeelte over Klinische prestaties inclusief asymptomatische personen werd toegevoegd aan Prestatiegegevens.
R3, september 2021	Claimuitbreiding: <ol style="list-style-type: none">1. Toevoeging van testen met monsterspecimens.2. Wijziging van de workflow.3. Voor gebruik met 3 bijkomende platformen en hun betreffende software: CFX96 Dx met CFX Manager Dx Software versie 3.1.3090.1022 (of hoger), cobas z 480 met LightCycler 480 SW UDF versie 2.0.0 (of hoger) en QuantStudio 5 Dx met QuantStudio 5 Dx IVD Software versie 1.0.1 (of hoger).4. De detectielimiet van de 3 bijkomende platformen (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) werd toegevoegd in het gedeelte van de prestaties voor de nasale, nasofaryngeale of orofaryngeale uitstrijkjes.5. Het gedeelte over prestatiekenmerken is bijgewerkt.6. Enkel fluorescentiekanalen (Green, Red, Yellow) werden behouden voor het RGQ-instrument (de namen van kleurstoffen tussen haakjes werden verwijderd).7. Enkel namen van kleurstoffen werden behouden voor CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 en QuantStudio 5 Dx.8. Voor de ABI7500 Fast Dx werden de fluorescentiefilters A/1, B/2 en E/5 verwijderd. Enkel de namen van kleurstoffen werden behouden (Fam, Vic en Cy5).9. Wijzigingen van Tabellen 34-37 in het gedeelte klinische prestaties ter verduidelijking van de presentatie.

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

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

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

Kijk op www.qiagen.com voor actuele licentievooraarden.

Handelsmerken: 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 of diens dochterondernemingen); Alloids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet worden beschouwd als niet wettelijk beschermd.

09/2021 HB-2850-003 © 2021 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

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