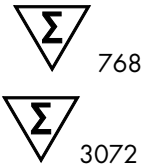


Tammikuu 2022

artus[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp[™] UM Kit -sarjan käyttöohje (käsikirja)



Versio 1



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



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA

R4

Sisältö

| | |
|--|----|
| Käyttötarkoitus..... | 4 |
| Kuvaus ja toimintaperiaate..... | 5 |
| Patogeenitiedot | 5 |
| Yhteenveto ja selitykset..... | 6 |
| Toimitetut materiaalit | 9 |
| Sarjan sisältö | 9 |
| Tarvikesarjan osat | 10 |
| Alustat ja ohjelmisto..... | 11 |
| Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen..... | 12 |
| Tarvikkeet ja välineet | 12 |
| Varoitukset ja varotoimet | 14 |
| Turvallisuustiedot | 14 |
| Varotoimet..... | 15 |
| Reagenssien säilytys ja käsittely..... | 16 |
| Näytteiden kuljetus, säilytys ja käsittely | 16 |
| Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus RGQ MDx 5plex HRM -laitteella..... | 18 |
| Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus ABI 7500 Fast Dx -laitteella | 24 |
| Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus CFX96 Dx -laitteella | 29 |
| Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus cobas z 480 -laitteella | 34 |

| | |
|--|----|
| Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus QuantStudio 5 Dx -laitteella | 39 |
| Tulokset | 44 |
| Analyysi RGQ MDx 5plex HRM -laitteella..... | 44 |
| Analyysi ABI 7500 Fast Dx -laitteella | 46 |
| Analyysi CFX96 Dx -laitteella | 46 |
| Analyysi cobas z 480 -laitteella | 48 |
| Analyysi QuantStudio 5 Dx -laitteella | 49 |
| Tulosten tulkitseminen | 51 |
| Rajoitukset | 54 |
| Suorituskyky | 55 |
| Analyttinen herkkyys (havaitsemisraja)..... | 55 |
| Analyttisen spesifisyyden tutkimukset (inklusiivisuus ja eksklusiivisuus/ristireaktiiviteetti)..... | 56 |
| Tarkkuus..... | 68 |
| Kliininen suorituskyky | 69 |
| Lähdeviitteet..... | 74 |
| Vianmäärittämissopas | 75 |
| Symbolit | 77 |
| Yhteystiedot | 79 |
| Tilautustiedot | 80 |
| Asiakirjan muutoshistoria..... | 81 |

Käyttötarkoitus

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarja on real-time RT-PCR -testi, joka on tarkoitettu SARS-CoV-2-viruksen nukleiinihappojen kvalitatiiviseen havaitsemiseen nenänielunäytepuikoista (Nasopharyngeal Swab, NPS), nenänäytepuikoista ja suunielunäytepuikoista, joihin on kerätty näyte henkilöiltä, joilla on COVID-19-taudin merkkejä ja oireita, tai henkilöiltä, joilla ei ole oireita tai muita syitä epäillä COVID-19-tartuntaa. Puhtaasta sylkinäytteestä tehty testi on tarkoitettu henkilöille, joilla on taudin merkkejä tai oireita tai joilla epäillään COVID-19-tartuntaa.

Se on tarkoitettu avuksi COVID-19-taudin diagnosointiin infektion akuutissa vaiheessa kliinisten havaintojen, potilashistorian ja epidemiologisten tietojen valossa.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarja on tarkoitettu ammattikäyttäjien, kuten koulutetun ja erityisesti real-time RT-PCR- ja *in vitro* -diagnostisista toimenpiteissä koulutusta saaneen kliinisen laboratoriohenkilöstön, käyttöön molekyylibiologisessa laboratorioympäristössä.

Negatiiviset tulokset eivät sulje pois SARS-CoV-2-infektiota, eikä niitä tule käyttää ainoana perusteena potilasta koskevissa hoitopäätöksissä.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan kanssa käytetään Rotor-Gene Q MDx System-, ABI 7500 Fast Dx-, QuantStudio 5 Dx-, cobas z 480- tai CFX96 Dx -laitetta real-time PCR -järjestelmänä.

Kuvaus ja toimintaperiaate

Patogeenitiedot

Koronavirukset, *Coronaviridae*-heimon alaheimo, ovat suuria vaipallisia positiivissäikeisiä RNA-viruksia, jotka aiheuttavat erittäin virulenttia sairautta ihmisissä ja kotieläimissä (1). Koronavirusten tiedetään aiheuttavan kolmannes ihmisten flunssainfektioista, ja ne ovat tunnettu nosokomialaisen ylähengitystieinfektion aiheuttaja keskosilla (2).

Uusi koronavirusheimon laji aiheutti hengitystiesairausepidemian Kiinassa Wuhanissa (1, 3). Ensin uudeksi koronavirukseksi (2019-nCoV) nimetty SARS-CoV-2-virus eroaa SARS-CoV-viruksesta (1, 3), joka aiheutti epidemian vuonna 2003, sekä MERS-CoV-viruksesta, joka on kiertänyt Lähi-idässä vuodesta 2012 alkaen. SARS-CoV-2 on COVID-19-taudin aiheuttaja. SARS-CoV-2-viruksen RNA on havaittavissa infektion aikaisessa vaiheessa ja akuutissa vaiheessa useista erilaisista ylähengitystienäytteistä (näytepuikkonäyte nenästä, suunielusta ja nenänielusta) ja puhtaista sylkinäytteistä (3).

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

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit on suunniteltu kattamaan kaksi N-geenin kohdetta (N1- ja N2-geenit), jotka havaitaan samalla fluoresenssikanavalla. Näitä kahta kohdetta ei erotella toisistaan, vaan fluoresenssisignaali syntyy kumman tahansa tai kummankin kohteen monistumisesta. Positiiviset tulokset viittaavat SARS-CoV-2-viruksen läsnäoloon mutta eivät sulje pois muiden patogeenien aiheuttamaa samanaikaista infektiota. Toisaalta negatiiviset real-time RT-PCR -tulokset eivät sulje pois infektion mahdollisuutta.

Yhteenveto ja selitykset

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarja koostuu käyttövalmiista järjestelmästä, johon kuuluu yksinkertainen näytteenvalmisteluvaihe, jota seuraa SARS-CoV-2-viruksen RNA:n havaitseminen real-time RT-PCR -menetelmällä RGQ MDx -järjestelmän tai ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- tai QuantStudio 5 Dx -laitteen avulla (kuva 1).

SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri sisältää tarvittavat reagenssit ja entsyymit SARS-CoV-2-viruksen RNA-genomin 72 emäsparin (base pair, bp) ja 67 emäsparialueen spesifiin monistamiseen ja suoraan havaitsemiseen RGQ MDx -laitteiden Green-fluoresenssikanavalla ja ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- tai QuantStudio 5 Dx -laitteiden FAM-fluoresenssikanavalla.

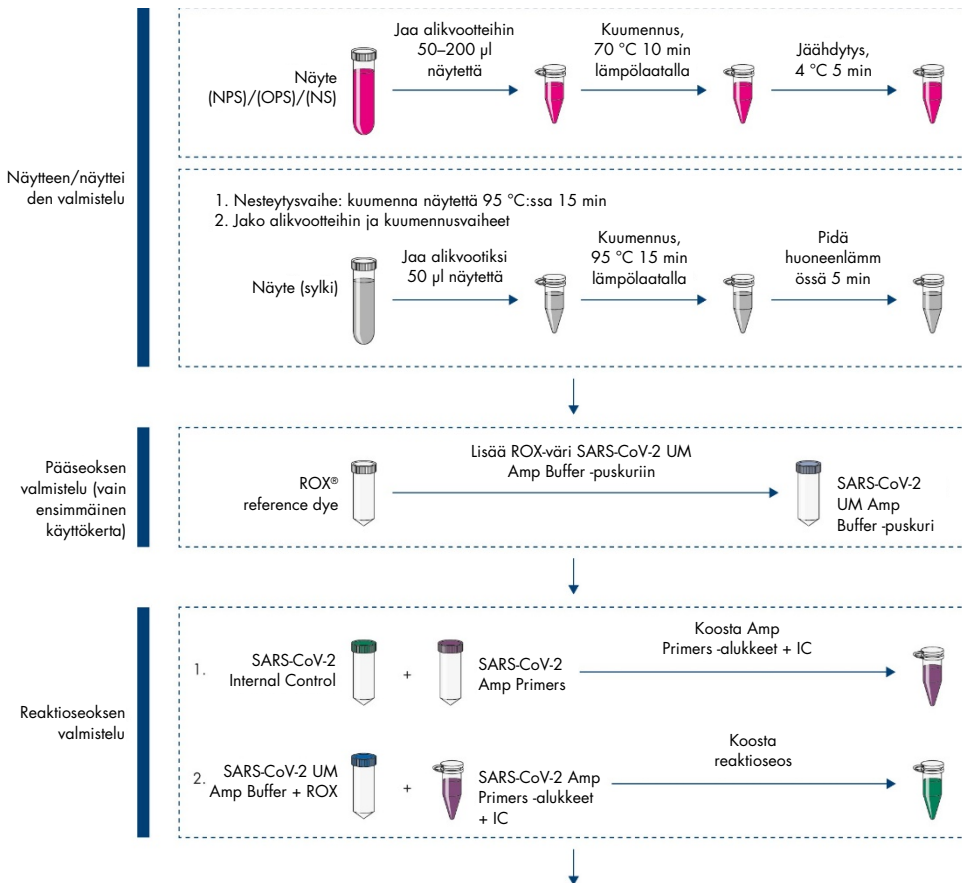
artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan Primers-alukeseokset ja Probes-koetinseokset sisältävät myös RNaasi P -monistuksiin tarvittavat oligonukleotidit. Jos monistumista havaitaan RGQ MDx -laitteen Yellow-fluoresenssikanavalla tai ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- tai QuantStudio 5 Dx -laitteen VIC/HEX-kanavalla, biologista näytettä ei ole kerätty riittävästi. Tämä kontrolli on tärkeä biologisten näytteiden olemassaolon varmistamisessa SARS-CoV-2-negatiivisissa näytteissä. Monistamisen on aina oltava havaittavissa, muuten näytteen laatu on kyseenalainen.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarja sisältää myös kolmannen rinnakkaisen monistusjärjestelmän, jonka avulla voidaan havaita mahdollinen real-time RT-PCR:n estäjä. Sen osoittaa sisäinen RNA-kontrolli (Internal Control, IC) RGQ MDx -laitteiden Red-fluoresenssikanavalla tai ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- tai QuantStudio 5 Dx -laitteiden Cy5/ATTO647N-kanavalla. Koska SARS-CoV-2 Amp Primers Mix -alukeseokseen kuuluu sisäinen kontrolli, sen monistuksen pitäisi olla tasainen, ellei näytteessä tai PCR-reaktiossa ole monistuksen estävää tai sitä viivästyttävää real-time RT-PCR:n estäjää.

Ulkoiset positiiviset ja negatiiviset kontrollit (mallittomina kontrolleina [No Template Control, NTC] SARS-CoV-2 Positive Control -kontrolli ja nukleasiton vesi) toimitetaan osana *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjaa PCR-vaiheen suorituskyvyn tarkistamista varten.

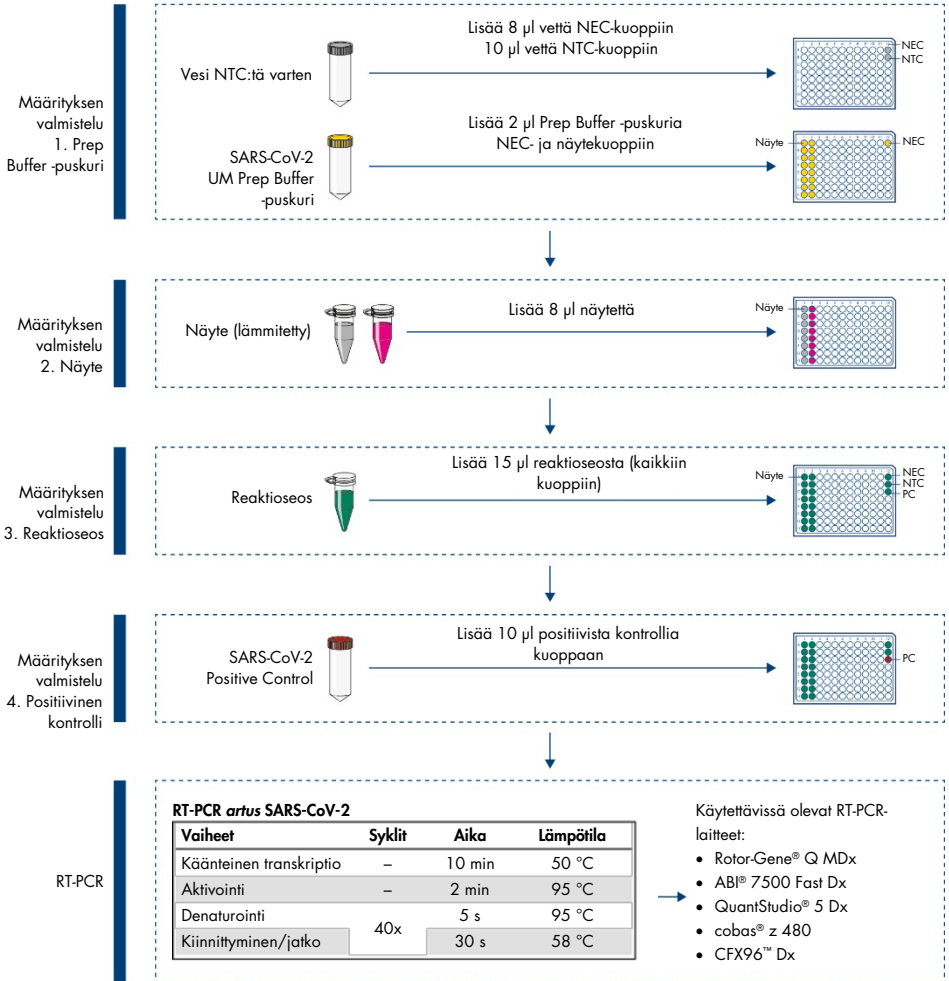
Eristämättömyyskontrollin käyttämistä (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria käytetään eristämättömyyskontrollina [No Extraction Control, NEC]) suositellaan voimakkaasti, jotta voidaan varmistaa, että valmistelupuskurissa ei ole real-time RT-PCR:n estäjiä.

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



(jatkuu seuraavalla sivulla)

(jatkuu edelliseltä sivulta)



Kuva 1. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan työnkulku

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

| artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit | | | | | |
|---|--------------------|------------------------------------|--|-------------------|-------------------|
| Tuotenumero | | | | 4511460 | 4511469 |
| Reaktioiden määrä | | | | 768 | 3072 |
| Putken väri | Kannen väri | Nimi | Putken tunnus | Määrä (µl) | Määrä (µl) |
| Kirkas | Keltainen | SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri | Preparation Buffer (Valmistelupuskuri) | 2 x 930 | 8 x 930 |
| Kirkas | Sininen | SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri | Master Mix (Pääseos) | 4 x 1440 | 16 x 1440 |
| Kirkas | Violetti | SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet | Primers and Probes (Alukkeet ja koettimet) | 4 x 1680 | 16 x 1680 |
| Kirkas | Vihreä | SARS-CoV-2 Internal Control | Internal Control (IC) (Sisäinen kontrolli (IC)) | 1 x 1390 | 4 x 1390 |
| Kirkas | Punainen | SARS-CoV-2 Positive Control | Positive Control (Positiivinen kontrolli) | 1 x 220 | 4 x 220 |
| Kirkas | Kirkas | Water for NTC (NTC-vesi) | Water (NTC) (Vesi [NTC]) | 1 x 1900 | 4 x 1900 |
| Kirkas | Kirkas | ROX Reference Dye -viiteväri | ROX Dye (ROX-väri) | 1 x 210 | 4 x 210 |

Tarvikesarjan osat

Reagenssit

Jokaisen putken reagenssimäärät on optimoitu kahdeksalle 96 näytteen erälle (768 reaktion sarja) tai kolmellekymmenellekahdelle (32) 96 reaktion erälle (3 072 reaktion sarja), mukaan lukien positiivinen kontrolli (Positive Control, PC), malliton kontrolli (No Template Control, NTC) ja eristämättömyyskontrolli (No Extraction Control, NEC).

Näytteitä voidaan käsitellä ajossa enemmän tai vähemmän, mutta tällöin reagenssien käyttö ei ole tehokasta. Useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämistä suositellaan. Reagensseista voidaan muodostaa alikvootteja, jotta useita pakastus-sulatusjaksoja voidaan välttää.

Alukkeet ja koettimet

SARS-CoV-2-sekvensseihin kohdennetut alukkeet ja koettimet perustuvat Yhdysvaltain tautikeskuksen (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) suunnittelemiin alukkeisiin ja koettiin.

Kontrollit ja kalibraattorit

Määritys sisältää 5 kontrollia, joilla valvotaan real-time RT-PCR -reaktion tehoa.

Sisäinen kontrolli (Internal Control, IC): Sisäinen kontrolli on yksisäikeinen IVT-RNA, joka vahvistaa käänteisen transkription mahdollisesti estävien kontaminanttien läsnäolon. Sisäinen kontrolli valvoo myös käänteisen transkription tehoa mallittomassa kontrollissa (No Template Control, NTC) ja eristämättömyyskontrollissa (No Extraction Control, NEC).

Malliton kontrolli (No Template Control, NTC): Malliton kontrolli on nukleasitonta vettä. Lisäämällä sitä PCR-levyyn voidaan varmistaa, ettei PCR-levyn valmistelun aikana näytteisiin pääse kontaminanteja, jotka voisivat vääristää SARS-CoV-2-kohteiden tulkintaa.

Positiivinen kontrolli (Positive Control, PC): Positiivinen kontrolli on kaksoiskierteinen DNA, joka on monistettu SARS-CoV-2-alukkeilla ja -koettimilla (P&P-seos). Sen havaitseminen vahvistaa PCR-monistusvaiheessa käytettävän reagenssin toimivuuden.

Eristämättömyyskontrolli (No Extraction Control, NEC): Eristämättömyyskontrolli koostuu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurista. Käsittelemällä se kliinisten näytteiden rinnalla voidaan varmistaa, ettei näytteen valmistelun aikana näytteisiin pääse kontaminantteja, jotka voisivat vääristää SARS-CoV-2-kohteiden tulkintaa.

Näytteenoton kontrolli: Näytteenoton kontrolli havaitsee RNAasi P -geenin ja on tärkeä biologisen näytteen olemassaolon varmistamisessa SARS-CoV-2-negatiivissa näytteissä. Näytteenoton kontrollin monistuksen pitää aina olla havaittavissa, muuten näytteen laatu on kyseenalainen.

Alustat ja ohjelmisto

Varmista ennen käyttöä, että laitteet on huollettu ja kalibroitu valmistajan suositusten mukaan. Tätä sarjaa voi käyttää viidessä eri työnkulussa, joissa tarvitaan real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttäviä laitteita ja niihin kuuluvia ohjelmistoja:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3.1 tai uudempi
- ABI 7500 Fast Dx: SDS-ohjelmistoversio 1.4.1 tai uudempi.
- CFX96 Dx ja CFX Manager Dx -ohjelmistoversio 3.1.3090.1022 tai uudempi
- cobas z 480 ja LightCycler® 480 SW UDF -versio 2.0.0 tai uudempi
- QuantStudio 5 Dx ja QuantStudio 5 Dx IVD -ohjelmistoversio 1.0.1 tai uudempi ja QuantStudio 5 Dx TD -ohjelmistoversio 1.0.1 tai uudempi.

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Tarvikkeet ja välineet

Yleiset tarvikkeet ja välineet

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

Alustakohtaiset tarvikkeet ja välineet

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite

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

ABI 7500 Fast Dx -laite

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

CFX96 Dx -laite

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

cobas z 480 -laite

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

QuantStudio 5 Dx -laite

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

Varoitukset ja varotoimet

Huomaa, että saatat joutua tarkistamaan paikalliset määräykset laitteeseen liittyvien vakavien vaaratilanteiden raportoinnista valmistajalle ja käyttäjän ja/tai potilaan oleskelumaan toimivaltaiselle viranomaiselle.

Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (Safety Data Sheets, SDS). Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina osoitteessa www.qiagen.com/safety. Voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjojen ja niiden osien käyttöturvallisuustiedotteet.

Käytä aina asianmukaisia suojavarusteita, mukaan lukien kertakäyttöiset, puuterittomat käsineet, laboratoriotakki ja suojalasit. Suojaa iho, silmät ja limakalvot. Vaihda käsineitä usein käsitellessäsi näytteitä.

Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina. Noudata aina varotoimia, jotka on kuvattu sovellettavissa ohjeistuksissa, kuten Clinical and Laboratory Standards Institute® *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guidelines (M29)*, tai muissa soveltuviissa asiakirjoissa.

Näytteet voivat olla tartuntavaarallisia. Hävitä näyte- ja määritysäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

Varotoimet

- Noudata vakiomuotoisia laboratorio-ohjeita työalueen puhtaana ja kontaminoitumattomana pitämisestä. Osoita RNA:n käsittelylle erillinen alue välineineen.
- Vältä ristikontaminaatiota noudattamalla hyviä laboratorioskäytäntöjä.
- Pyri huolellisesti välttämään RNAasi-kontaminaatio tutkimuksen aikana ja käytä RNAasittomia astioita.
- Varmista tietojen, erityisesti näytetunnisteiden, hyvä jäljitettävyys.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivämäärää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjaa voidaan säilyttää $-30...-15$ °C:ssa 6 kuukautta tai viimeiseen käyttöpäivään asti.

Näytteiden kuljetus, säilytys ja käsittely

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit on tarkoitettu käytettäväksi nenänielu-, nenä- ja suunielunäytepuikkojen sekä puhtaiden sylkinäytteiden kanssa. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina. Yhdysvaltain tautikeskus (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) sekä Public Health England -viranomaiset ovat antaneet ohjeistuksen kliinisten näytteiden ottamisesta, käsittelystä ja testauksesta. Katso lisäohjeita näistä ohjeista tai muista soveltuvista kansallisista ohjeistavista laboratoriotokollista.

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

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

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

Nenänielunäytteet pysyvät stabiileina kolmen pakastus-sulatusjakson ajan.

Puhtaiden sylkinäytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen

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

Puhtaan syljen otto-ohjeet:

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

Puhtaat sylkinäytteet pysyvät stabiileina ja niitä voidaan säilyttää

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

Puhtaat sylkinäytteet pysyvät stabiileina kolmen pakastus-sulatusjakson ajan.

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

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

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

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tarkista, että pakkaukseen ja kaikkien osien etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäiviä ja säilytysolosuhteita on noudatettu. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Käytä hyvin huollettuja ja kalibroituja laitteita.
- Varo RNAasi-kontaminaatiota kokeen aikana ja käytä nukleaasittomia muovitarvikkeita.

Ennen kuin aloitat

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteet voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- Anna ennen käyttöä SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden, SARS-CoV-2 IC -sisäisen kontrollin, veden mallitonta kontrollia varten ja positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin sulaa kokonaan huoneenlämmössä. Säilytä putkia huoneenlämmössä ennen käyttöä ja suoja ne valolta.

- Homogenisoi SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri ja SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ennen käyttöä kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa (älä käytä vortex-laitetta) ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti. Kaikki muut yksittäiset reagenssit voidaan homogenisoida pulssivorteksoimalla niitä 3–5 sekunnin ajan tai kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri estää havaitsemisvaiheessa kliinisissä näytteissä olevat RNAasit, mutta se ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen RT-PCR-levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

Toimenpide

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

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
 - 1a. Vorteksoi näytteen sisältävää näytepuikkoa voimakkaasti.
 - 1b. Jaa 50–200 µl näytettä alikvooteiksi 1,5 ml:n ei-PCR-putkiin.
 - 1c. Lämmitä laattalämmittimellä 70 °C:ssa 10 minuuttia. Jäähdytä näytteitä jäillä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
 - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaitte).
 - 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa.
 - 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.

- 2d. Lämmitä laattalämmittimellä 95 °C:ssa 15 minuuttia ja pidä sitten näytettä huoneenlämmössä ainakin 5 min ennen PCR-kuoppaan tai -putkeen lisäämistä.
3. Valmistelee ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX Reference Dye -viitevärillä.
- 3a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä yhteen SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
- 3b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
- 3c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
4. Valmistelee täyttää RGQ MDx -levy (72 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin alikvoottiseos.
- 4a. Siirrä vaaditut määrät SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäistä kontrollia taulukon 1 mukaan uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
- 4b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
- 4c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältävät SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet putken pohjalle.

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

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

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

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

Taulukko 2. Reaktioseoksen valmistelu

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

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

- Annostele 8 µl nukleaasitonta vettä NEC-kontrollin PCR-putkeen.
- Lisää 10 µl nukleaasitonta vettä NTC-kontrollin PCR-putkeen.
- Annostele 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria jokaiseen NEC-kontrollille ja valmistelluille näytteille määritettyyn PCR-putkeen.
- Lisää 8 µl valmisteltua näytettä PCR-putkeen, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 15 µl vaiheessa 5 valmisteltua reaktioseosta näytteiden ja kontrollien putkiin (esimerkki kuvassa 2). Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa ja sulje sitten PCR-putkien korkit, paitsi positiiviseksi SARS-CoV-2 Positive Control -kontrolliksi varatun putken korkki.

Huomautus: sulje putket tiukasti, jotta ristikontaminaatiota ei pääse tapahtumaan.

- Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun PCR-putkeen. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Aseta RGQ MDx 5plex HRM -laitteen RT-PCR-ohjelma taulukon 3 ohjeiden mukaisesti.

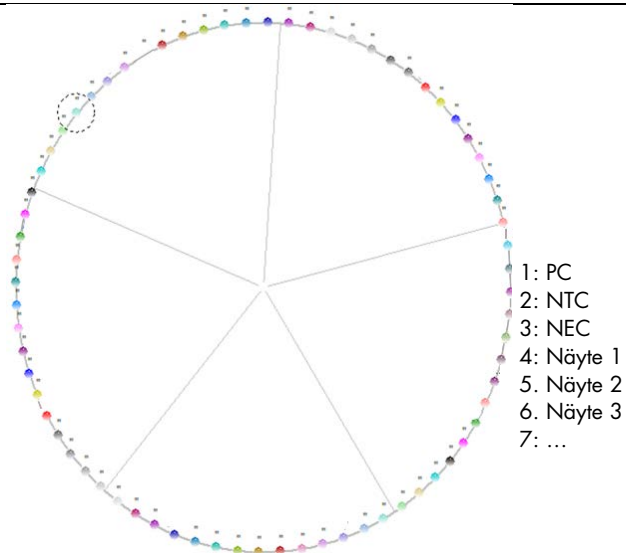
Huomautus: tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

13. Aseta putket reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen (esimerkki putkien asettelusta on kuvassa 2) ja käynnistä ohjelma taulukon 3 ohjeiden mukaisesti.

Huomautus: noudata huolellisesti samaa putkien sijoittamista ja järjestystä määrittämisen ja reaaliaikaisen jaksotuksen aikana.

Taulukko 3. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM -ohjelma

| Vaiheet | Aika | Lämpötila (°C) | Jaksojen määrä | Keruu |
|-----------------------------|--------|----------------|----------------|----------------------|
| Käänteinen transkriptio | 10 min | 50 | 1 | Ei |
| PCR:n alun lämpöaktivointi | 2 min | 95 | 1 | Ei |
| 2-vaiheinen jaksotus | | | | |
| Denaturointi | 5 s | 95 | 40 | Ei |
| Kiinnittyminen/laajeneminen | 30 s | 58 | | Green, Yellow ja Red |



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

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

15. Tarkista, että keräyskanavat on asetettu taulukon 4 mukaisesti.

Taulukko 4. RGQ MDx 5plex HRM -laitteen konfigurointi

| Nimi | PC-putken paikka | Vähimmäislukema (FI) | Enimmäislukema (FI) | Vähimmäisvahvistus | Enimmäisvahvistus |
|--------|------------------|----------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| Green | 1 * | 5 FI | 10 FI | -10 | 10 |
| Yellow | 1 * | 5 FI | 10 FI | -10 | 10 |
| Red | 1 * | 5 FI | 10 FI | -10 | 10 |

* **Huomautus:** asetettava positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin putken paikan mukaan.

16. Valitse Perform optimization before the first acquisition (Suorita optimointi ennen ensimmäistä keruuta).

17. Aloita ajo.

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

Protokolla: näytteen valmistelu ja SARS-CoV-2-viruksen tunnistus ABI 7500 Fast Dx -laitteella

Tämä on protokolla SARS-CoV-2-kohteiden valmisteluun ja tunnistamiseen ihmisen nenästä, nenänielusta tai suuontelusta otetuista, kuljetusaineessa säilytetyistä puikkonäytteistä sekä puhtaista sylkinäytteistä real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävän ABI 7500 Fast Dx -laitteen avulla.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tarkista, että pakkaukseen ja kaikkien osien etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäiviä ja säilytysolosuhteita on noudatettu. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Käytä hyvin huollettuja ja kalibroituja laitteita.
- Varo RNAasi-kontaminaatiota kokeen aikana ja käytä nukleaasittomia muovitarvikkeita.
- ABI 7500 Fast Dx -laitetta käytettäessä ROX-väri on lisättävä pääseosputkeen ennen ensimmäistä käyttökertaa.

Ennen kuin aloitat

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteet voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- ROX-värin käyttö on pakollista ABI 7500 Fast Dx -laitetta käytettäessä.
- Tiedonkeruussa on käytettävä passiivisen ROX-värin asetusta.
- Anna ennen käyttöä SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden, SARS-CoV-2 IC -sisäisen kontrollin, veden mallitonta kontrollia varten ja positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin sulaa kokonaan huoneenlämmössä. Säilytä putkia huoneenlämmössä ennen käyttöä ja suoja ne valolta.

- Homogenisoi SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri ja SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ennen käyttöä kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa (älä käytä vortex-laitetta) ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti. Kaikki muut yksittäiset reagenssit voidaan homogenisoida pulssivorteksoimalla niitä 3–5 sekunnin ajan tai kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri estää havaitsemisvaiheessa kliinisissä näytteissä olevat RNAasit mutta ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen RT-PCR-levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

Toimenpide

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

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
 - 1a. Vorteksoi näytteen sisältävää näytepuikkoa voimakkaasti.
 - 1b. Jaa 50–200 µl näytettä alikvooteiksi 1,5 ml:n ei-PCR-putkiin.
 - 1c. Lämmitä laattalämmittimellä 70 °C:ssa 10 minuuttia.
 - 1d. Jäähdytä näytteitä jäällä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
 - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaite).
 - 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa
 - 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.

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

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

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

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

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

Taulukko 6. Reaktioseoksen valmistelu

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

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

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

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

Huomautus: tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

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

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

Taulukko 7. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM -ohjelma

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

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

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

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

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

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tarkista, että pakkaukseen ja kaikkien osien etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäiviä ja säilytysolosuhteita on noudatettu. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Käytä hyvin huollettuja ja kalibroituja laitteita.
- Varo RNAasi-kontaminaatiota kokeen aikana ja käytä nukleasittomia muovitarvikkeita.

Ennen kuin aloitat

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteet voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- Anna ennen käyttöä SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden, SARS-CoV-2 IC -sisäisen kontrollin, veden mallitonta kontrollia varten ja positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin sulaa kokonaan huoneenlämmössä. Säilytä putkia huoneenlämmössä ennen käyttöä ja suojaa ne valolta.

- Homogenisoi SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri ja SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ennen käyttöä kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa (älä käytä vortex-laitetta) ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti. Kaikki muut yksittäiset reagenssit voidaan homogenisoida pulssivorteksoimalla niitä 3–5 sekunnin ajan tai kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri estää havaitsemisvaiheessa kliinisissä näytteissä olevat RNAasit, mutta se ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen PCR-levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja real-time RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

Toimenpide:

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

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
 - 1a. Vorteksoi näytteen sisältävää näytepuikkoa voimakkaasti.
 - 1b. Jaa 50–200 µl näytettä alikvooteiksi 1,5 ml:n ei-PCR-putkiin.
 - 1c. Lämmitä laattalämmittimellä 70 °C:ssa 10 minuuttia.
 - 1d. Jäähdytä näytteitä jäällä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
 - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaite).
 - 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa.

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

Taulukko 8. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seoksen valmistelu

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

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

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

Taulukko 9. Reaktiioseoksen valmistelu

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

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

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

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

Huomautus: tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

Huomautus: katso lisätietoja *CFX96 Dx -käyttöohjeesta*.

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

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

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

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

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

Kuva 4. Esimerkki levyn asettelusta CFX96 Dx -laitteessa

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

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

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tarkista, että pakkaukseen ja kaikkien osien etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäiviä ja säilytysolosuhteita on noudatettu. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Käytä hyvin huollettuja ja kalibroituja laitteita.
- Varo RNAasi-kontaminaatiota kokeen aikana ja käytä nukleaasittomia muovitarvikkeita.

Ennen kuin aloitat

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteet voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- Anna ennen käyttöä SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden, SARS-CoV-2 IC -sisäisen kontrollin, veden mallitonta kontrollia varten ja positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin sulaa kokonaan huoneenlämmössä (15–25 °C). Säilytä putkia huoneenlämmössä ennen käyttöä ja suoja ne valolta.

- Homogenisoi SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri ja SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ennen käyttöä kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa (älä käytä vortex-laitetta) ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti. Kaikki muut yksittäiset reagenssit voidaan homogenisoida pulssivorteksoimalla niitä 3–5 sekunnin ajan tai kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri estää havaitsemisvaiheessa kliinisissä näytteissä olevat RNAasit, mutta se ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen real-time RT-PCR -levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja real-time RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

Toimenpide:

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

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
 - 1a. Vorteksoi näytteen sisältävää näytepuikkoa voimakkaasti.
 - 1b. Jaa 50–200 µl näytettä alikvooteiksi 1,5 ml:n ei-PCR-putkiin.
 - 1c. Lämmitä laattalämmittimellä 70 °C:ssa 10 minuuttia.
 - 1d. Jäähdytä näytteitä jäällä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
 - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaite).

- 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa.
- 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
- 2d. Lämmitä laattalämmittimellä 95 °C:ssa 15 minuuttia ja pidä sitten näytettä huoneenlämmössä ainakin 5 min ennen PCR-kuoppaan tai -putkeen lisäämistä.
3. Valmistele ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX Reference Dye -viitevärillä.
 - 3a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä yhteen SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
 - 3b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
 - 3c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
4. Valmistele täyttää cobas z 480 -levyä (96 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin alikvoottiseos.
 - 4a. Siirrä vaadittu määrä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäistä kontrollia taulukon 11 mukaan uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
 - 4b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
 - 4c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältäviä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita, jotta liuos laskeutuu putken pohjalle.

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

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

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

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

Taulukko 12. Reaktiioseoksen valmistelu

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

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

- Annostele 8 µl nukleasitonta vettä NEC-kontrollin kuoppaan.
- Lisää 10 µl nukleasitonta vettä NTC-kontrollin kuoppaan.
- Annostele 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria sekä NEC-kontrollin että valmisteltujen näytteiden kuoppiin.
- Lisää 8 µl valmisteltua näytettä kuoppaan, jossa on SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuria. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 15 µl vaiheessa 5 valmisteltua reaktiioseosta näytteiden ja kontrollien kuoppiin (esimerkki kuvassa 5). Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Lisää 10 µl positiivista SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollia sille varattuun kuoppaan. Sekoita pipetoimalla ylös ja alas viisi kertaa.
- Sulje PCR-levy tiiviisti, jotta ristikontaminaatiota ei pääse tapahtumaan. Painele tasaisesti koko levyn alueelta, jotta myös kuoppien välit sulkeutuvat tiiviisti.
- Sentrifugoi PCR-levy lyhyesti, jotta neste laskeutuu kuoppien pohjalle.
- Ensimmäinen käyttökerä:** Napsauta Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0 -ohjelmistossa **open tools** (avaa työkalut) -painiketta ja valitse **detection formats** (tunnistusmuodot) seuraavien heräte-emissioyhdistelmien mukaan: 465–510 (FAM), 540–580 (HEX) ja 610–670 (ATTO647N).
- Määritä real-time RT-PCR:n ohjelma taulukon 13 mukaan 25 µl:n reaktiomäärälle.

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

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

Huomautus: tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

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

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

17. Aloita ajo.

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

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

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

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

Kuva 5. Esimerkki levyn asetelusta cobas z 480 -laitteessa

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

Tämä on protokolla SARS-CoV-2-kohteiden valmisteluun ja tunnistamiseen ihmisen nenästä, nenänielusta tai suunielusta otetuista, kuljetusaineessa säilytetyistä puikkonäytteistä sekä puhtaista sylkinäytteistä real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävän QuantStudio 5 Dx -laitteen avulla.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Tarkista, että pakkaukseen ja kaikkien osien etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäiviä ja säilytysolosuhteita on noudatettu. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Käytä hyvin huollettuja ja kalibroituja laitteita.
- Varo RNAasi-kontaminaatiota kokeen aikana ja käytä nukleaasittomia muovitarvikkeita.
- QuantStudio 5 Dx -laitetta käytettäessä ROX-väri on lisättävä pääseosputkeen ennen ensimmäistä käyttökertaa.

Ennen kuin aloitat

- Hengitystienäytteitä voi pitää huoneenlämmössä valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana, mutta ne suositellaan pitämään jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä.
- Sylkinäytteitä voidaan pitää jäissä tai 4 °C:ssa jäähdytystelineessä, mutta ne suositellaan pitämään huoneenlämmössä (15–25 °C) valmisteluvaiheiden ja reaktion valmistelun aikana.
- ROX-värin käyttö on pakollista QuantStudio 5 -laitetta käytettäessä.
- Anna ennen käyttöä SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin, SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden, SARS-CoV-2 IC -sisäisen kontrollin, veden mallitonta kontrollia varten ja positiivisen SARS-CoV-2 Positive Control -kontrollin sulaa kokonaan 15–25 °C:ssa. Säilytä putkia huoneenlämmössä ennen käyttöä ja suojaa ne valolta.

- Homogenisoi SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri ja SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ennen käyttöä kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa (älä käytä vortex-laitetta) ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti. Kaikki muut yksittäiset reagenssit voidaan homogenisoida pulssivorteksoimalla niitä 3–5 sekunnin ajan tai kääntämällä ne ylösalaisin 2–3 kertaa ja pyöräyttämällä niitä sitten nopeasti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskuri estää havaitsemisvaiheessa kliinisisissä näytteissä olevat RNAsit mutta ei ole viruksia inaktivoiva liuos. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.
- Varmista, että real-time RT-PCR -tekniikkaa käyttävän alustan jaksot vastaavat tässä protokollassa annettuja ohjeita.
- Reagenssit voidaan jakaa alikvooteihin useiden pakastus-sulatusjaksojen välttämiseksi.
- Valmistele reaktioseos juuri ennen käyttöä (< 2 h ennen real-time RT-PCR -levyn ajon aloittamista).
- Kontaminaation välttämiseksi näytteen ja real-time RT-PCR:n valmistelut tulee tehdä eri alueilla.

Toimenpide

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

1. Hengitystienäytteet (nenä-, suunielu- ja nenänielunäytepuikot):
 - 1a. Vorteksoi näytteen sisältävää näytepuikkoa voimakkaasti.
 - 1b. Jaa 50–200 µl näytettä alikvooteiksi 1,5 ml:n ei-PCR-putkiin.
 - 1c. Lämmitä laattalämmittimellä 70 °C:ssa 10 minuuttia.
 - 1d. Jäähdytä näytteitä jäällä ainakin 5 minuuttia ja pidä näytteet sitten jäissä tai 4 °C:ssa.
2. Sylkinäytteet:
 - 2a. Nesteytys (pipetoinnin helpottamiseksi): kuumenna sylkinäytettä 95 °C:ssa 15 min (määrittelemätön määrä, astia ja lämmityslaite).
 - 2b. Homogenoi näyte pipetoimalla varovasti ylös ja alas 8–10 kertaa.
 - 2c. Tee 50 µl:sta näytettä alikvootti 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.

- 2d. Lämmitä laattalämmittimellä 95 °C:ssa 15 minuuttia ja pidä sitten näytettä huoneenlämmössä ainakin 5 min ennen PCR-kuoppaan tai -putkeen lisäämistä.
3. Valmistele ensimmäisellä käyttökerralla SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri ROX Reference Dye -viitevärillä.
- 3a. Lisää 32,8 µl ROX-väriä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -putkeen.
- 3b. Sulje SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskurin ja ROX-värin sisältävän putken korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa.
- 3c. Pyöräytä ROX-värin sisältävä SARS-CoV-2 UM Amp Buffer -puskuri putken pohjalle.
4. Valmistele täyttä QuantStudio 5 Dx -levyä (96 kuoppaa) varten SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäisen kontrollin alikvoottiseos.
- 4a. Siirrä vaadittu määrä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita ja SARS-CoV-2 Internal Control -sisäistä kontrollia taulukon 14 mukaan uuteen 1,5 ml:n ei-PCR-putkeen.
- 4b. Sulje korkki ja käännä putki ylösalaisin kolme kertaa tai pulssivorteksoi putkea 3–5 sekuntia.
- 4c. Pyöräytä sisäisen kontrollin sisältäviä SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeita, jotta liuos laskeutuu putken pohjalle.

Taulukko 14. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC -seoksen valmistelu

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

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

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

Taulukko 15. Reaktioseoksen valmistelu

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

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

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

Huomautus: määritä **Properties** (Ominaisuudet) -välilehdessä **Experiment type** (Koetyyppi) -asetukseksi **Standard Curve** (Standardikäyrä) ja **Run mode** (Ajojila) -asetukseksi **Standard** (Vakio).

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

Huomautus: tiedonkeruu tulee tehdä kiinnittymis-/jatkovaiheen aikana.

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

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

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

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

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

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

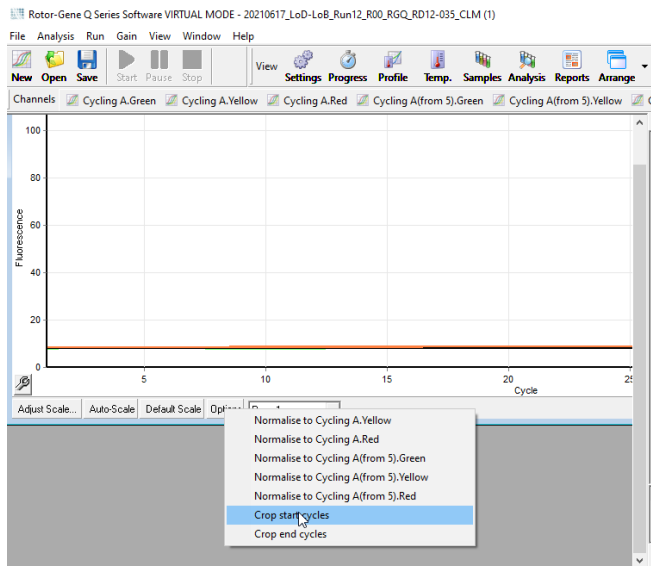
Kuva 6. Esimerkki levyn asettelusta QuantStudio 5 Dx -laitteessa

Tulokset

Analyysi RGQ MDx 5plex HRM -laitteella

RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa tiedot analysoidaan Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3.1 (tai uudemman) avulla valmistajan ohjeiden mukaan (Rotor-Gene Q MDx -käyttöopas, versio 7, syyskuu 2018).

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



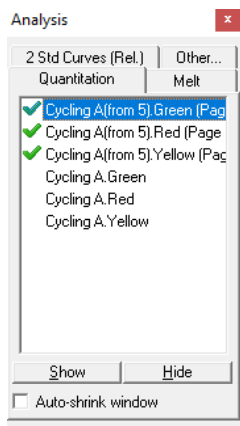
Kuva 7. Näyttökuva rajattujen syklien määrittämisestä RGQ MDx 5plex HRM -ajojen analysointiin

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

Taulukko 17. RGQ MDx 5plex HRM -laitteen testiparametrit

| Kanavat | Green | Red | Yellow |
|--------------------------------|------------------------------------|-------|------------------------------------|
| Fluoresenssikynnys | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| Kulmakertoimen korjaus | Kyllä | Kyllä | Kyllä |
| Dynaaminen putki | Kyllä | Kyllä | Kyllä |
| Mittauspiste | Ei | 10-20 | 10-20 |
| Poikkeavan arvon poisto | Kyllä | Ei | Ei |
| Reaktion tehokkuuden kynnsarvo | Käytössä: 0 % | | |
| Rajatut aloitusysklit | 5 | 5 | 5 |
| Katkaistut syklit | Ct > 38,00 tulkitaan arvoksi 40,00 | Ei | Ct > 35,00 tulkitaan arvoksi 40,00 |

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



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

Analyysi ABI 7500 Fast Dx -laitteella

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

Taulukko 18. ABI 7500 Fast Dx -laitteen testiparametrit

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

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

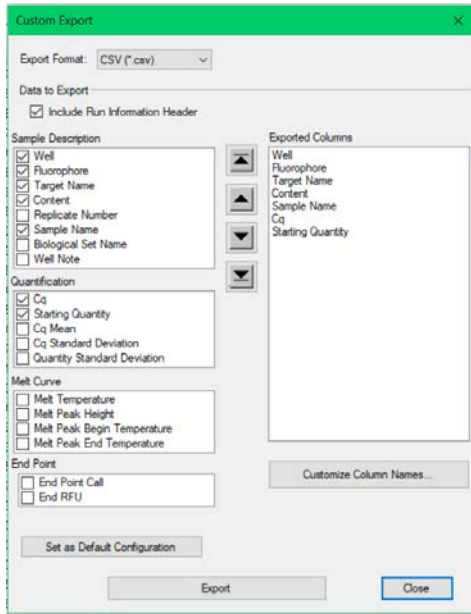
Analyysi CFX96 Dx -laitteella

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

Taulukko 19. CFX96 Dx -laitteen testiparametrit

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

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



Kuva 9. Raakadatatieoston parametrit CFX96 Dx -laitteessa

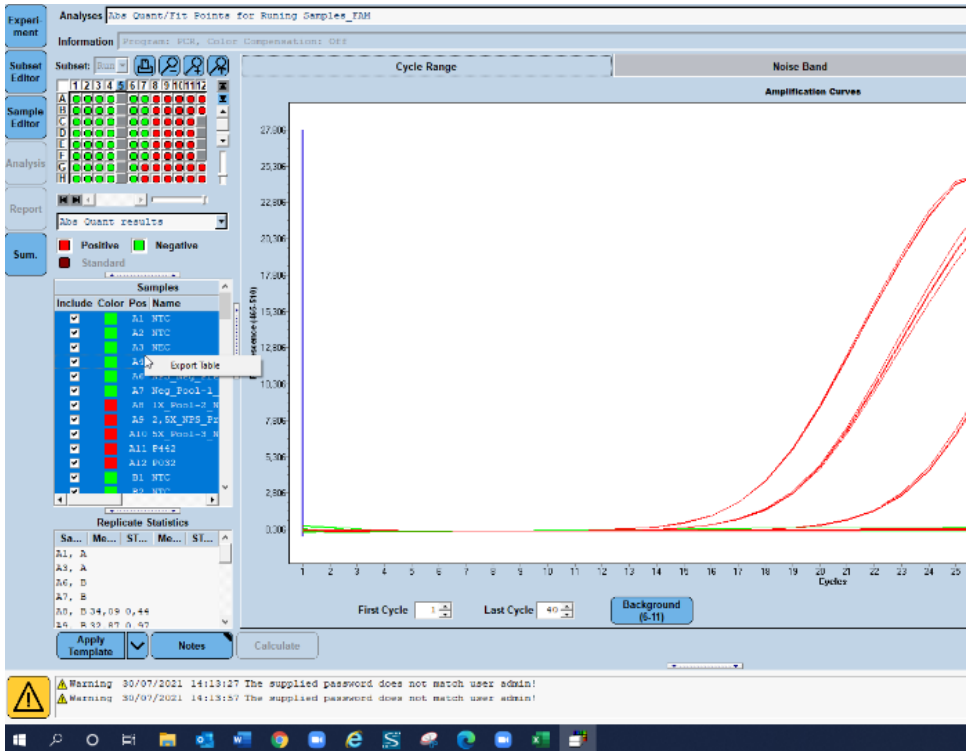
Analyysi cobas z 480 -laitteella

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

Taulukko 20. cobas z 480 -laitteen testiparametrit

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

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



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

Analyysi QuantStudio 5 Dx -laitteella

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

Taulukko 21. QuantStudio 5 Dx -laitteen testiparametrit

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

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

Tulosten tulkitseminen

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

Näytteenoton kontrolli, joka koostuu RNAasi P:stä, havaitaan Yellow-fluoresenssikanavassa RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa tai VIC/HEX-fluoresenssikanavassa ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteessa. Jokaisessa kliinisessä näytteessä pitäisi näkyä näytteen kontrollin monistuminen. Positiivisessa kontrollissa monistuminen Yellow-kanavassa voi näkyä, vaikka ihmisperäisiä sekvenssejä ei olisi. Tässä tapauksessa positiivisen kontrollin signaali Yellow-kanavassa voidaan jättää huomiotta, koska Green-kanavan vahva fluoresenssisignaali voi vuotaa Yellow-kanavaan. Sisäinen kontrolli (Internal Control, IC) sisältyy SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeisiin. Se havaitaan mallittomassa kontrollissa (No Template Control, NTC), eristämättömyyskontrollissa (No Extraction Control, NEC), positiivisessa kontrollissa (Positive Control, PC) ja kliinisissä näytteissä Red-fluoresenssikanavassa RGQ MDx 5plex HRM -laitteessa tai Cy5/ATTO647N-fluoresenssikanavassa ABI 7500 Fast Dx-, CFX96 Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteessa. Jotta ajo real-time RT-PCR -menetelmällä on hyväksyttävä, PC-, NTC- ja NEC-kontrollien tulosten on oltava kuten taulukossa 22 ja taulukossa 23.

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

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

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

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

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

Taulukko 24. Näytteen kelvollisuuden kriteerit ja tulosten tulkitseminen RGQ MDx 5plex HRM -laitteella

| Havainto Green-kanavalla | Havainto Yellow-kanavalla | Havainto Red-kanavalla | Tulkinta |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|--|
| Ct ≤ 38,00 | Merkityksetön | Merkityksetön | Näyte on positiivinen SARS-CoV-2:n RNA:lle. |
| Ct > 38,00 tai ei Ct:tä | Ct ≤ 35,00 | Merkityksetön | Näyte on negatiivinen, SARS-CoV-2:n RNA:ta ei havaittu. |
| Ct > 38,00 tai ei Ct:tä | Ct > 35,00 tai ei Ct:tä | Kyllä | Virheellinen näyte. Ihmisperäistä ainesta ei havaittu, tai sitä on liian vähän. Näyte on otettava uudelleen. |
| Ct > 38,00 tai ei Ct:tä | Ct > 35,00 tai ei Ct:tä | Ei | Virheellinen näyte. Real-time RT-PCR -reaktio on estynyt. Testi on tehtävä uudelleen. |

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

| Havainto FAM-värissä* | Havainto VIC/HEX-värissä* | Havainto Cy5/ATTO647N-värissä* | Tulkinta |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------------|---|
| Ct ≤ 39,00 | Merkityksetön | Merkityksetön | Näyte on positiivinen. |
| Ct > 39,00 tai ei Ct:tä | Ct ≤ 35,00 | Merkityksetön | Näyte on negatiivinen, SARS-CoV-2:ta ei havaittu. |
| Ct > 39,00 tai ei Ct:tä | Ct > 35,00 tai ei Ct:tä | Kyllä | Virheellinen näyte. Ihmisperäistä ainesta ei havaittu. Näyte on otettava uudelleen. |
| Ct > 39,00 tai ei Ct:tä | Ct > 35,00 tai ei Ct:tä | Ei | Virheellinen näyte. Real-time RT-PCR -reaktio on estynyt. Testi on tehtävä uudelleen. |

Rajoitukset

- Vain *in vitro* -diagnostiikkaan.
- *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan tuloksia ei ole tarkoitettu käytettäväksi ainoana perusteena diagnoosille, hoidolle tai muille potilaan hoitopäätöksille. Negatiiviset tulokset eivät sulje pois SARS-CoV-2-infektiota, eikä niitä saa käyttää potilasta koskevien hoitopäätösten ainoana perusteena.
- Tätä tuotetta saavat käyttää ainoastaan henkilöt, jotka ovat saaneet erityisopastuksen ja -koulutuksen *in vitro* -diagnostisiin toimenpiteisiin.
- Hyvät PCR-tulokset edellyttävät real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävän alustan käyttöoppaan (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ja QuantStudio 5 Dx) tarkkaa noudattamista.
- Kaikkien komponenttien pakkauksiin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.
- Tämän testin toimivuutta sellaisten potilaiden sylkinäytteillä, joilla ei ole hengitystieinfektion merkkejä tai oireita, ei ole määritetty.
- Virheellisesti negatiivisen tuloksen riskin välttämiseksi on kirjattava ylös, jos heikosti positiivista kliinistä näytettä testataan ja putkessa havaitaan verijäämiä, ja jos näytteestä saadaan negatiivinen tulos *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjalla, potilaalta on otettava uusi näyte uutta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -testiä varten.

Suorituskyky

Analyttinen herkkyys (havaitsemiss raja)

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

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

Nenä-, suunielu- ja nenänielunäytteet

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

Puhtaat sylkinäytteet

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

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

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

Analyttisen spesifisyyden tutkimukset (inklusiivisuus ja eksklusiivisuus/ristireaktiviteetti)

Inklusiivisuus

artus SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja Probes-koetinten inklusiivisuus arvioitiin GISAIID-tietokannassa (www.gisaid.org) saatavilla olevien sekvenssien *in silico* -analyysin avulla. Yhteensä 722 488 sekvenssiä (saatavilla 23/03/2021) analysoitiin COVID CG -työkälulla (<https://covidcg.org>), ja analyysissä käytettiin GISAIID-metatietoja. Sekvenssit sovitettiin WIV04-viitesekvenssiin (100-prosenttisesti identtinen Wuhan-Hu-1/NC_045512.2 -sekvenssin kanssa poly-A-häntää lukuun ottamatta) ja yksittäiset nukleotidivariaatiot (Single Nucleotide Variation, SNV) analysoitiin genomisella alueella, jonka kohteet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan alukkeet ja koettimet määrittivät. Tunnistettujen SNV-variaatioiden esiintyvyys pysyi alle 1 %:n, samoin kuin yhtäaikaisten mutaatioiden esiintymistiheys. SNV-variaatioita ei havaittu vähintään 1–3 nukleotidin alueella kyseisten oligonukleotidien 3'-päästä, minkä olisi odotettu vaikuttavan tulokseen. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjaa pidetään kyvykkäänä havaitsemaan 100 % julkaistuista sekvensseistä.

Eksklusiivisuus/ristireaktiivisuus

In silico -analyysi

artus SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden ja Probes -koetinten eksklusiivisuus arvioitiin NCBI-tietokantaan tallennettujen sekvenssien *in silico* -analyysin avulla. *In silico* -analyysi osoitti, että joidenkin testattujen patogeenien homologisuus on yli 80 % jonkin artus SARS-CoV-2 -alukkeen tai -koettimen kanssa. Tällaisia patogeenejä ovat mm. *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* ja *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin homologisuus oli alle 80 % yhden SARS-CoV-2-määrittymisen alukkeen/koettimen kanssa. Kuitenkaan artus SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeet ja Probes -koettimet eivät osoittaneet mahdollista monistumista NCBI nr/nt -tietokantaan tallennettujen erilaisten sekvenssien kanssa.

Yhteensä 36 bakteeri-, virus- ja sienikantaa (taulukko 27) analysoitiin *in silico* -PCR-menetelmällä, kun rajoitettu mahdollinen amplikonikoko oli 500 bp. Patogeenisekvenssit koottiin NCBI-tietokannasta, mutta mikään näistä patogeeneistä ei osoittanut monistumista *in silico*. Taulukossa 27 esitetään luettelo *in silico* -testatuista patogeeneistä.

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

| Patogeenit | Kanta/tyyppi | Taksonominen tunnus | <i>In silico</i> -PCR-tulokset |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|--------------------------------|
| Adenovirus 3 | Tyyppi 3 | 45659 | Ei vastaavuutta |
| Adenovirus 4 | Tyyppi 4 | 28280 | Ei vastaavuutta |
| Adenovirus 5 | Tyyppi 5 | 28285 | Ei vastaavuutta |
| Adenovirus 7A | Tyyppi 7A | 85755 | Ei vastaavuutta |
| Adenovirus 14 | Tyyppi 14 | 10521 | Ei vastaavuutta |
| Adenovirus 31 | Tyyppi 31 | 10529 | Ei vastaavuutta |
| <i>Bordetella pertussis</i> | A639 | 520 | Ei vastaavuutta |
| <i>Candida albicans</i> | Z006 SC5314 | 5476 | Ei mahdollista monistumista*† |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | CWL-029 TW-183 | 115713 | Ei vastaavuutta |
| Enterovirus | Tyyppi 68 | 42789 | Ei vastaavuutta |

* Sekvenssivastaavuus yhden alukkeen/koettimen kanssa osoitti < 80 %:n homologisuuden.

† Sekvenssivastaavuus yhden alukkeen/koettimen kanssa osoitti ≥ 80 %:n homologisuuden.

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 27. (jatkuu edelliseltä sivulta)

| Patogeenit | Kanta/tyyppi | Taksonominen tunnus | <i>In silico</i> -PCR-tulokset |
|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------------|
| <i>Haemophilus influenzae</i> | KW20 | 727 | Ei vastaavuutta |
| Ihmisen koronavirus | 229E | 11137 | Ei vastaavuutta |
| Ihmisen koronavirus | NL63 | 277944 | Ei vastaavuutta |
| Ihmisen koronavirus | HKU-1 | 290028 | Ei vastaavuutta |
| Ihmisen koronavirus OC43 | OC43 | 31631 | Ei vastaavuutta |
| Ihmisen koronavirus | MERS-CoV | 1335626 | Ei vastaavuutta |
| Ihmisen metapneumovirus | - | 162145 | Ei vastaavuutta |
| Influenssa A | H1N1 | 114727 | Ei vastaavuutta |
| Influenssa A | H3N2 | 119210 | Ei vastaavuutta |
| Influenssa B | - | 11520 | Ei vastaavuutta |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | M129 FH | 272634 | Ei vastaavuutta |
| Parainfluenssavirus | Tyyppi 1 | 12730 | Ei vastaavuutta |
| Parainfluenssavirus | Tyyppi 2 | 2560525 | Ei vastaavuutta |
| Parainfluenssavirus | Tyyppi 3 | 11216 | Ei vastaavuutta |
| Parainfluenssavirus | Tyyppi 4 | 2560526 | Ei vastaavuutta |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> | RU7 | 42068 | Ei vastaavuutta |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | PAO1 | 287 | Ei mahdollista monistumista* |
| Respiratorinen syntyiaalivirus | Tyyppi A (RSV-A) | 208893 | Ei vastaavuutta |
| Respiratorinen syntyiaalivirus | Tyyppi B (RSV-B) | 208895 | Ei vastaavuutta |
| Rinovirus | Tyyppi A | 147711 | Ei vastaavuutta |
| Rinovirus | Tyyppi B | 147712 | Ei vastaavuutta |
| SARS-koronavirus | Tor2 | 694009 | Ei mahdollista monistumista† |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | - | 1282 | Ei vastaavuutta |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | - | 1314 | Ei mahdollista monistumista† |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3 | 1304 | Ei mahdollista monistumista† |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ATCC 700669 NCTC11032 | 1313 | Ei vastaavuutta |

* Sekvenssivastaavuus yhden alukkeen/koettimen kanssa osoitti < 80 %:n homologisuuden.

† Sekvenssivastaavuus yhden alukkeen/koettimen kanssa osoitti ≥ 80 %:n homologisuuden.

In vitro -analyysi

Ristireaktiivisuus vahvistettiin *in vitro* patogeeneille, joiden homologisuus SARS-CoV-2 Amp Primers -alukkeiden kanssa oli ollut $\geq 80\%$ *in silico* -analyysissä. Näytteet valmisteltiin lisäämällä mahdollisesti ristireaktiivisia organismeja nenänielunäytepuikkomatriisiin pitoisuudella 10^6 cp/ml, lukuun ottamatta SARS-CoV-1-virusta, joka testattiin laimentamattomana toimittajan suositusten mukaisesti. Mikään näistä patogeeneistä ei osoittanut *in vitro* -ristireaktiivisuutta.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -määrityksen mikrobiaalinen häiriönkesto testattiin *in vitro* suositelluista patogeeneistä muodostetulla paneelilla (taulukko 28). Näytteet valmisteltiin lisäämällä enintään 5 patogeeniä – viruskohteet pitoisuudella 105 TCID50/ml, bakteeri- ja sienikohteet pitoisuudella 10^6 cp/ml tai varastopitoisuuden mukaisella mahdollisimman korkealla pitoisuudella – negatiivisiin nenänielunäytepuikkonäytteisiin, joihin oli lisätty 2,87 x LoD inaktivoituja SARS-CoV-2-partikkeleita (Zeptomatrix). NATrol™-paneelit ja SARS-CoV-1 lisättiin suoraan yhdessä inaktivoitujen SARS-CoV-2-viruspartikkelien (Zeptomatrix) kanssa pitoisuudella 2,87 x LoD. Alla on yhteenveto kaikista testatuista mikro-organisimiyhdistelmistä ja niiden pitoisuuksista.

Taulukossa 28 on luettelo mikrobiaalisen häiriön tutkimuksessa testatuista patogeeneistä.

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

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

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 28 (jatkuu edelliseltä sivulta)

| Yhdistelmän tunnus / näytetunnus | Mikro-organismi | Lähde | Lopullinen pitoisuus | Yksikkö | Tulos |
|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------|-----------|-------------|
| Yhdistelmä 2 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,72E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| | Adenovirus T31 | Zeptomatrix (0810073CFHI) | 1,67E+04 | TCID50/ml | |
| | Parainfluenssavirus 2 | Zeptomatrix (0810015CFHI) | 4,29E+04 | TCID50/ml | |
| | Influenssa B Florida/02/2006 | Zeptomatrix (0810037CFHI) | 1,43E+05 | TCID50/ml | |
| | Rinovirus T 1A | Zeptomatrix (0810012CFNHI) | 2,86E+04 | TCID50/ml | |
| Yhdistelmä 3 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,72E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| | Parainfluenssavirus T3 | Zeptomatrix (0810016CFHI) | 1,43E+07 | TCID50/ml | |
| | <i>Haemophilus influenzae</i> | ATCC (51907D-5) | 1,00E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ATCC (700669DQ) | 3,30E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Candida albicans</i> | Zeptomatrix (0801504DNA) | 1,00E+06 | CFU/ml | |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | ATCC (12228DQ) | 4,60E+06 | CFU/ml | |
| Yhdistelmä 4 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| | Adenovirus T7A | Zeptomatrix (0810021CFHI) | 1,02E+06 | TCID50/ml | |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | ATCC (700294DQ) | 1,00E+07 | CFU/ml | |
| | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | Zeptomatrix (0801579DNA) | 1,00E+08 | CFU/ml | |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC (47085DQ) | 1,00E+07 | CFU/ml | |
| Yhdistelmä 5 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,72E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| | Respiratorinen synsytiaalivirus RSA | Zeptomatrix (0810482CFHI) | 7,14E+04 | TCID50/ml | |
| | Influenssa A H1N1 Kalifornia | Zeptomatrix (0810165CFHI) | 1,43E+04 | TCID50/ml | |
| | Enterovirus, tyyppi 68 pääryhmä | Zeptomatrix (0810300CFHI) | 1,43E+05 | TCID50/ml | |
| | Adenovirus T14 | Zeptomatrix (0810108CFHI) | 2,86E+04 | TCID50/ml | |

(jatkuu seuraavalla sivulla)

Taulukko 28 (jatkuu edelliseltä sivulta)

| Yhdistelmän tunnus / näytetunnus | Mikro-organismi | Lähde | Lopullinen pitoisuus | Yksikkö | Tulos |
|--|--|---------------------------------|----------------------|-----------|-------------|
| Yhdistelmä 6 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| | MERS-koronavirus | Zeptomatrix (0810575CFHI) | 1,43E+04 | TCID50/ml | |
| | Adenovirus T4 | Zeptomatrix (0810070CFHI) | 1,43E+05 | TCID50/ml | |
| | Ihmisen metapneumovirus (hMPV) B | Zeptomatrix (0810156CFHI) | 7,14E+03 | TCID50/ml | |
| | Respiratorinen synsytiaalivirus tyyppi B (RSV-B) | Zeptomatrix (0810040CFHI) | 1,43E+03 | TCID50/ml | |
| Yhdistelmä 7 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| | Adenovirus T5 | Zeptomatrix (0810020CFHI) | 6,43E+05 | TCID50/ml | |
| | Parainfluenssavirus 4B | Zeptomatrix (0810060BCFHI) | 7,14E+04 | TCID50/ml | |
| | Influenssa A H3N2 Sveitsi/9715293/13 | Zeptomatrix (0810511CFHI) | 2,86E+04 | TCID50/ml | |
| | <i>Streptococcus salivarius</i> | Zeptomatrix (BAA-1024D-5) | 1,00E+06 | CFU/ml | |
| Yhdistelmä 8 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| NATrol-paneeli RP1 (influenssa A H3N2 (Brisbane/10/07), influenssa A H1N1 (NY/02/2009), rinovirus (tyyppi 1A), adenovirus T3, parainfluenssa T1, parainfluenssavirus T4, metapneumovirus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), coxsackievirus (tyyppi A1) | Zeptomatrix (MDZ001) | Tuntematon * | – | | |

| Yhdistelmän tunnus / näytetunnus | Mikro-organismi | Lähde | Lopullinen pitoisuus | Yksikkö | Tulos |
|----------------------------------|---|---------------------------------|----------------------|---------|-------------|
| Yhdistelmä 9 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| | NATrol-paneeli RP2 (influenssa A H1 (Uusi-Kaledonia/20/99), influenssa B (Florida/02/06), RSV-A, parainfluenssa T2, parainfluenssa T3, HKU-rekombinantti koronavirus, koronavirukset (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639) | Zeptomatrix (MDZ001) | Tuntematon * | - | |
| Yhdistelmä 10 | SARS-CoV-2 | Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC) | 2,73E+03 | cp/ml | Ei häiriötä |
| | SARS-CoV-1 | Zeptomatrix (NATSARS-ST) | Tuntematon * | - | |

* Toimittaja ei ilmoittanut pitoisuutta.

Häiritsevät aineet

Nenä-, suunielu- ja nenänielunäytteet

Luultujen häiritsevien aineiden (taulukossa 29 mainitut aineet) vaikutus *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskykyyn arvioitiin. Testit suoritettiin 3 yhdistelmässä negatiivisia nenänielunäytepuikkonäytteitä ja 3 yhdistelmässä positiivisia nenänielunäytepuikkonäytteitä, joihin oli lisätty 4 x LoD inaktivoituja SARS-CoV-2-viruspartikkeleita (Zeptomatrix). Tutkimuksissa käytettiin RGQ MDx 5plex HRM -alustaa (4 eri laitetta), joita käytti 1 käyttäjä 1 pilottisarjan avulla.

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

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

Taulukko 29. Luettelo häiritsevästä aineista ja Green-kanavan osumatarkkuuksista.

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

* Artefaktia vastaava monistuminen havaittiin.

Puhtaat sylkinäytteet

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

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

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

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

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

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

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

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

Näytteen stabiiliustutkimus

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

Nenä-, suunielu- ja nenänielunäytteet:

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

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

Taulukossa 31 esitetään nenänielunäytteiden stabiiliusolosuhteet.

Taulukko 31. Nenänielunäytteiden stabiiliusolosuhteet.

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

Puhtaat sylkinäytteet

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

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

Taulukossa 32 esitetään puhtaiden sylkinäytteiden stabiiliusolosuhteet.

Taulukko 32. Puhtaiden sylkinäytteiden stabiiliusolosuhteet

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

Tarkkuus

Tarkkuustutkimuksessa arvioitiin uusittavuutta (sama näyte toistettiin eri ajoissa ja olosuhteissa: 5 päivänä, 3 eri erän sarjoilla, 3 käyttäjän toimesta ja 2 laitteella) ja toistettavuutta (sama näyte toistettiin samassa ajossa ja samoissa olosuhteissa). Testit tehtiin negatiivisille nenänielunäytteille ja negatiivisille nenänielunäytteille, joihin oli lisätty 5 x LoD, ja ajot tehtiin RGQ MDx -laitteella.

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

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

| Näytteet ja havainnointikanava | Yhteensä | Päivien välillä | Erien välillä | Käyttäjien välillä | Laitteiden välillä | Ajojen välillä | Ajon sisällä |
|---|----------------|-----------------|----------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|
| Keskihajonta (SD) (Variaatiokerroin [%CV]) | | | | | | | |
| Negatiivinen NPS Yellow-kanava | 0,54 (2,22) | 0,09 (0,37) | 0,10 (0,42) | 0,06 (0,27) | 0,11 (0,47) | 0,09 (0,36) | 0,50 (2,05) |
| Negatiivinen NPS Red-kanava | 1,15 (3,68) | 0,0 (0,00) | 0,55 (1,76) | 0,00 (0,00) | 0,12 (0,40) | 0,39 (1,26) | 0,92 (2,96) |
| Lisätty NPS Green-kanava | 0,63 (2,03) | 0,18 (0,59) | 0,31 (1,00) | 0,00 (0,00) | 0,08 (0,25) | 0,00 (0,00) | 0,51 (1,64) |
| Lisätty NPS Yellow-kanava | 0,47 (1,93) | 0,13 (0,53) | 0,24 (0,98) | 0,05 (0,20) | 0,18 (0,73) | 0,00 (0,00) | 0,33 (1,38) |
| Lisätty NPS Red-kanava | 1,28 (4,10) | 0,12 (0,37) | 0,58 (1,84) | 0,11 (0,34) | 0,00 (0,00) | 0,49 (1,57) | 1,02 (3,27) |

Kliininen suorituskyky

Nenänielunäytteet

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp -määrityksen kliininen suorituskyky arvioitiin käyttämällä kuljetusaineeseen säilöttyjä, puikolla otettuja retrospektiivisiä nenänielunäytteitä, joihin kuului 150 kliinistä näytettä.

Kaikki näytteet kerättiin potilailta, joilla oli COVID-19-infektion merkkejä ja oireita. Näytteitä säilytettiin jäädytettynä käyttöön asti.

Kliininen kelpoisuus testattiin ABI 7500 Fast Dx -laitteella. Taulukossa 34 on tiedot artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskyvystä verrattuna vertailumenetelmään.

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

| Näytteen tila | N | Positiivisten prosenttiosuus | 95 %:n CI | Negatiivisten prosenttiosuus | 95 %:n CI |
|---------------|----|------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|
| Positiivinen | 52 | 98,1 (51/52) | 89,9–99,7 | 1,9 (1/52) | – |
| Negatiivinen | 98 | 5,1 (5/98) | – | 94,9 (93/98) | 88,7–97,8 |

Ristiriitaiset tulokset arvioitiin kolmannella menetelmällä ja analysoitiin uudelleen yhtäpitävyystaulukon avulla. Yleiset kliinisen suorituskyvyn tulokset on ilmoitettu positiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Positive Percent Agreement, PPA) ja negatiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Negative Percent Agreement, NPA) ja ne ovat nähtävissä taulukossa 35.

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

| Näytteen tila | N | Positiivisten prosenttiosuus | 95 %:n CI | Negatiivisten prosenttiosuus | 95 %:n CI |
|---------------|----|------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|
| Positiivinen | 52 | 98,1 (51/52) | 89,9–99,7 | 1,9 (1/52) | – |
| Negatiivinen | 98 | 5,1 (5/98) | – | 94,9 (93/98) | 88,7–97,8 |

Alla on lueteltu näyteosuuksien positiiviset ja negatiiviset prosentuaaliset yhtäpitävyydet (Positive Percent Agreement, PPA, ja Negative Percent Agreement, NPA) sekä odotetut näytteiden tilat:

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

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

Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

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

Nenänielunäytepuikot, mukaan lukien oireettomat henkilöt

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

Kaikki näytteet kerättiin potilailta, joilla ei ollut COVID-19-infektion oireita tai muita syitä epäillä tartuntaa.

Kliininen kelpoisuus testattiin ABI 7500 Fast Dx -laitteella. 16 näytettä jätettiin analyysin ulkopuolelle *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan testauksen jälkeen, sillä niiden tila oli kelvoton näytteen kelvollisuuskriteerien mukaan (taulukko 23).

Taulukossa 36 on tiedot *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit -sarjan suorituskyvystä verrattuna vertailumenetelmään, mikä on ilmaistu positiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Positive Percent Agreement, PPA) ja negatiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Negative Percent Agreement, NPA).

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

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

19 ristiriitaista tulosta arvioitiin kolmannella menetelmällä ja analysoitiin uudelleen yhtäpitävyystaulukon avulla. Yleiset kliinisen suorituskyvyn tulokset on ilmoitettu positiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Positive Percent Agreement, PPA) ja negatiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Negative Percent Agreement, NPA) ja ne ovat nähtävissä taulukossa 37.

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

| Näytteen tila | N | Positiivisten prosenttiosuus | 95 %:n CI | Negatiivisten prosenttiosuus | 95 %:n CI |
|---------------|-----|------------------------------|------------|------------------------------|-----------|
| Positiivinen | 32 | 100,0 (32/32) | 89,3–100,0 | 0 (0/32) | – |
| Negatiivinen | 105 | 0,95 (1/105) | – | 99,05 (104/105) | 94,8–99,8 |

18 virheellistä negatiivista näytettä luokiteltiin uudelleen oikeiksi negatiivisiksi, ja yksi virheellinen positiivinen pysyi virheellisenä positiivisena.

Alla on lueteltu näyteosuuksien positiiviset ja negatiiviset prosentuaaliset yhtäpitävyydet (Positive Percent Agreement, PPA, ja Negative Percent Agreement, NPA) sekä odotetut näytteiden tilat:

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

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

Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

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

Puhtaat sylkinäytteet

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

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

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

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

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

Kolme ristiriitaista tulosta arvioitiin kolmannella menetelmällä ja analysoitiin uudelleen yhtäpitävyystaulukon avulla. Yleiset kliinisen suorituskyvyn tulokset on ilmoitettu positiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Positive Percent Agreement, PPA) ja negatiivisena prosentuaalisena yhtäpitävyytenä (Negative Percent Agreement, NPA), ja ne ovat nähtävissä taulukossa 39.

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

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

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

Alla on lueteltu näyteosuuksien positiiviset ja negatiiviset prosentuaaliset yhtäpitävyydet (Positive Percent Agreement, PPA, ja Negative Percent Agreement, NPA) sekä odotetut näytteiden tilat:

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

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

Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys

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

Lähdeviitteet

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

Vianmääritysopas

Tämä vianmääritysopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustostamme usein kysytyjen kysymysten (Frequently Asked Questions, FAQ) osiosta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Positiivisen kontrollin (Positive Control, PC) Green-signaali (FAM) on heikko tai sitä ei ole

- | | |
|---|---|
| a) RT-PCR-tietojen analysointia varten valittu fluoresenssikanava ei ole yhdenmukainen protokollan kanssa. | Valitse tietojen analysointia varten fluoresenssikanava FAM (Green) RT-PCR-analyysin SARS-CoV-2-kohteille, fluoresenssikanava HEX/VIC/JOE (Yellow) näytteen kontrollille ja Cy5/Atto (Red) sisäiselle kontrollille. |
| b) Lämpötilaprofiilin virheellinen ohjelmointi. | Vertaa RT-PCR-ohjelmaa protokollaan. |
| c) PCR-reaktio on konfiguroitu väärin. | Vertaa työskentelyvaiheitasi pipetointijärjestykseen ja toista PCR tarvittaessa. |
| d) Tarvikesarjan yhden tai useamman komponentin säilytysolosuhteet eivät vastanneet ohjeita tai <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit -sarjan viimeinen käyttöpäivä on mennyt. | Noudata säilytysohjeita ja tarkista reagenssien viimeinen käyttöpäivä. Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |
| e) Real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävä alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa. | Käytä tässä oppaassa suositeltua, käyttämäsi real-time RT-PCR -tekniikan alustaa koskevaa konfiguraatiota. |
| f) PCR inhiboitui. | Vältä kontaminaatio noudattamalla hyviä molekyylibiologian laboratorioita koskevia käytäntöjä. Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. Noudata tässä oppaassa esitettyä protokollaa. Tarkista reagenssin viimeinen käyttöpäivä ja käytä tarvittaessa uutta sarjaa. Toista määrittäminen näytteellä. |

Vihreä signaali (FAM) mallittomassa kontrollissa tai eristämättömyyskontrollissa

SARS-CoV-2-sekvenssit ovat kontaminoituneet RT-PCR-levyn valmistelun aikana.

Toista RT-PCR uusilla reagensseilla. Vältä kontaminaatio noudattamalla hyviä molekyylibiologian laboratorioita koskevia käytäntöjä. Noudata tässä käsikirjassa esitettyä protokollaa. Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Sisäisen kontrollin Red-signaali (Cy5/Atto) on heikko tai sitä ei ole











- a) RT-PCR-reaktioon on päässyt häiritsevä aine. PCR on inhiboitu. Vältä kontaminaatio noudattamalla hyviä molekyylibiologian laboratorioita koskevia käytäntöjä. Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. Noudata tässä oppaassa esitettyä protokollaa. Toista koe uudella vasta kerätyllä näytteellä.
- b) Sisäinen kontrolli on heikentynyt. Vältä RNAasiin pääsy noudattamalla hyviä molekyylibiologian laboratorioita koskevia käytäntöjä. Noudata tässä oppaassa annettuja suosituksia. Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. Noudata säilytysohjeita ja tarkista reagenssien viimeinen käyttöpäivä. Käytä tarvittaessa uutta sarjaa.
- c) Real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävä alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa. Käytä tässä oppaassa suositeltua, käyttämäsi real-time RT-PCR -tekniikan alustaa koskevaa konfiguraatiota.

Näytteen kontrollin Yellow-signaali (VIC/HEX) on heikko tai sitä ei ole

- a) Kliininen näyte on heikentynyt. Noudata näytteenottolaitteen toimittajan antamia suosituksia säilytyksestä, käsittelystä ja kuljetuksesta. Noudata tässä oppaassa esitettyä protokollaa, mukaan lukien näytteen valmisteluvaiheet SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurilla. Noudata säilytysohjeita ja tarkista reagenssien, kuten SARS-CoV-2 UM Prep Buffer -puskurin, viimeinen käyttöpäivä. Käytä tarvittaessa uutta sarjaa.
- b) Näyte on otettu väärin. Näytepuikkoon ei ole saatu tai kuljetusaineeseen ei ole siirretty riittävästi ihmisoluja. Noudata näytteenottolaitteen toimittajan antamia suosituksia näytteenotosta ja näytteiden käsittelystä.
- c) Real-time RT-PCR -tekniikkaa hyödyntävä alusta on määritetty virheellisesti tietojen konfigurointivaiheessa. Käytä tässä oppaassa kuvattua, käyttämäsi real-time RT-PCR -tekniikan alustaa koskevaa konfiguraatiota.

Symbolit

Käyttöohjeessa tai pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

| Symboli | Selitys |
|---|--|
|  | Sisältää reagensseja, jotka riittävät 768 tai 3072 reaktioon |
|  | Viimeinen käyttöpäivämäärä |
|  | Diagnostinen in vitro -lääkintälaite |
|  | Tuotenumero |
|  | Eränumero |
|  | Komponentit |
|  | Sisältö |
|  | Numero |
|  | GTIN-numero |
| R_n | R tarkoittaa käyttöohjeiden versiota ja n on versionumero |
|  | Lämpötilarajoitus |

Symboli

Selitys



Valmistaja



Katso käyttöohjeet



Säilytettävä auringonvalolta suojattuna



Varoitus/huomio

Yhteystiedot

Teknistä tukea ja lisätietoja saa ottamalla yhteyttä QIAGENin tekniseen palveluun osoitteessa **support.qiagen.com**.

Tilastiedot

| Tuote | Sisältö | Tuotenro |
|---|--|----------|
| <i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768) | 768 reaktioon: valmistelupuskuri, ROX-väri, pääseos, alukkeet ja koettimet, sisäinen kontrolli, vesi (NTC) ja positiivinen kontrolli | 4511460 |
| <i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072) | 3072 reaktioon: valmistelupuskuri, ROX-väri, pääseos, alukkeet ja koettimet, sisäinen kontrolli, vesi (NTC) ja positiivinen kontrolli | 4511469 |
| Laitteet ja lisätarvikkeet | | |
| PCR tubes, 0.1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx | Käytettäväksi 72 kuoppaisessa roottorissa, Strip tubes and caps | 981103 |
| Rotor-Gene Q software | Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3.1 (tai uudempi) | |
| Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx | Real-time PCR -laite, jossa 5 kanavaa, HRM-analysaattori, ohjelmisto, kannettava tietokone ja lisätarvikkeet; 1 vuoden takuu osien rikkoutumisen ja asennus- ja valmistusvirheiden varalta | 9002032 |
| 72-Well Rotor | Strip Tubes and Caps, 0.1 ml -tuotteille, joiden reaktiilavuus on 10–50 µl | 9018903 |
| Locking Ring 72-Well Rotor | Strip Tubes and Caps 0.1 ml -liuskaputkien ja korkkien lukitsemiseen 72-Well Rotor-roottoriin | 9018904 |

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteessa www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

| Versio | Kuvaus |
|-------------------|--|
| R1, huhtikuu 2021 | Ensimmäinen versio. |
| R2, heinäkuu 2021 | Ilmoituksen jatko: Testi on tehty oireettomille henkilöille. Käyttötarkoitus päivitettiin sisältämään henkilöt, joilla ei ollut oireita tai muita syitä epäillä COVID-19-infektiota. Suorituskykytietoihin lisättiin osio Kliininen suorituskyky, mukaan lukien oireettomat henkilöt. |
| R3, syyskuu 2021 | Ilmoituksen jatko: <ol style="list-style-type: none">1. Lisätty testaus sylkinäytteiden avulla.2. Työnkulkua muokattu.3. Käytettäväksi kolmen muun alustan ja niihin liittyvien ohjelmistojen kanssa: CFX96 Dx ja CFX Manager Dx -ohjelmistoversio 3.1.3090.1022 (tai uudempi), cobas z 480 ja LightCycler 480 SW UDF -versio 2.0.0 (tai uudempi) sekä QuantStudio 5 Dx ja QuantStudio 5 Dx IVD -ohjelmistoversio 1.0.1 (tai uudempi).4. Kolmen lisätyn alustan (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) havaitsemisrajat lisättiin nenänielu- ja suunielunäytteitä koskevaan suorituskykyosioon.5. Suorituskykyominaisuudet-osio on päivitetty.6. Vain fluoresenssikanavat (Green, Red ja Yellow) säilytettiin RGQ-laitteen kohdalla (sulkeissa olleet värien nimet poistettiin).7. Vain värien nimet säilytettiin CFX96 Dx-, ABI 7500 Fast Dx-, cobas z 480- ja QuantStudio 5 Dx -laitteiden kohdalla.8. ABI 7500 Fast Dx -laitteen kohdalla fluoresenssisuodattimet A/1, B/2 ja E/5 poistettiin. Vain värien nimet säilytettiin (FAM, VIC ja Cy5).9. Muutoksia taulukoihin 34–37 Kliininen suorituskyky-osiossa esityksen selventämiseksi. |
| R4, tammikuu 2022 | Korjattu kirjoitusvirhe taulukossa 39. |

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

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

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä immateriaaliomaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN saattaa vedota tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kieltoihin tuomioistuimessa. QIAGEN perii kaikki tutkinta- ja oikeuskulut asianajajan palkkiot mukaan lukien, jotka aiheutuvat tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sen henkistä omaisuutta koskevien oikeuksien toimeenpanemisesta paneeliin ja/tai sen osien osalta.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Tavaramerkit: 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 tai sen tytäryhtiöt); Altoids[®] (Wm. Wrigley Jr. Company). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

01/2022 R4 HB-2850-004 © 2021 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com