

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (IVD)

Kvalitativ analys för användning på
realtids-RT-PCR-instrument

Bruksanvisning

USA: Endast för Rx



REF 12015534

SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos (1 st)

Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix (1 st)

Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard (2 st)

Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative (2 st)



Bio-Rad Laboratories, Inc.
4000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA USA 94547




















FRANCE, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette,

Översättningar

Produktdokument kan tillhandahållas på ytterligare språk på elektroniska medier.

Symbollexikon

 Europeisk överensstämmelse	 Tillverkare	 Behörig representant i Europeiska unionen
 Partinummer	 Används före	 För in vitro-diagnostik
 Temperaturgräns	 Katalognummer	 Se bruksanvisningen
 Antal tester	 För användning med	 Serienummer
Rx Only Endast receptbelagd användning	 Unik produktidentifiering	 Innehåller latex
 Endast för forskning	 Endast för engångsbruk	 Biohazard

Juridiska meddelanden

Ingen del av denna publikation får reproduceras eller överföras i någon form eller på något sätt, vare sig elektroniskt eller mekaniskt, inklusive fotokopiering, inspelning eller i något informationslager eller söksystem, utan skriftligt tillstånd från Bio-Rad Laboratories.

Bio-Rad förbehåller sig rätten att när som helst ändra sina produkter och tjänster. Denna bruksanvisning kan ändras utan föregående meddelande. Även om företaget arbetar för att garantera noggrannhet, tar Bio-Rad inget ansvar för fel eller för eventuella skador som uppstår på grund av hur den här informationen tillämpas och används.

BIO-RAD, HARD-SHELL och MICROSEAL är varumärken som tillhör Bio-Rad Laboratories, Inc. i vissa jurisdiktioner.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Hard-Shell-plattor omfattas av ett eller flera av följande USA-patent eller deras utländska motsvarigheter ägda av Eppendorf AG: Patentnummer i USA 7 347 977, 6 340 589 och 6 528 302.

Alla varumärken som används häri tillhör respektive ägare.

Denna produkt och/eller dess användning täcks av anspråk på patent i USA och/eller väntande patentansökningar i USA och andra länder som ägs eller licensieras av Bio-Rad Laboratories, Inc. Köp av produkten inkluderar en begränsad, icke-överförbar rättighet enligt sådan immateriell egendom för användning av produkten endast för intern forskning och diagnostik. Endast för covid-19-ändamål beviljar Bio-Rad rättigheterna för användning av produkten i kommersiell användning av något slag, inklusive men inte begränsat till tillverkning, kvalitetskontroll eller kommersiella tjänster, såsom kontraktstjänster eller avgifter för tjänster. Information om licens för sådan användning kan erhållas från Bio-Rad Laboratories. För alla ändamål utöver covid-19-testning är det köparens/slutanvändarens ansvar att förvärva ytterligare immateriella rättigheter som kan krävas.

Varningar och försiktighetsåtgärder om Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

För in vitro-diagnostik. För vårdpersonal.

Det här testkitet ska endast hanteras av kvalificerad personal som är utbildad i laboratorieprocedurer och som är bekant med de potentiella farorna. Använd lämpliga skyddskläder, handskar och ögon-/ansiktsskydd och hantera enligt nödvändig god laboratoriepraxis.

Personlig skyddsutrustning

Korrekt användning av handskar rekommenderas vid användning av komponenter och provplattor. Alla handskar med nedsatt skyddsförmåga ska kasseras och bytas ut. Tänk på kemikaliernas toxicitet och faktorer som exponeringstid, lagring och temperatur när du fattar beslut om att återanvända kemiskt exponerade handskar. Egenskaper till hjälp vid val av handskar för hantering av maskiner, analyser, oljor och rengöringsmedel:

- Butylhandskar är gjorda av syntetiskt gummi och skyddar mot peroxid, fluorvätesyra, starka baser, alkoholer, aldehyder och ketoner.
- Naturgummihandskar (latex) är bekväma att bära och har enastående draghållfasthet, elasticitet och temperaturbeständighet.
- Neoprenhandskar är gjorda av syntetiskt gummi och erbjuder bra smidighet, fingerfärdighet, hög densitet och rivhållfasthet. De skyddar mot alkoholer, organiska syror och alkalier.
- Nitrilhandskar är gjorda av en sampolymer och ger skydd mot klorerade lösningsmedel som trikloreten och tetrakloreten. De ger skydd när du arbetar med oljor, fetter, syror och kaustiska ämnen.

Innehållsförteckning

Översättningar	2
Symbollexikon	2
Juridiska meddelanden	2
Varningar och försiktighetsåtgärder om Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit	3
Personlig skyddsutrustning	3
Avsedd användning	6
Sammanfattning och princip	6
Arbetsflöde för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit	7
Reagenser och instrument	7
Material som medföljer	7
Material som behövs men inte medföljer	8
Allmänna försiktighetsåtgärder och varningar	9
Insamling, hantering och förvaring av prover	10
Användning av kontrollmaterial	10
Reagenshantering och lagring	11
Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit	11
Arbetsområden	11
Allmän hantering	11
Protokoll för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit	12
Översikt	12
Extraktion av nukleinsyra	12
Beredning av enstegs RT-PCR-reaktion	13
Inställning av Bio-Rad CFX96 Dx-instrumentet	13
Köra RT-PCR-plattan på CFX96 Dx realtids-PCR-systemet	15
Dataanalys på CFX96 Dx realtids-PCR-system	16
Inställning av AB7500 Fast Dx-instrumentet	16
Dataanalys på AB7500 Fast Dx realtids-PCR-system	17
Tolkning av resultat	18
Kontroller för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit – NTC, positiva och negativa	18
Undersökning och tolkning av patientprovresultat	18
Begränsningar	20
Egenskaper för analytiska prestanda	21
Analytisk känslighet	21

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Inkludering	23
Analytisk specificitet (korsreaktivitet)	23
Klinisk utvärdering	26
Referenser	27
Bilaga A: Protokoll för kvalificering av instrument	28
Bilaga B: Studie av provekvivalens	30

Avsedd användning

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 Assay Kit för realtids-RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) är avsett för kvalitativ detektion av nukleinsyra från SARS-CoV-2 i prov från de övre luftvägarna, inklusive nasofaryngeala pinnprover, pinnprover från mitten av näsmussleregionen, orofaryngeala pinnprover och anteriärt nasala pinnprover från individer som av vårdgivaren misstänks ha covid-19. Resultaten är för identifiering av SARS-CoV-2-RNA, som i allmänhet kan detekteras i övre luftvägsprover under infektionens akuta fas. Positiva resultat indikerar närvaro av SARS-CoV-2-RNA, men klinisk korrelation med patienthistorik och annan diagnostisk information är nödvändig för att bestämma patientens infektionsstatus. Positiva resultat utesluter inte bakterieinfektion eller saminfektion med andra virus. Negativa resultat utesluter inte SARS-CoV-2-infektion och ska inte användas som enda grund för beslut om patienthantering. Negativa resultat måste kombineras med kliniska observationer, patienthistorik och epidemiologisk information.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit är avsett för användning av kvalificerad klinisk laboratoriepersonal som är särskilt utbildad och instruerad i RT-PCR-teknik och diagnostiska procedurer in vitro.

Sammanfattning och princip

Ett utbrott av lunginflammation som orsakades av ett nytt coronavirus (SARS-CoV-2) i staden Wuhan i Hubei-provinsen i Kina, identifierades och rapporterades till Världshälsoorganisationen (WHO) den 31 december 2019. Den snabba spridningen av SARS-CoV-2 till många områden över hela världen kräver beredskap och insatser i vården och på laboratorier. Tillgången på specifika och känsliga analyser för att upptäcka viruset är avgörande för korrekt diagnos, bedömning av utbrottets omfattning, övervakning av interventionsstrategier och bevakningsstudier.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit är ett molekylärt in vitro-diagnostiskt test som innehåller de reagenser som krävs för att utföra ett RT-PCR-test. Primer- och probuppsättningarna är utformade för att detektera RNA från SARS-CoV-2-viruset i prov från de övre luftvägarna, inklusive nasofaryngeala pinnprover, pinnprover från mitten av näsmussleregionen, orofaryngeala pinnprover eller anteriärt nasala pinnprover från patienter som misstänks ha covid-19. Ytterligare test- och bekräftelseförfaranden bör genomföras i samråd med folkhälsomyndigheten och/eller andra myndigheter till vilka rapportering krävs. Testresultat bör också rapporteras i enlighet med myndighetskrav. Prestanda är okända hos asymtomatiska patienter.

Oligonukleotidprimrarna och -proberna för detektion av SARS-CoV-2 är desamma som de som rapporterats av US Center for Disease Control and Prevention (CDC) och valdes från regioner i virusets nukleokapsidgen (N1 och N2). Panelen är utformad för specifik detektion av SARS-CoV-2 (två primer-/probuppsättningar). Ytterligare en primer-/probuppsättning för att detektera den humana *RP*-genen (RNase P) i kontrollprover och kliniska prover ingår också i panelen. För att utföra ett test isoleras och renas RNA från kontrollprover och kliniska prover, och tillsätts sedan i en masterblandning med Bio-Rad Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix. Masterblandningen inkluderar ett omvänt transkriptas som transkriberar RNA till cDNA och ett DNA-polymeras som amplifierar de cDNA-fragment som delar homologi med primer-/probuppsättningarna. Amplifiering av specifika mål övervakas av förändringen i fluorescensintensitet inom specifika excitations-/emissionsvåglängder med hjälp av ett realtids-PCR-instrument.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit kan användas med Bio-Rad CFX96 Dx och Thermo Fisher Scientific, Inc. Applied Biosystems 7500 Fast Dx realtids-PCR-system (Tabell 1). Arbetsflödet består av fyra steg (Tabell 2).

Tabell 1. Instrument som behövs

Katalognummer	Produktnamn	Programvara
12014330	CFX Opus 96 Dx	CFX Maestro Dx SE programvara v 2.0 och senare
1845097-IVD 1841000-IVD	CFX96 Dx ORM C1000 Dx termocykler	CFX Manager Dx programvara v 3.1 och senare
4406985 eller 4406984	Applied Biosystems 7500 Fast Dx realtids-PCR-system	SDS programvara v1.4.1 och senare

Arbetsflöde för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Tabell 2. Arbetsflöde för Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Arbetsflöde	
Steg 1	Isolering av viralt RNA från prov från övre luftvägarna, inklusive nasofaryngeala pinnprover, pinnprover från mitten av näsmusslere regionen, orofaryngeala pinnprover eller anteriärt nasala pinnprover
Steg 2	Plattinställning för RT-PCR
Steg 3	Enstegs omvänd transkription och PCR
Steg 4	Analys

Reagenser och instrument

Material som medföljer

Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit innehåller tillräckligt med reagens för att bearbeta totalt 200 reaktioner (Tabell 3).

Tabell 3. Material som behövs men som inte medföljer för körning på CFX Opus 96 Dx och CFX96 Dx realtids-PCR-system

Produktnamn	Referensnummer	Antal (rör)	Volym (µl)	Förvaringsförhållanden, °C
4x Reliance One-Step Multiplex Supermix	12010177	1	1000	-20 °C
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard	16008441	2	300	-20 °C
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative	16008440	2	300	-20 °C
SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos	12014116	1	300	-20 °C

Obs! Säkerhetsdatablad finns på bio-rad.com

Material som behövs men inte medföljer

Reagenser och förbrukningsvaror:

Reagenser för RNA-rening

Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (katalognr A48310, A42352) och QIAGEN QIAamp Viral Mini Kit (katalognr 52906, 52904) är validerade för användning med Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit enligt tillverkarens instruktioner.

Obs! Automatiserad extrahering (på QIAcube eller Kingfisher) med dessa paket stöds av tillverkarna och kräver validering.

Generiska reagenser och förbrukningsvaror för realtids-PCR

Fosfatbuffrad koksaltlösning, pH 7,4 (Thermo Fisher katalognr 10010023 eller motsvarande) krävs för beredning av kontrollerna. Ytterligare material som behövs men som inte medföljer för att köra Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit på Bio-Rad och Thermo Fisher Scientific realtids-PCR-system listas i Tabell 4 och Tabell 5.

Tabell 4. Material som behövs men som inte medföljer för körning på CFX Opus 96 Dx och CFX96 Dx realtids-PCR-system

Bio-Rad katalognr	Namn	Antal (vardera)	Förvaringsförhållanden
MSB1001	Microseal 'B' tätningsfilm för PCR-plattor, självhäftande, optisk	100	15 °C till 30 °C
HSP9955 eller motsvarande*	HSP9955, 96-brunnars PCR-plattor, hårt skal, låg profil, tunn vägg, med kjol, vit/vit	50	15 °C till 30 °C

* Se Bio-Rads broschyr 5496 om PCR-plattor med hårt skal för andra 96-brunnars PCR-plattor med färgat skal / vita brunnar

Tabell 5. Material som behövs men som inte medföljer för körning på AB7500 Fast Dx realtids-PCR-system

Thermo Fisher Scientific katalognr	Produktnamn	Antal (vardera)	Förvaringsförhållanden
4311971	MicroAmp optisk, självhäftande film	100	15 °C till 30 °C
4346906	MicroAmp snabb optisk 96-brunnars reaktionsplatta med streckkod, 0,1 ml	20	15 °C till 30 °C

Instrument, programvara och allmän laboratorieutrustning:

Allmän laboratorieutrustning som behövs men som inte medföljer för att köra Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit anges i Tabell 6.

Tabell 6. Allmän laboratorieutrustning som behövs men som inte medföljer

Beskrivning	Källa
Enkla och flerkanaliga justerbara pipetter (1,00 µl till 1 000 µl)	Rainin eller Eppendorf
Mikrocentrifug	Flera leverantörer
Microwell-plattcentrifug, med en rotor som rymmer mikroplattor av standardformat	Flera leverantörer
Laboratorieblandare, vortexblandare eller motsvarande	Flera leverantörer
Laboratoriefrysar <ul style="list-style-type: none">• -30 °C till -10 °C• ≤ -70 °C	Flera leverantörer
96-brunnars kallt block eller is	Flera leverantörer
Nonstick, RNase-fria mikrocentrifugrör (1,5 ml och 2,0 ml)	Flera leverantörer
Sterila pipettspetsar med aerosolbarriär (filtrerade)	Flera leverantörer

Allmänna försiktighetsåtgärder och varningar

1. Endast för in vitro-diagnostik (IVD).
2. Endast för professionellt bruk.
3. Positiva resultat indikerar närvaron av SARS-CoV-2-RNA.
4. Alla biologiska prover ska behandlas som om de kan överföra smittsamma ämnen. Använd säkra laborieprocedurer.
5. Rengör och desinficera alla arbetsytor noggrant med en nyligen beredd lösning av 0,5 % natriumhypoklorit (10 % blekmedel) i avjoniserat eller destillerat vatten följt av 70 % alkohol.
6. Minimera nukleinsyraförorening genom att rutinmässigt dekontaminera bänkutrymme, pipetter och utrustning samt separera prov- och RNA/DNA-hanteringsområdet från analysberedningsområdet.
7. Optimera arbetsflöde och utrymme för att minimera risken för överföringsförorening från slutförda PCR-reaktioner.
8. Se till att realtids-PCR-systemet och automatiseringssystemet har ett särskilt utrymme i separata områden för att undvika amplikonförorening.
9. Utför tillsats av masterblandning och tillsats av templat på olika platser med dedikerade pipetter.
10. Använd lämpliga laboratoriesäkerhetsrutiner för att arbeta med kemikalier och hantera prover.
11. Byt handskar ofta när du transporterar och arbetar med olika reagenser.
12. Underlåtenhet att följa procedurerna och villkoren som beskrivs i detta dokument kan orsaka felaktiga resultat och negativa effekter.
13. Ersätt inte reagenserna i Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit med andra reagenser.
14. Tillsats av masterblandning och templat måste utföras under RNase-/DNase-fria förhållanden.
15. Det rekommenderas att instrumenten verifieras på lämpligt sätt med etablerade testprotokoll före användning med Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit. Se instrumentets kvalificeringsprotokoll som beskrivs i bilaga A.
16. Se till att underhåll och kalibrering regelbundet utförs på all utrustning enligt tillverkarens rekommendationer.
17. Använd nukleasfria spetsar och reagenser och rengör pipetter regelbundet.
18. Se till att endast det rekommenderade termocyklerprotokollet används.
19. Använd inte DEPC-behandlat (dietylpyrokarbonat) vatten för PCR-amplifiering.

20. Följ procedurerna och riktlinjerna noga för att säkerställa att testet utförs korrekt. Varje avvikelse från procedurerna och riktlinjerna kan påverka optimala testprestanda.
21. Falskt positiva resultat kan uppstå om provöverföringen inte kontrolleras tillräckligt under provhantering och -behandling.

Insamling, hantering och förvaring av prover

Adekvat och lämplig insamling, lagring och transport av prover är viktigt för att få känsliga och korrekta testresultat. Utbildning i korrekta provinsamlingsförfaranden rekommenderas starkt för att säkerställa prover och resultat av god kvalitet. CLSI MM13-Ed2 (aug 2020) kan hänvisas till som en lämplig resurs.

1. Kriterier för godkända prover
 - Prover ska samlas in i sterila, märkta rör och transporteras enligt testlaboratoriets krav.
2. Kriterier för underkända prov
 - Prover som inte i förväg har godkänts för testning och de som är felaktigt märkta kommer inte att testas förrän erforderlig information erhålls
3. Samla in provet
 - Se CDC eller Världshälsoorganisationens (WHO) riktlinjer för insamling, hantering och testning av kliniska prover från personer för covid-19.
 - Följ tillverkarens instruktioner för korrekt användning av provinsamlingsenheter
 - Pinnprover bör endast samlas in med tops med syntetisk spets, som nylon eller Dacron®, och aluminium- eller plastpinne. Tops av kalciumalginat är oacceptabla och bomullstopp på träpinne rekommenderas inte. Placera pinnprover omedelbart i sterila rör som innehåller 2–3 ml viralt transportmedium eller universalt transportmedium
4. Transportera prover
 - Prover måste förpackas och transporteras enligt IATA:s (International Air Transport Association) aktuella version av Dangerous Goods Regulation. Följ fraktbestämmelser för UN 3373 Biological Substance, Category B när du skickar potentiella SARS-CoV-2-prover till testlaboratoriet
 - Förvara prover vid 2–8 °C och transportera över natten till testlaboratoriet på is. Om ett prov fryses vid -70 °C eller lägre ska det skickas över natten till testlaboratoriet på torris.
5. Förvara prover
 - Prover kan förvaras vid 2–8 °C i upp till 72 timmar efter insamling
 - Om extraktionen förväntas dröja kan proverna förvaras vid -70 °C eller lägre
 - Extraherad nukleinsyra bör förvaras vid 4 °C om den ska användas inom 4 timmar, eller -70 °C eller lägre om den lagras längre än 4 timmar

Användning av kontrollmaterial

Kontroller som ska användas med Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit:

- En kontroll utan templat (NTC) behövs för att detektera reagens- och/eller miljöföroreningar. En NTC använder RNase-/DNase-fritt vatten i stället för ett kliniskt prov med minst en brunn per reaktionsplatta.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

- En positiv kontroll behövs för att detektera betydande omvänt transkriptas- och/eller reagensfel, inklusive primer- och probintegritet. Testet använder Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard, som är tillverkad med syntetiska RNA-transkript som innehåller fem genmål: *E*-, *N*-, *ORF1ab*-, *RdRP*- och *S*-gener för SARS-CoV-2, vardera kvantifierade med 200 000 kopior/ml tillsammans med human genomisk DNA-bakgrund. Detta kontrollmaterial tillsätts i en provliknande matris för att uppnå en slutlig koncentration av 1 000 kopior/ml och nukleinsyran extraheras. En positiv kontroll måste inkluderas per batch extraherade prover, med minst en positiv kontrollbrunn per reaktionsplatta.
- En negativ kontroll behövs för att detektera fel i extraktionssteget eller reagens-/miljöförorening. Testet använder Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative Control, som tillverkas med humant genomiskt DNA och RNA. Detta kontrollmaterial tillsätts i en provliknande matris och nukleinsyran extraheras. En negativ kontroll måste inkluderas per batch extraherade prover, med minst en negativ kontrollbrunn per reaktionsplatta.

Reagenshantering och lagring

Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

- Kittet innehåller RT-PCR Supermix, Assay Oligos, Standard och Negative Control
- Förvaring vid -20 °C rekommenderas, med minimala frys- och upptiningscykler

Arbetsområden

Alla nödvändiga säkerhetsåtgärder bör vidtas enligt goda laboratorieriktlinjer. Försiktighetsåtgärder måste också vidtas för att förhindra korskontaminering av prover.

Separata arbetsytor bör användas för

- extraktion av nukleinsyra
- reagensberedning (till exempel beredning av masterblandning)
 - Inga amplifierade reaktioner, templatlösningar eller kliniska prover får föras in i reagensberedningsområdet. Efter att ha arbetat inom detta område ska laboratorierock och handskar bytas innan man flyttar över till området där nukleinsyra tillsätts
- nukleinsyratillsats
- instrumentering (till exempel termocykler).

Allmän hantering

Korrekt mikrobiologisk, aseptisk teknik bör alltid användas när man arbetar med RNA. Händer och dammpartiklar kan bära bakterier och mögel och är de vanligaste källorna till RNase-kontaminering. Använd alltid pulverfria latex-, vinyl- eller nitrilhandskar när du hanterar reagenser, rör och RNA-prover för att förhindra RNase-kontaminering från huden eller från laboratorieutrustning. Byt handskar ofta och håll rören stängda. Arbeta snabbt under proceduren och håll allt på kalla block när så är möjligt för att undvika nedbrytning av RNA av endogena eller kvarvarande RNase. Rengör arbetsytor, pipetter m.m. med 10 % blekmedel eller andra lösningar som kan förstöra nukleinsyror och RNase. Undvik en ökad nedbrytning av plast och metall genom att torka av med 70 % etanol efter användning av 10 % blekmedel. Se till att allt blekmedel avlägsnas för att undvika eventuella kemiska reaktioner mellan blekmedel och guanidintiocyanat, som finns i extraktionsreagenserna.

Protokoll för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Översikt

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit är avsett för kvalitativ detektion av RNA från SARS-CoV-2 i prov från de övre luftvägarna, inklusive nasofaryngeala pinnprover, pinnprover från mitten av näsmussleregionen, orofaryngeala pinnprover och anteriärt nasala pinnprover. Analysen detekterar två regioner av SARS-CoV-2-nukleokapsidgenen (*benämnd N1 och N2*) och en konstitutivt uttryckt human *RP*-gen, allt i en och samma reaktion. Detektion av viralt RNA bidrar inte bara till diagnostisering av sjukdom utan ger också epidemiologisk information och övervakningsinformation.

Testet består av två huvudsteg: (1) extraktion av RNA från patientprover och (2) enstegs omvänd transkription och amplifiering med polymeraskedjereaktion samt detektion av SARS-CoV-2-specifika *N1*- och *N2*-mål, som detekterar virusinfektion, och *RP*-analysen som detekterar human nukleinsyra i bakgrunden i patientprovet.

Beskrivning av teststeg

Nukleinsyror isoleras och renas från prover i övre luftvägarna med hjälp av Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit eller QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit, enligt tillverkarens instruktioner. De renade nukleinsyrorna transkriberas omvänt och amplifieras med hjälp av Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix. SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos innehåller en blandning av primrarna och proberna för SARS-CoV-2-mål (*N1* och *N2*) och den humana *RP*-genen för att möjliggöra multiplex detektion av målsekvenserna.

Extraktion av nukleinsyra

Prestandan för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit är beroende av mängden av och kvaliteten på templat-RNA som renas från humana prover. Följande kommersiella extraktionskit och procedurer har kvalificerats och validerats för extraktion och rening av RNA för användning med testet:

- Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (katalognr A48310, A42352)
- QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (katalognr 52906, 52904)

Följ tillverkarens rekommenderade procedurer för extraktion av prover. En positiv kontroll och en negativ kontroll måste ingå i varje extraktionsbatch.

Obs! Automatiserad extraktion (på QIAcube eller Kingfisher) med dessa kit stöds av tillverkarna och kräver validering

Beredning av kontroller

Positiv kontroll: Tillsätt 5 µl Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard i ett rör som innehåller 995 µl fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS). Behandla röret som ett patientprov och bearbeta för nukleinsyraextraktion tillsammans med andra prover enligt tillverkarens instruktioner.

Negativ kontroll: Tillsätt 5 µl Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative Control i ett rör som innehåller 995 µl PBS. Behandla röret som ett patientprov och bearbeta för nukleinsyraextraktion tillsammans med andra prover enligt tillverkarens instruktioner.

Beredning av enstegs RT-PCR-reaktion

1. Se till att extraherade RNA-prover tinas på is.

Obs! Kör inte RNA-prover i vortexblandare. RNA-prover kan blandas genom att snärta till rören, följt av kort centrifugering för att samla innehållet längst ner i rören.

2. Tina alla komponenter i kittet på is.
3. Blanda varje rör noggrant men kort med vortexblandare för att säkerställa homogenitet och pulscentrifugera sedan för att samla innehållet längst ner i varje rör
Obs! Reliance One-Step Multiplex Supermix är viskös. Det är viktigt att använda vortexblandare innan analysblandningen börjar beredas.
4. Förberedelse av RT-PCR-masterblandning:
 - a. Förbered en masterblandning efter antalet patientprover och kontroller som ska testas plus 10 % mer volym (Tabell 7) när mer än ett prov testas.
 - b. Kör masterblandningen i vortexblandare kort och pulscentrifugera för att samla innehållet i rörets botten.

Tabell 7. Komponentvolymerna för RT-PCR-masterblandning

Komponent	Volym för 1 prov (µl)	Volym för 96 prover (µl)	Volym för N prover (µl)
Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix	5,0	528	(5,0 x N) x 1,1
SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos	1,5	158	(1,5 x N) x 1,1
RNase-/DNase-fritt vatten	3,5	370	(3,5 x N) x 1,1
Volym per reaktion	10,0	1056	(10,0 x N) x 1,1

5. Dispensera 10 µl av masterblandningen i lämpliga brunnar i RT-PCR-plattan.
6. Tillsätt 10 µl RNase-/DNase-fritt vatten i en brunn för en NTC.
7. Tillsätt 10 µl negativt kontrollmaterial i en brunn för en negativ kontroll.
8. Tillsätt 10 µl positivt kontrollmaterial i en brunn för en positiv kontroll.
9. För de återstående brunnarna, tillsätt 10 µl extraherat RNA-prov per brunn.
10. Försegla plattan med Microseal 'B' tätningsfilm för PCR-plattor eller MicroAmp optisk, självhäftande film.
11. Kör plattan i vortexblandare i 30 sekunder i hög hastighet.
12. Centrifugera RT-PCR-reaktionsplattan i 30 sekunder vid 1000 RCF för att avlägsna eventuella luftbubblor och låt RT-PCR-reaktionen sedimentera till botten av brunnarna. Centrifugera plattan igen om det finns bubblor kvar.
13. Fortsätt med att ladda RT-PCR-reaktionsplattan på ett CFX Opus 96 Dx, CFX96 Dx eller AB7500 Fast Dx realtids-PCR-instrument.

Inställning av Bio-Rad CFX96 Dx-instrumentet

Följande instruktioner gäller för att köra Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit på ett datorstyrt CFX96 Dx realtids-PCR-system. Mer information finns i instrumenthandboken.

Det finns tre faser i en RT-PCR-körning med Bio-Rad CFX Manager Dx-programvara:

1. Protokollinställning
2. Plattinställning
3. Köra RT-PCR-reaktionen

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Inställning av cykelprotokoll för CFX Opus 96 Dx eller CFX96 Dx realtids-PCR-system

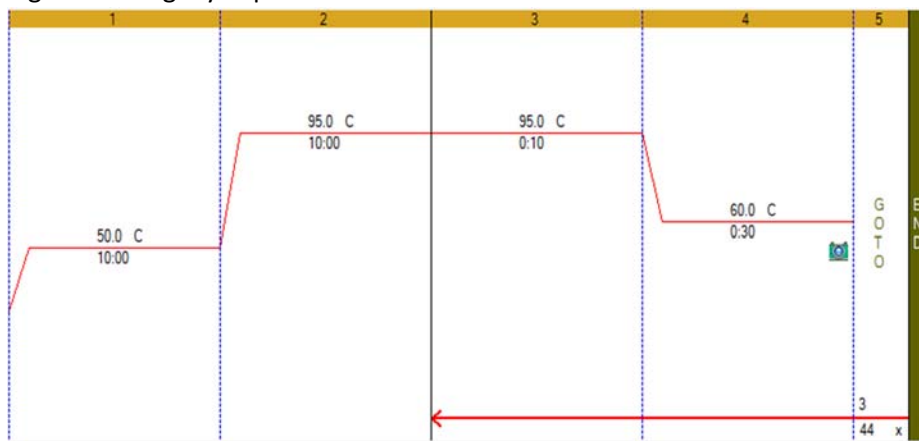
1. Klicka på **File** (Arkiv) -> **New** (Nytt)-> **Protocol** (Protokoll) i menyraden för att öppna Protocol Editor (Protokollredigeraren)
2. Ändra provvolymen till 20 µl
3. Ändra cykelprotokollet till riktlinjerna i Tabell 8 nedan:

Tabell 8. Termocyklerprotokoll

Stegnummer	Cykelsteg	Temperatur (°C)	Tid	Cyklar
1	Omvänd transkription	50	10 minuter	1
2	Enzymaktivering	95	10 minuter	1
3	Denaturering	95	10 sekunder	45
4	Hybridsering/extension/ plattavläsning	60	30 sekunder	
5	Gå till steg 3 och upprepa 44 gånger	--	--	

4. Bekräfta att steg 4 inkluderar en plattavläsning, vilket indikeras av en kamerasymbol i steget
5. Lägg till en plattavläsning i steg 4 genom att klicka på steget för att markera det och sedan klicka på **Add Plate Read to Step** (Lägg till plattavläsning i steg)

Figur 1: Slutligt cykelprotokoll



6. Spara protokollet genom att klicka på **File** (Arkiv) -> **Save As** (Spara som)
7. Ge protokollfilen namnet "**Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Protocol**"
8. Klicka på Ok för att stänga skärmen Protocol Editor (Protokollredigeraren).

Plattinställning för CFX Opus 96 Dx eller CFX96 Dx realtids-PCR-system

1. Klicka på **File** (Arkiv)-> **New** (Nytt)-> **New Plate** (Ny platta) i menyraden för att öppna Plate Editor (Plattredigeraren)
2. Välj **Settings** (Inställningar) -> **Plate Size** (Plattstorlek) och välj 96 brunnar
3. Välj **Settings** (Inställningar) -> **Plate Type** (Platttyp)-> **BR White** (BR vit)
4. Expandera rullgardinsmenyn till höger om **Scan Mode** (Skanningsläge) och välj **All Channels** (Alla kanaler)

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

5. Markera brunnarna där prover och kontroller kommer att finnas på plattan. Du kan markera alla brunnar genom att klicka i det övre vänstra hörnet på plattans grafik.
6. Klicka på **Select Fluorophores** (Välj fluoroforer) och välj FAM, HEX och Texas Red genom att markera rutan Selected (Vald) till höger om fluoroforen (avmarkera SYBR). Klicka på OK för att tillämpa ändringarna.
7. Definiera provtyp för varje brunn genom att markera brunnarna och sedan välja lämplig identifierare från rullgardinsmenyn Sample Type (Provtyp)
8. Ange **målnamn och fluoroforer** på alla brunnar genom att markera brunnarna och sedan markera rutan Load (Ladda) till vänster om var och en av de fluoroforer som anges i avsnittet Target Name (Målnamn). För att inkludera målnamnet, ersätt <none> i den öppna textrutan till höger om fluoroforen med följande:
 - FAM – SARS-CoV-2 (N1)
 - HEX – SARS-CoV-2 (N2)
 - Texas – RNase PTips! Klicka på Retur när du har ändrat varje målnamn för att tillämpa på plattlayouten
9. Spara filen genom att klicka på **File** (Arkiv) -> **Save As** (Spara som)
10. Ge plattfilen namnet **"Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Plate Setup"**
11. Klicka på **Save** (Spara)
12. Stäng filen genom att klicka på **File**(Arkiv) -> **Close** (Stäng)

Köra RT-PCR-plattan på CFX96 Dx realtids-PCR-systemet

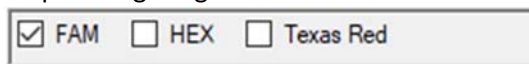
1. Välj instrumentet från rullgardinsmenyn Select Instrument (Välj instrument) i Startup Wizard (Startguiden)
2. Klicka på User defined (Användardefinierad) i avsnittet Select run type (Välj körningstyp) i Startguiden. Då öppnas panelen Run Setup (Körningsinställning).
3. Klicka på **Select Existing** (Välj befintlig) på protokollfliken
4. Välj cykelprotokollfilen **"Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Protocol.prcl"**
5. Klicka på Open (Öppna)
6. Bekräfta att cykelprotokollet ser ut som i Tabell 8
7. Klicka på fliken Plate (Platta) i panelen Run Setup (Körningsinställning)
8. Klicka på **Select Existing** (Välj befintlig)
9. Välj plattinställningsfilen **"Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-qPCR Plate Setup.pltd"**
10. Klicka på Open (Öppna)
11. Klicka på fliken **Start Run** (Starta körning) på panelen Run Setup (Körningsinställning)
12. Välj instrumentet i avsnittet Start Run on Selected Blocks (Starta körning på valda block) genom att markera rutan till vänster om instrumentets namn
13. Ladda plattan i instrumentet
14. Klicka på **Start Run** (Starta körning)
15. Definiera ett filnamn för körningsfilen och klicka på Save (Spara) för att starta körningen

Dataanalys på CFX96 Dx realtids-PCR-system

Körningsdatafilen öppnas automatiskt när körningen har slutförts. Du kan öppna en fil som har stängts genom att klicka på **File** (Arkiv)-> **Open** (Öppna)-> **Data File** (Datafil) och välja datafilen från menyn.

För att analysera data kan du justera baslinje- och tröskelvärdena för varje fluorofor på fliken Quantification (Kvantifiering).

1. Klicka på **Settings** (Inställningar)-> **Cycles to Analyze** (Cykler att analysera) och ersätt standardinställningen "1" i den första cellen med "5". Klicka på **Ok**.
2. Avmarkera HEX- och Texas Red-fluoroforerne genom att avmarkera motsvarande rutor under amplifieringsdiagrammet. Endast FAM-rutan ska vara markerad.



3. Välj **Log Scale** (Loggskala) genom att markera rutan längst ner till höger på amplifieringsdiagrammet
 Log Scale
4. Inspektera spåren visuellt. Alla brunnar med amplifiering i FAM-kanalen bör visa en exponentiell ökning av RFU-värden upp till reaktionsplåtåerna.
5. Manuell baslinjustering kan vara nödvändig om amplifieringsspåren inte är exponentiella. För att manuellt definiera baslinjen, välj **Settings** (Inställningar) -> **Baseline Threshold** (Baslinjetröskel). Markera den brunn som ska justeras, ange 2 i cellen **Baseline Begin** (Baslinjens början) och ange ett cykelnummer som är två cykler innan amplifieringsspåret börjar stiga i cellen **Baseline End** (Baslinjens slut). Klicka på **OK**.
6. Ställ in FAM-tröskeln i amplifieringsdiagrammet genom att klicka och dra tröskelraden tills den ligger inom fluorescenskurvornas exponentiella fas och ovanför eventuell bakgrundssignal.
7. Bekräfta baslinjen och definiera tröskeln för kanalerna HEX och Texas Red genom att välja lämplig fluorofor i steg 2 och upprepa processen enligt ovan.

Inställning av AB7500 Fast Dx-instrumentet

Följande instruktioner är nödvändiga för att köra Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit på ett AB7500 Fast Dx realtids-PCR-system. För mer detaljerad information om konfiguration av plattor och cykelprotokoll, se handboken för AB7500 Fast Dx realtids-PCR-instrumentet.

1. Starta 7500-programvaran
2. Välj **File** (Arkiv) -> **New** (Nytt) i menyraden
3. Definiera följande
 - a. **Assay – Standard Curve (Absolute Quantitation) (Analys – Standardkurva (absolut kvantifiering))**
 - b. **Container – 96-Well Clear (Behållare – 96 brunnar, klar)**
 - c. **Template – Blank Document (Mall – Tomt dokument)**
 - d. **Run Mode – Standard 7500 (Körningsläge – Standard 7500)**

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

4. Tilldela rapportfluorofor enligt definitionen i Tabell 9

Tabell 9: Nödvändiga rapporteringsfluoroforer

Rapporteringsfluorofor	Detektor
FAM	N1
HEX	N2
TEXAS RED	RP

Obs! För N2-analysen är VIC-kanalen tillämplig för att detektera detta mål.

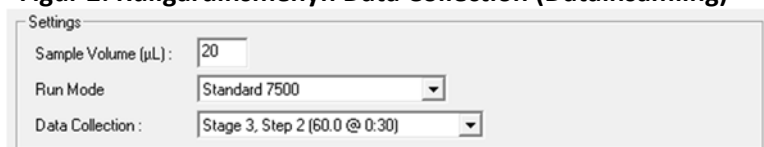
5. Välj **Passive Reference** (Passiv referens) -> **None** (Ingen)
6. Definiera cykelprotokollet med de värden som anges i Tabell 10

Tabell 10. Protokoll för termocykling i AB7500 Fast Dx

Cykelsteg	Temperatur (°C)	Tid	Antal cykler
Omvänd transkription	50	10 minuter	1
Enzymaktivering	95	10 minuter	1
Denaturering	95	10 sekunder	45
Hybridisering/extension	60	30 sekunder	

7. Definiera datainsamlingssteget genom att välja Stage 3, step 2 (60.0 @ 0:30) från rullgardinsmenyn Data Collection, se figur 2.

Figur 2: Rullgardinsmenyn Data Collection (Datainsamling)



Settings

Sample Volume (µL): 20

Run Mode: Standard 7500

Data Collection: Stage 3, Step 2 (60.0 @ 0:30)

Dataanalys på AB7500 Fast Dx realtids-PCR-system

Följande instruktioner är nödvändiga för att analysera resultat som erhållits med hjälp av Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit med AB7500 Fast Dx realtids-PCR-system. För mer detaljerad information om dataanalys, se handboken för AB7500 Fast Dx realtids-PCR-instrumentet.

Ställa in baslinje- och tröskelvärden

1. Välj **File** (Arkiv) -> **Open** (Öppna) och välj den datafil som ska analyseras
2. Välj fliken **Result** (Resultat) i programvarans övre vänstra hörn
3. Klicka på fliken **Amplification Plot** (Amplifieringsdiagram)
4. Markera alla prover från körningen om du vill visa alla amplifieringskurvor
5. Ange **Data** till **Delta Rn vs. Cycle** (Deltakörning jmf med cykel) på höger sida av panelen
6. Ange **Detector** (Detektor) till **N1**
7. Ange **Line Color** (Linjefärg) till **Detector Color** (Detektorfärg)
8. Välj **Manual Ct** (Manuell Ct) och **Manual Baseline** (Manuell baslinje) under **Analysis Settings** (Analysinställningar). Ändra inte standardtalen för manuell baslinje.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

9. Klicka och dra tröskellinjen tills den ligger inom fluorescenskurvornas exponentiella fas och ovanför eventuell bakgrundssignal
10. Klicka på knappen **Analyze** (Analysera) i det nedre högra hörnet av fönstret. Den röda tröskeln blir grön, vilket indikerar att data har analyserats.
11. Upprepa steg 6–10 för att analysera resultaten för varje uppsättning markörer

Tolkning av resultat

NTC, positiv kontroll och negativ kontroll bör undersökas innan patientresultaten tolkas. Om kontrollerna inte är giltiga kan patientresultaten inte tolkas.

Kontroller för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit – NTC, positiva och negativa

Ingen templatkontroll (NTC)

NTC-reaktionerna för SARS-CoV-2 RT-PCR-oligomixen ska inte uppvisa positiva signaler i någon kanal (FAM, HEX eller Texas Red) för något av de tre testade målen, *N1*, *N2* eller *RP*. Om någon av NTC-reaktionerna uppvisar positivitet kan provförorening ha uppstått. Ogiltigförklara körningen och upprepa analysen med den resterande extraherade nukleinsyran med strikt efterlevnad av riktlinjerna. Om det upprepade testresultatet är positivt ska du extrahera om och testa om alla prover som ingick i den batchen.

Positiv kontroll

Den positiva kontrollen ger positiva resultat ($Cq < 40$) för detektion av primer- och probuppsättningar för *N1*, *N2* och *RP*.

Negativ kontroll

Den negativa kontrollen bör ge ett positivt resultat med primer- och probuppsättningen för *RP* ($Cq < 40$) och negativa resultat med alla SARS-CoV-2 *N1*- och *N2*-mål.

Undersökning och tolkning av patientprovresultat

Bedömning av testresultatet av kliniska prover bör utföras efter det att de positiva och negativa kontrollerna har undersökts och bestämts vara giltiga och acceptabla. Förväntad prestanda för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR-analyskontrollerna visas i Tabell 11.

Tabell 11. Förväntad prestanda av kontroller i Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Kontrolltyp	Externt kontrollnamn	Används för att övervaka	SARS-CoV-2		Intern kontroll	Förväntat Cq		
			N1	N2	RP	N1	N2	RP
NTC	RNase-/DNase-fritt vatten	Reagens- och/eller miljöföroreningar	Negativt	Negativt	Negativt	Cq \geq 40 eller N/A		
Negativt	SARS-CoV-2 negativt	Reagens- och/eller miljöförorening	Negativt	Negativt	Positivt	Cq \geq 40 eller N/A	Cq \geq 40 eller N/A	< 40
Positivt	SARS-CoV-2 Standard	Väsentligt reagensfel, inklusive primer- och probintegritet	Positivt	Positivt	Positivt	< 40	< 40	< 40

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Om någon kontroll inte uppfyller dessa kriterier kan testet ha konfigurerats eller körts på felaktigt sätt, eller det kan vara fel på reagenser eller utrustning. Ogiltigförklara körningen och testa igen.

RP (intern kontroll)

Alla kliniska prover ska uppvisa positiva signaler med *RP*-primers och -prob ($Cq < 40$), vilket indikerar närvaron av humant *RP*-RNA. Om *RP* inte detekteras i några kliniska prover kan det indikera:

- felaktig extraktion av nukleinsyra från kliniska material vilket resulterar i förlust och/eller nedbrytning av RNA
- frånvaro av tillräcklig mängd humant cellulärt material på grund av dålig insamling eller förlust av provintegritet
- felaktig analyskonfiguration och -körning
- reagens- eller utrustningsfel

Om *RP*-analysen inte ger ett positivt resultat för ett humant kliniskt prov, ska du tolka det som följande:

- Om SARS-CoV-2 *N1* och *N2* är positiva, även i frånvaro av ett positivt *RP*, bör resultatet betraktas som giltigt. Det är möjligt att vissa prover inte uppvisar *RP* som positivt ($Cq < 40$) på grund av lågt cellantal i det ursprungliga kliniska provet. En negativ *RP*-signal utesluter inte närvaron av RNA från SARS-CoV-2-virus i ett kliniskt prov.
- Om alla SARS-CoV-2-markörer och *RP* är negativa för provet, bör resultatet anses vara ogiltigt för provet. Om ett kvarvarande prov finns tillgängligt, upprepa extraktionsförfarandet och upprepa testet. Om alla markörer förblir negativa efter upprepat test, ska resultatet rapporteras som ogiltigt och ett nytt prov ska samlas in.

SARS-CoV-2-markörer (*N1* och *N2*)

- SARS-CoV-2 detekteras när alla kontroller uppvisar förväntad prestanda och amplifieringskurvorna för SARS-CoV-2-markörer (*N1* och *N2*) passerar tröskelvärdeslinjen inom 40 cykler. *RP* kan vara både positivt och negativt enligt beskrivningen ovan, men SARS-CoV-2-resultatet är fortfarande giltigt.
- SARS-CoV-2 detekteras inte när alla kontroller uppvisar förväntad prestanda och INGEN SARS-CoV-2-markörers (*N1*, *N2*) amplifieringskurvor korsar tröskelvärdeslinjen inom 40 cykler OCH RNase P-amplifieringskurvan korsar tröskelvärdeslinjen inom 40 cykler.
- Resultatet är ofullständigt när alla kontroller uppvisar förväntad prestanda och amplifieringskurvorna för någon av SARS-CoV-2-markörerna (*N1* eller *N2*, men inte båda markörerna) korsar cykeltröskeln inom 40 cykler. Extraherat RNA bör testas på nytt. Om kvarvarande RNA inte är tillgängligt, extrahera på nytt RNA från restprovet och testa det igen. Om samma resultat uppnås rapporteras det ofullständiga resultatet.
- Resultatet är ogiltigt när alla kontroller uppvisar förväntad prestanda och VARKEN amplifieringskurvorna för SARS-CoV-2-markörerna (*N1*, *N2*) ELLER *RP*-markören korsar cykeltröskeln inom 40 cykler. Extraherat RNA från provet bör testas på nytt. Om kvarvarande RNA inte är tillgängligt ska du extrahera RNA på nytt från det återstående provet och testa det igen. Om det testade provet är negativt för alla markörer och för *RP*, är resultatet ogiltigt och insamling av ett nytt prov från patienten bör övervägas.

Se riktlinjerna i Tabell 12 för att underlätta tolkningen.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Tabell 12. Guide för tolkning av resultat från Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

SARS-CoV-2 N1-resultat	SARS-CoV-2 N2-resultat	Intern kontroll RP-resultat	Tolkning	Åtgärder
Positivt (Cq < 40)	Positivt (Cq < 40)	Positivt eller negativt	SARS-CoV-2 detekterades	Förvara prover vid -70 °C efter behov och rapportera resultaten till lämplig folkhälsomyndighet
Om bara ett av de två målen är positivt (Cq < 40)		Positivt eller negativt	Ofullständigt	Upprepa testning av nukleinsyra och/eller extrahera på nytt och upprepa RT-PCR. Om det upprepade resultatet förblir ofullständigt, kontakta lämplig folkhälsomyndighet för instruktioner för överföring av provet eller ytterligare vägledning.
Negativt (Cq ≥ 40 eller N/A)	Negativt (Cq ≥ 40 eller N/A)	Positivt (Cq < 40)	SARS-CoV-2 detekterades inte	Rapportera resultaten till lämplig folkhälsomyndighet
Negativt (Cq ≥ 40 eller N/A)	Negativt (Cq ≥ 40 eller N/A)	Negativt (Cq ≥ 40 eller N/A)	Ogiltigt resultat	Upprepa extraktion och RT-PCR. Överväg att samla in ett nytt prov från patienten om det upprepade resultatet också är ogiltigt.

Begränsningar

1. Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit har endast utvärderats för användning på CFX Opus 96 Dx, CFX96 Dx och AB7500 Fast Dx realtids-PCR-system.
2. Prestanda för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit har fastställts i prov från de övre luftvägarna, inklusive nasofaryngeala pinnprover, pinnprover från mitten av näsmussleregionen, orofaryngeala pinnprover och anteriärt nasala pinnprover. Användning av Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit med andra provtyper har inte utvärderats och prestandaegenskaperna är okända.
3. Tillförlitliga resultat är beroende av korrekt provtagning, lagring och hantering.
4. Detta test används för detektion av SARS-CoV-2-RNA i prover från övre andningsvägar som samlats in i ett UTM (Universal Transport Medium) eller UVT (Universal Viral Transport System). Testning av andra provtyper med Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit kan ge felaktiga resultat.
5. Detektion av SARS-CoV-2-RNA kan påverkas av provinsamlingsmetoder, patientfaktorer (till exempel närvaro av symtom) och/eller infektionsstadium.
6. Resultatet från Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit är en kvalitativ bedömning av patientprover som är positiva för SARS-CoV-2. Användaren bedömer RT-PCR-resultatet i fråga om kontroller och patientprover för att fatta ett kvalitativt beslut om SARS-CoV-2 detekteras eller inte. De rapporterade värdena bör inte användas eller tolkas som kvantitativa.
7. Som med alla molekylära test kan mutationer inom målregionerna i Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit påverka primer- och/eller probindningen vilket resulterar i att närvaron av ett virus inte detekteras.
8. På grund av inneboende skillnader mellan olika tekniker rekommenderas det att användarna utför metodkorrelationsstudier i sitt laboratorium innan de byter från en teknik till en annan, för att kvalificera tekniska skillnader. Hundraprocentig överensstämmelse mellan resultaten bör inte förväntas på grund av de ovan nämnda skillnaderna mellan olika tekniker. Användare bör följa sina egna specifika policyer/procedurer.

Egenskaper för analytiska prestanda

Analytisk känslighet

Studier av detektionsgränsen (LoD, Limit of Detection) genomfördes för att bestämma den lägsta detekterbara koncentrationen av SARS-CoV-2 vid vilken mer än eller lika med 95 % av alla (verkligt positiva) replikat testade positivt med hjälp av Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit. LoD-studier utfördes med simulerade patientprover bestående av syntetiskt SARS-CoV-2-virus (AccuPlex SARS-COV-2, Seracare, katalognr 0505-0126) titrerad på en bakgrund av poolad SARS-CoV-2-negativ matris av nasofaryngealt pinnprov före nukleinsyrening. En tvåfaldig utspädningsserie från 31,5 till 500 kopior per ml testades. Tjugo replikat för varje koncentration extraherades med antingen QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit eller Thermo Fisher MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit. De extraherade nukleinsyraproverna testades därefter med Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit på CFX96 Dx och AB7500 Fast Dx. LoD bestämdes som den lägsta mängden virus som detekterades där minst 19 replikat testade positivt för både N1- och N2-analyser.

LoD-resultaten från Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit för att detektera SARS-CoV-2 från prover extraherade med QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit visas i tabell 13 och 14. På CFX96 Dx är LoD 125 virala kopior/ml (tabell 13). På CFX Opus 96 Dx och AB7500 Fast Dx är LoD 250 virala kopior/ml (tabell 14 och 15). LoD-resultaten för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit för att detektera SARS-CoV-2 från prover extraherade med Thermo Fisher MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit visas i tabell 16–18. På CFX Opus 96 Dx, CFX96 Dx och AB7500 Fast Dx är LoD 125 virala kopior/ml. Sammanfattningsvis är LoD-intervallet 125–250 virala kopior/ml på instrumenten oberoende av metod för rening av nukleinsyra (tabell 19).

Tabell 13. LoD-resultat på CFX96 Dx för prover som extraherats med QIAamp Viral RNA Mini Kit

SARS-CoV-2-kopior/ml	CFX96 Dx realtids-PCR-system			
	N1-analys		N2-analys	
	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat
500	N/A	N/A	N/A	N/A
250	20/20	31,25	20/20	32,88
125	19/20	32,4	20/20	34,6
62,5	19/20	32,86	18/20	35,57
31,25	15/20	33,49	15/20	36,36

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Tabell 14. LoD-resultat på CFX Opus 96 Dx för prover som extraherats med QIAamp Viral RNA Mini Kit

SARS-CoV-2-kopior/ml	CFX Opus 96 Dx realtids-PCR-system			
	N1-analys		N2-analys	
	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat
500	20/20	31,39	20/20	32,19
250	20/20	33,00	20/20	33,64
125	16/20	33,89	19/20	35,06
62,5	N/A	N/A	N/A	N/A
31,25	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabell 15. LoD-resultat på AB7500 Fast Dx för prover som extraherats med QIAamp Viral RNA Mini Kit

SARS-CoV-2-kopior/ml	AB7500 Dx realtids-PCR-system			
	N1-analys		N2-analys	
	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat
500	20/20	33,06	20/20	34,36
250	20/20	34,61	20/20	36,04
125	19/20	36,07	15/20	37,95
62,5	18/20	35,84	17/20	37,38
31,25	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabell 16. LoD-resultat på CFX96 Dx för prover som extraherats med MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

SARS-CoV-2-kopior/ml	CFX96 Dx realtids-PCR-system			
	N1-analys		N2-analys	
	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat
500	20/20	33,31	20/20	33,53
250	19/20	33,45	20/20	33,63
125	19/20	34,48	20/20	35,07
62,5	18/20	35,56	15/20	37,47
31,25	11/20	36,14	10/20	38,06

Tabell 17. LoD-resultat på CFX Opus 96 Dx med prover som extraherats med MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

SARS-CoV-2-kopior/ml	CFX Opus 96 Dx realtids-PCR-system			
	N1-analys		N2-analys	
	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat
500	20/20	33,57	20/20	33,52
250	20/20	33,65	20/20	33,82
125	20/20	34,99	19/20	34,98
62,5	N/A	N/A	N/A	N/A

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Tabell 18. LoD-resultat på AB7500 Dx med prover som extraherats med MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

SARS-CoV-2-kopior/ml	AB7500 Dx realtids-PCR-system			
	N1-analys		N2-analys	
	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat	Positiva replikat/ totalt antal replikat	Genomsnittlig Cq för positiva replikat
500	20/20	33,72	20/20	35,44
250	20/20	34,29	20/20	35,94
125	20/20	35,34	20/20	37,04
62,5	13/20	36,76	12/20	38,2
31,25	6/20	37,47	9/20	39,17

Tabell 19. Sammanfattning av detektionsgränser (LoD) för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

	QIAamp Viral RNA Mini Kit	MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit
CFX96 Dx	125 kopior/ml	125 kopior/ml
CFX Opus 96 Dx	250 kopior/ml	125 kopior/ml
AB7500 Dx	250 kopior/ml	125 kopior/ml

Inkludering

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos-sekvenserna (primrar och prober) för *N1*, *N2* och *RP* utvecklades av CDC. CDC utförde en sammanjämförande av oligonukleotidsekvenser av primrar och prober för CDC 2019 nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel med alla offentligt tillgängliga nukleidsyrasekvenser för SARS-CoV-2 i GISAID-databasen (Global Initiative on Sharing All Influenza Data, <https://www.gisaid.org>) den 20 juni 2020, för att demonstrera förväntad inkludering i CDC 2019 nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. En utvärdering av 31 623 tillgängliga SARS-CoV-2-sekvenser i GISAID användes i denna studie. Med undantag för en nukleotidmissmatchning med frekvensen > 1 % (2,00 %) vid den tredje positionen i N1-proben var frekvensen för alla missmatchningar < 1 %, vilket indikerar att förekomsten av missmatchningarna var sporadisk. Endast en sekvens (0,0032 %) hade två nukleotidmissmatchningar i N1-proben, och en annan sekvens från ett annat isolat (0,0032 %) hade två nukleotidmissmatchningar i bakåtriktad primer för N1. Inga sekvenser befanns ha mer än en missmatchning i någon N2-primer-/probregion.

Risken för att en enda missmatchning resulterar i en signifikant förlust av reaktivitet och falskt negativa resultat är låg på grund av utformningen av primrarna och proberna med smälttemperaturer på > 60 °C och körningsförhållanden för analysen med hybridiseringstemperatur vid 55 °C för att tolerera en till två missmatchningar.

Analytisk specificitet (korsreaktivitet)

In silico-analys för de patogener som anges i tabell 20 utfördes genom nedladdning av en GenBank-referenssekvens per genom för var och en av organismerna. Referenssekvenserna jämfördes mot Bio-Rad SARS-CoV-2-målen, N1 och N2 för alla möjliga kombinationer (framåtriktad primer, bakåtriktad primer, prob och omvända komplement för alla dessa) för att bestämma homologiandelen. Om någon av dessa primerkombinationer mappades till en sekvens på motsatta strängar med en homologi av > 80 % på samma mål inom ett kort avstånd (≤100 bp) från varandra, flaggades potentiella amplifieringar. Ingen

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

potentiell oavsiktlig korsreaktivitet förväntas baserat på den här in silico-analysen förutom SARS-coronavirus (SARS-CoV) med N2-målet.

In silico-analysen för N1-uppsättningen av primrar/prober visade en hög sekvenshomologi av N1-proben med SARS-CoV och SARS-liknande coronavirusgenom från fladdermöss. Framåtriktade och bakåtriktade primrar visade emellertid ingen sekvenshomologi med SARS-CoV och SARS-liknande coronavirusgenom från fladdermöss. Genom att kombinera primrar och probresultat finns det inga signifikanta homologier med det humana genomet, andra coronavirus eller human mikroflora som skulle förutsäga potentiellt falskt positiva RT-PCR-resultat.

Tabell 20. In silico-analys för SARS-CoV-2

Patogener som testats in silico	Oavsiktlig korsreaktivitet mot N1	Oavsiktlig korsreaktivitet mot N2
SARS-CoV	Ingen detekterad	Homologimatchning 92 %*
MERS-coronavirus	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant adenovirus A	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant adenovirus B1	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant adenovirus B2	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant adenovirus C	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant adenovirus D	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant adenovirus E	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant adenovirus F	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant metapneumovirus (HMPV)	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Parainfluenzavirus 1	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Parainfluenzavirus 2	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Parainfluenzavirus 3	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Parainfluenzavirus 4	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Influensa A H3N2	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Influensa A H2N2	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Influensa A H7N9	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Influensa A H1N1	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Influensa B	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant enterovirus A	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Humant enterovirus B	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Enterovirus E, bovint enterovirus	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Enterovirus F	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Enterovirus G, porcint enterovirus 9	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Enterovirus H, simian enterovirus A	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Enterovirus J-stam 1631	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Enterovirus J-stam N203	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Respiratoriskt syncytialvirus	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Rhinovirus A, humant rhinovirus 89	Ingen detekterad	Ingen detekterad

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Patogener som testats in silico	Oavsiktlig korsreaktivitet mot N1	Oavsiktlig korsreaktivitet mot N2
Rhinovirus A, humant rhinovirus 1 stam ATCC VR-1559	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Rhinovirus B	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Rhinovirus C, humant rhinovirus C	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Rhinovirus C, humant rhinovirus NAT001	Ingen detekterad	Ingen detekterad
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ingen detekterad	Ingen detekterad
<i>Legionella pneumophila</i>	Ingen detekterad	Ingen detekterad
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ingen detekterad	Ingen detekterad
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ingen detekterad	Ingen detekterad
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Ingen detekterad	Ingen detekterad
Enterovirus (t.ex. EV68)	Ingen detekterad	Ingen detekterad
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Ingen detekterad	Ingen detekterad

*Analys av den framåtriktade primern för N2-målet visade hög homologi för SARS-liknande coronavirus från fladdermöss. Däremot visade den bakåtriktade primern och probsekvenserna ingen signifikant homologi med det humana genomet, andra coronavirus eller human mikroflora som skulle förutsäga potentiellt falskt positiva RT-PCR-resultat. Genom att kombinera primrar och probresultat finns det ingen förutsägelse av potentiellt falskt positiva RT-PCR-resultat.

Utöver *in silico*-analysen rapporterade CDC analytisk specificitet och exklusivitet som visar att förväntade resultat erhålls för varje organism som anges i tabell 21 för att visa att slutresultatet inte påverkas av dessa virus.

Tabell 21. Specificitet/exklusivitet rapporterad av CDC

Virus	Stam	Källa	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Slutresultat
Humant coronavirus	229E	Isolat	0/3	0/3	Neg.
Humant coronavirus	OC43	Isolat	0/3	0/3	Neg.
Humant coronavirus	NL63	Kliniskt prov	0/3	0/3	Neg.
Humant coronavirus	HKU1	Kliniskt prov	0/3	0/3	Neg.
MERS-coronavirus		Isolat	0/3	0/3	Neg.
SARS-coronavirus		Isolat	0/3	0/3	Neg.
Bocavirus		Kliniskt prov	0/3	0/3	Neg.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		Isolat	0/3	0/3	Neg.
<i>Streptococcus</i>		Isolat	0/3	0/3	Neg.
Influensa A(H1N1)		Isolat	0/3	0/3	Neg.
Influensa A(H3N2)		Isolat	0/3	0/3	Neg.
Influensa B		Isolat	0/3	0/3	Neg.
Humant adenovirus, typ 1	Ad71	Isolat	0/3	0/3	Neg.
Humant metapneumovirus		Isolat	0/3	0/3	Neg.
Respiratoriskt syncytialvirus	Long A	Isolat	0/3	0/3	Neg.
Rhinovirus		Isolat	0/3	0/3	Neg.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Virus	Stam	Källa	2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Slutresultat
Parainfluensa 1	C35	Isolat	0/3	0/3	Neg.
Parainfluensa 2	Greer	Isolat	0/3	0/3	Neg.
Parainfluensa 3	C-43	Isolat	0/3	0/3	Neg.
Parainfluensa 4	M-25	Isolat	0/3	0/3	Neg.

Klinisk utvärdering

Prestanda för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit med nasofaryngeala, kliniska pinnprover utvärderades med hjälp av 34 individuella negativa kliniska prover och 34 bekräftade positiva kliniska prover. Prover som erhöles med iSpecimen samlades in från patienter med tecken och symtom på en övre luftvägsinfektion. Proverna samlades in av kvalificerad personal i enlighet med insamlingsproduktens bipacksedel och förvarades frysta vid -80 °C. De positiva proven representerade ett brett spektrum av virusbelastning och inkluderade lågt positiva prover. Provernas resultat erhöles med användning av en högkänslig molekylär komparatoranalys.

Nukleinsyra renades från de 68 kliniska proverna med hjälp av Thermo Fisher MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit med användning av en provvolym på 200 µl och en elueringsvolym på 100 µl. Proverna randomiserades, blindades och utvärderades med Bio-Rads Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit med hjälp av Bio-Rad CFX96 Dx realtids-PCR-system, som har en liknande detektionsgräns som AB7500 Fast Dx realtids-PCR-system. MagMax Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit användes för den kliniska utvärderingsstudien eftersom detektionsgränsen var inom 2x av den detektionsgräns som fastställdes med extraktionsmetoden QIAamp Viral RNA Mini på båda instrumenten. Resultaten som erhöles från prover som testats med användning av Bio-Rads Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit jämfördes med resultaten som erhöles från en molekylär komparatoranalys.

Kliniska studieresultat (tabell 22) visar 97,1 % positiv överensstämmelse (PPA, positive percent agreement) med 95 % konfidensintervall på 85,1–99,5 % och 100 % negativ överensstämmelse (NPA, negative percent agreement) med 95 % konfidensintervall på 89,9–100 %.

Tabell 22. PPA och NPA för Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit mot komparator

Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR	Positivt komparator-test	Negativt komparator-test	Totalt	PPA [95 % CI]	NPA [95 % CI]
Positivt test	33	0	34	97,1 % [85,1–99,5 %]	100 % [89,9–100 %]
Ofullständigt	1	0	0		
Negativt test	0	34	34		
Totalt	34	34	68		

Det fanns två diskordanta resultat (prov 37 och 65) vid inledande testning: Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit var ofullständigt och den molekylära komparatoranalysen var positiv. Vid upprepning av Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit på prov 37 löstes det ofullständiga resultatet och provet bekräftades vara positivt. Otillräckligt restprov förhindrade ett nytt test av prov 65.

Referenser

1. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods. Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document MM13-Ed2. Wayne, PA; CLSI, 2020.
4. World Health Organization. Laboratory Testing for Coronavirus Disease (COVID-19) in Suspected Human Cases: Interim Guidance. March 19, 2020, World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501> (accessed 2020-05-08)
5. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel services (Revision:05). Centers for Disease Control and Prevention 2020, Atlanta, GA. <https://www.fda.gov/media/134922/download>.

Bilaga A: Protokoll för kvalificering av instrument

Syfte

Den här bilagan är avsedd att ge en rekommendation om hur man förbereder en panel med simulerade prover för att verifiera prestandan hos Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit av slutanvändaren.

Material som behövs

Beskrivning	Antal	Ingår i paketet
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard	1 injektionsflaska	Ja
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative	1 injektionsflaska	Ja
Fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS, pH 7,4)	3 ml*	Nej

*Angivet antal är för beredning av en uppsättning med 9 simulerade prover

Försiktighetsåtgärder

Den positiva kontrollen som tillhandahålls med Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit består av RNA-transkript som kodar SARS-CoV-2 N1- och N2-generna och humant genomiskt DNA för RP-genamplifieringen. Denna kontroll är icke-smittsam. Båda kontrollerna Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard och Negative är endast för engångsbruk. Frys inte in efter upptining. Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit ska hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis.

Kontrollmaterialet och andra komponenter i kittet måste förvaras vid lämpliga temperaturer, enligt beskrivningen i bruksanvisningen, och förvaras på is när de har tinats upp. De extraherade RNA proverna bör hållas kalla under beredning och användning.

Instruktioner för att förbereda simulerade prover före extraktion med QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit

1. Förbered tillräcklig buffert-AVL (med bärar-RNA) för 9 prover, enligt tillverkarens instruktioner.
2. Märk tre 1,5 ml RNase-fria rör som A, B och C. Märk nio 1,5 ml rör som 1–9.
3. Alikvotera 995 µl PBS i rör "A" och tillsätt sedan 5 µl Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard. Blanda väl.
4. Alikvotera 900 µl PBS i rör "B" och tillsätt sedan 100 µl från rör "A". Blanda väl.
5. Alikvotera 995 µl PBS i rör "C" och tillsätt sedan 5 µl Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative. Blanda väl.
6. Alikvotera 560 µl buffert-AVL innehållande bärar-RNA i vart och ett av de nio rören märkta 1–9.
7. Tillsätt 140 µl från rör A i vart och ett av rören 1–3.
8. Tillsätt 140 µl från rör B i vart och ett av rören 4–6.
9. Tillsätt 140 µl från rör C i vart och ett av rören 7–9.
10. Extrahera proverna med hjälp av QIAamp Viral RNA Mini Kit enligt tillverkarens instruktioner och eluera proverna i 60 µl AVE.

Instruktioner för beredning av simulerade prover före extraktion med Thermo Fisher MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

1. Märk tre 1,5 ml RNase-fria rör som A, B och C.
2. Alikvotera 995 µl PBS i rör "A" och tillsätt sedan 5 µl Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard. Blanda väl.
3. Alikvotera 900 µl PBS i rör "B" och tillsätt sedan 100 µl från rör "A". Blanda väl.
4. Alikvotera 995 µl PBS i rör "C" och tillsätt sedan 5 µl Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative
5. Alikvotera 10 µl Proteinase K från MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit i var och en av nio brunnar, betecknad 1–9, på en 96-brunnars platta med djupa brunnar
6. Tillsätt 200 µl från rör A i var och en av brunnarna 1–3.
7. Tillsätt 200 µl från rör B i var och en av brunnarna 4–6.
8. Tillsätt 200 µl från rör C i var och en av brunnarna 7–9.
9. Extrahera proverna med hjälp av MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit enligt tillverkarens anvisningar och eluera proverna i 100 µl elueringslösning.

Test av extraherade prover

Följ bruksanvisningen för Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Kit för att testa var och en av proverna med måttlig koncentration, låg koncentration och negativa prover minst en gång.

Förväntade resultat

Rören 1–3 och brunnarna 1–3 innehåller en måttlig koncentration av SARS-CoV-2 och bör vara positiva för N1, N2 och RP.

Rör 4–6 och brunn 4–6 innehåller en låg koncentration av SARS-CoV-2 och bör vara positiva för N1, N2 och RP.

Rör 7–9 och brunn 7–9 är negativa prover och bör vara negativa för N1 och N2 men positiva för RP.

Acceptanskriterier

Negativa prover (rör 7–9): 100 % (3/3) bör överensstämma med förväntade resultat.

Prover med måttlig koncentration (rör 1–3): 100 % (3/3) bör överensstämma med förväntade resultat.

Prover med låg koncentration (rör 4–6): Minst 66 % (2/3) bör överensstämma med förväntade resultat.

Bilaga B: Studie av provequivälens

En studie av provtypernas ekvivalens har genomförts för att fastställa om känsligheten för detektering av ett visst virus påverkas när proverna härrör från andra kliniska matriser än nasofaryngeala pinnprover. Specifikt utvärderades förmågan hos Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (CE-IVD) att detektera SARS-CoV-2 vid koncentrationen 3x LoD som tidigare fastställts i nasofaryngeala pinnprover (Tabell A1), för anteriärt nasala pinnprover, pinnprover från mitten av näsmussleregionen och orofaryngeala pinnprover. LoD i NP har tidigare fastställts som den minsta mängden virus som detekteras med minst 95 % av replikaten som testar positivt. Detektering vid 3x LoD anses likvärdig. Se LoD-avsnittet för ytterligare information.

I studien av provtypernas ekvivalens användes konstruerade prover av inaktiverat SARS-CoV-2-virus som tillsattes i poolade, kliniskt negativa anteriärt nasala pinnprover, pinnprover från mitten av näsmussleregionen eller orofaryngeala pinnprover. Konstruerade prover bereddes genom att varje virus tillsattes individuellt vid 3x LoD i en kliniskt negativ matrispool för varje provtyp. Positiva och negativa kontrollprover förbereddes med Exact Diagnostic SARS-CoV-2 Standard och Negative Run Controls (Bio-Rad, Cat# 16008441, 16008440) som tillsattes i en kliniskt negativ matrispool för varje provtyp. Varje konstruerat prov extraherades i tre exemplar med hjälp av QIAamp Viral RNA Mini Kit (140 µl provinmatning och 60 µl elueringsvolym). Nukleinsyra från dessa extraktioner testades på CFX96 Touch med Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (CE-IVD) enligt bruksanvisningen.

Tabell A1. Sammanfattning av LoD för virala stammar som utvärderats i studien av provtypernas ekvivalens

Virus	Stam	3x LoD
SARS-CoV-2	2019-nCoV/USA-WA1/2020	375 cp/ml

Alla kontroller presterade enligt förväntan. För varje klinisk matris testade konstruerade prover innehållande SARS-CoV-2-virus positivt som förväntat och negativt i kontrollprovet utan virus (Tabell A2).

Tabell A2. Resultat från studien av provtypernas ekvivalens

Provtyp	N1-analys		N2-analys	
	Antal pos.	Genoms. Cq	Antal pos.	Genoms. Cq
Nasofaryngealt pinnprov	3/3	37,83	3/3	38,78
Anteriärt nasalt pinnprov	3/3	36,89	3/3	38,56
Pinnprov från mitten av näsmussleregionen	3/3	35,36	3/3	36,00
Orofaryngealt pinnprov	3/3	37,41	3/3	37,21

Dessa data indikerar ekvivalent känslighet hos Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (CE-IVD) för detektering av SARS-CoV-2 i nasofaryngeala pinnprover, anteriärt nasala pinnprover, pinnprover från mitten av näsmussleregionen och orofaryngeala pinnprover.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

TEKNISK SUPPORT

Kontakta ditt regionala Bio-Rad-kontor. Gå till www.bio-rad.com för kontaktuppgifter.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

**For further information, please contact the Bio-Rad office nearest
you or visit our website at www.bio-rad.com**

4000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547
Telephone (510) 724-7000
FAX (510) 741-6373
www.bio-rad.com

Australia, Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd., Level 5, 446 Victoria Road, Gladesville, New South Wales 2111 • Phone +61 (2) 9914 2800 • Fax +61 (2) 9914 2888
Austria, Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 88/3-6, A-1130 Vienna • Phone +43 (0) 1 877 89 01 9 • Fax +43 (0) 1 876 56 29
Belgium, Bio-Rad Laboratories N.V., Winninglaan 3, BE-9140 Temse • Phone +32 (0) 3 710 53 00 • Fax +32 (0) 3 710 53 01
Brazil, Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, Avenida Doutor Churci Zaidan, 1.240 cj 1902 e 1904 Morumbi Corporate Santo Amaro, São Paulo, SP CEP 04711-130 • Phone +55 11 3065 7550
Canada, Bio-Rad Laboratories Ltd., 2403 Guénette Street, Montréal, Québec H4R 2E9 • Phone +1 514 334 4372 • Fax +1 514 334 0872
China, Bio-Rad Laboratories (Shanghai) Co., Ltd. Room 601, Allian Plaza, No. 168 Jingzhou Road, Yangpu District, Shanghai 200082 • Phone +86 21 6169 8500 • Fax +86 21 6169 8599
Czech Republic, Bio-Rad spol. s r.o., Ptkrtova 1737/1a, 14000 Prague 4 • Phone +420 241 431 660
Denmark, Bio-Rad Laboratories, Symbion Science Park, Fruebjergvej 3, DK-2100 Copenhagen East • Phone +45 44 52 10 00 • Fax +45 44 52 10 01
Finland, Bio-Rad Finland Oy, Kutomitie 16 FI-00380, Helsinki • Phone +358 9 804 22 00
France, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette • Phone +33 (0) 1 47 95 60 00 • Fax +33 (0) 1 47 41 91 33
Germany, Bio-Rad Laboratories GmbH, Kapellenstraße 12, D-85622 Feldkirchen, Munich • Phone +49 (0) 89 31884 393 • Fax +49 (0) 89 31884 136
Greece, Bio-Rad Laboratories M.E.P.E. 2-4 Mesogion Ave. (Athens Tower) 11527 Ampelokipi, Athens • Phone +30 210 7774396 • Fax +30 210 7774376
Hong Kong, Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F DCH Commercial Centre, 25 Westlands Road, Quarry Bay • Phone +85 2 2789 3300 • Fax +85 2 2789 1257
Hungary, Bio-Rad Hungary Ltd., Futó utca 47-53, 1082, Budapest • Phone +36 1 459 6190 • Fax +36 1 459 6101
India, Bio-Rad Laboratories India Pvt. Ltd., EMAAR Digital Greens, 9th Floor, Tower A- Sector 61 Gurugram-122 102, Haryana 122 015 • Phone +91 124 4029300 • Fax +91 124 2398115
Israel, Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Homa Street, New Industrial Area, Rishon Le Zion 75150 • Phone +972 3 963 6025 • Fax +972 3 951 4129
Italy, Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini 18/A, 20090 Segrate, Milan • Phone +39 02 94 86 600 • Fax +39 02 21609399
Japan, Bio-Rad Laboratories K.K., Tennoz Central Tower 20F, 2-2-24 Higashi-Shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0002 • Phone +81 3 6361 7070 • Fax +81 3 5463 8481
Korea, Bio-Rad Korea Ltd., 10th Floor, Hyunjuk Building, 832-41, Yeoksam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-080 • Phone +82 080 007 7373 • Fax +82 (2) 3472 7003
Mexico, Bio-Rad, S.A., Avenida Eugenia 197, Piso 10-A, Colonia Narvarte, Delegación Benito Juárez C.P. 03020 Mexico, D.F. • Phone +52 (55) 5488 7670 • Fax +52 (55) 1107 7246
The Netherlands, Bio-Rad Laboratories B.V., Postbus 222, 3900 AE Veenendaal • Phone +31 (0) 318 540 666 • Fax +31 (0) 318 542 216
New Zealand, Bio-Rad New Zealand, 189 Bush Road Rosedale, Auckland • Phone +64 (9) 415 2280 • Fax +64 (9) 415 2284
Norway, Bio-Rad Laboratories, Nydalsveien 33, 0484 Oslo • Phone +47 23 38 41 30 • Fax +47 23 38 41 39
Poland, Bio-Rad Polska Sp. z o.o., Przyokopowa 33, Level 4, Building A, 01-208, Warsaw • Phone +48 22 331 99 99 • Fax +48 22 331 99 88
Portugal, Bio-Rad Laboratories, Lda, Edifício Prime, Ave. Quinta Grande, 53 – Fração 3B Alfragide 26114-521, Amadora • Phone +351 21 47 27 700 • Fax +351 21 47 27 777
Russia, Bio-Rad Laboratori, 117105, Russian Federation, Moscow, Varshavskoe sh., 9, Bldg., 1B • Phone +7 495 721 1404 • Fax +7 495 721 1412
Singapore, Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 3A International Business Park Road, #11-10/16, ICON @ IBP Tower B, Singapore 609935 • Phone +65 6415 3170 • Fax +65 6415 3189
South Africa, Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Bolton Ave, Rosebank, Johannesburg • Phone +27 11 442 8508 • Fax +27 11 442 8525
Spain, Bio-Rad Laboratories, S.A., C/ Caléndula, 95, Edificio M. Miniparc II, El Soto de la Moraleja, 28109 Alcobendas • Phone +34 91 490 6580 • Fax +34 91 590 5211
Sweden, Bio-Rad Laboratories A.B., Solna Strandväg 3, SE-171 54 Solna, P.O. Box 1097, SE-172 22 Sundbyberg • Phone +46 844 98053 • Fax +46 8 55 51 27 80
Switzerland, Bio-Rad Laboratories AG, Pra Rond 23, CH-1785 Cressier • Phone +41 (0) 61 717 9555 • Fax +41 (0) 61 717 9550
Taiwan, Bio-Rad Laboratories Taiwan Ltd., 14th F B, No. 126, Sec. 4, Nan-King East Road, Taipei 10546 Taiwan, R.O.C. • Phone +886 (2) 2578 7189 • Fax +886 (2) 2578 6890
Thailand, Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini I Bldg., 239/2 Rajdamri Road., Lumpini, Pathumwan, Bangkok 10330 • Phone (662)651 8311 • Fax (662) 651 8312
United Kingdom, Bio-Rad Laboratories Ltd., The Junction Station Road, Watford, Hertfordshire, WD17 1ET • Phone +44 (0) 1923 471301 • Fax +44 (0) 1923 471340