CoviDetect™ FAST

COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay

In Vitro diagnostisk assay til detektion af SARS-CoV-2

Brugervejledning

Læs venligst disse instruktioner grundigt før brug af PentaBase's CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay. Det anbefales at gemme denne *Brugervejledning til fremtidig brug*. Købere af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er kun bevilget retten til brug men har ikke generelle licens eller patentrettigheder.

CoviDetect™ er et varemærke af PentaBase ApS

PentaBase Aps
Petersmindevej 1A
DK-5000 Odense
www.pentabase.com

Version 1.6
Senest revideret: April 2021

CE IVD

Indholdsfortegnelse

1. Anvendelsesformål....1
2. Resume og forklaring af assayet....1
2.1 Baggrund for anvendelse....1
2.2 Beskrivelse af assayet....1
2.3 Principper bag proceduren....2
3. Reagenser og materialer....2
3.1 CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay reagenser og kontroller....2
3.3 Andre nødvendige materialer....4
3.4 Instrumenter der skal anvendes....4
4. Forholdsregler og håndteringskrav....4
5. Prøveindsamling, transport og opbevaring....5
5.1 Prøveindsamling....5
5.2 Transport og opbevaring....5
6. Procedure....6
6.1 Bemærkninger til proceduren....6
6.2 Reagensforberedelse....6
6.2.1 Dispense Ready....*6*
6.2.2 Ready-To-Use....*6*
6.2.3 Positive og negative kontroller....*6*
6.3 Kørsel af CoviDetect™ FAST COVID-19 RT-qPCR Assay....6
7. Dataanalyse....6
7.1 Instrumenter....7
7.2 Baseline og tærskelværdi-indstillinger....7
7.3.1 Positive prøver....*7*
7.3.2 Negative prøver....*7*
7.3.3 Inkonklusive prøver....*7*
8. Evaluering af ydeevne....7
8.1 Analytisk sensitivitet – Detektionsgrænse....7
8.1.2.2 Falsk-positiv rate af kliniske spytprøver....*9*
8.2 Inklusivitet....10
8.3 Klinisk evaluering....12
9. Begrænsninger....15
10. Troubleshooting....15
11. Bortskaffelse....16
12. Symboler....16
13. Forhandlere og distributører....16

1. Anvendelsesformål

CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay til diagnostisk er en real-time RT (revers transkriptase) PCR-analyse beregnet til kvantitativ detektion af nukleinsyrer fra SARS-CoV-2 virus. SARS-CoV-2 virus RNA findes i biologisk materiale fra øvre og nedre luftveje hos personer smittet med COVID-19. Prøverne kan indsamles ved næse- eller svælgpodning eller fra en spytprøve.

Resultaterne bruges til at detektere SARS-CoV-2 RNA. Positive resultater indikerer en infektion med SARS-CoV-2 virus, men udelukker ikke muligheden for co-infektion med andre vira eller bakterier. Bemærk at infektion med SARS-CoV-2 virus kan ske uden at vise nogen form for symptomer.

Negative RT-PCR-resultater udelukker ikke nuværende eller hindrer fremtidig smitte med SARS-CoV-2 virus eller dens genetiske varianter. Resultatet skal altid kombineres med kliniske observationer, sygdomshistorik og epidemiologisk information.

CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er beregnet til brug af sundhedspersonale eller kvalificeret laboratoriepersonale, som er særligt instrueret og oplært i teknikkerne bag real-time PCR og er kompetente i håndtering af biologiske prøver.

Denne *Brugervejledning* er også tilgængelig som download på vores hjemmeside: www.pentabase.com

2. Resume og forklaring af assayet

2.1 Baggrund for anvendelse

Den 31. december 2019 advarede Kina, Verdenssundhedsorganisationen (WHO), om flere tilfælde af usædvanlig lungebetændesle i byen Wuhan. Denne infektion har siden vist sig at være forårsaget af ny coronavirus, senere kaldet SARS-CoV-2 (svær akut respiratorisk syndrom coronavirus-2) og være årsag til Coronavirussygdommen 2019 (COVID-19). COVID-19 er blevet erklæret for en international sundhedskrise og har forårsaget millioner af bekræftede infektioner hos mennesker. COVID-19 er den første pandemi forårsaget af coronavirus, og med sin høje smitterate og potentielle fare har den resulteret i en signifikant sygdomsrate samt dødelighed over hele verden.

Korrekt påvisning af SARS-CoV-2 RNA er vigtig hos personer der mistænkes for at have en respiratorisk infektion. CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er en molekylær *in vitro* diagnostisk test baseret på PentaBases meget sensitive teknologi, der bruges til at identificere tilstedeværelsen af SARS-CoV-2 RNA hos personer mistænkt for COVID-19. Assayet er udviklet i et multiplexformat, hvilket betyder at én prøve fra én patient kan analyseres i ét rør.

For at imødekomme behovet for hurtigere påvisning af tilstedeværelsen af SARS-CoV-2 blev CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet udviklet med henblik på at kombinere en hurtig analyse med et yderst sensitivt assay, der derved reducerer svartiden signifikant.

2.2 Beskrivelse af assayet

CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet kombinerer Real-Time PCR med PentaBases nye og selektive teknologier som består af både standardDNA oligonukleotider såvel som egne modificerede syntetiske oligonukleotider såsom HydrolEasy™ prober og SuPrimers™. Herved opnås specifik og sensitiv amplifikation af det undersøgte genetiske materiale. Teknologien kan anvendes til mange forskellige Real-Time PCR-instrumenter samt til PentaBases egen portefølje af instrumenter ved brug af standardprocedurer. PentaBase-modificerede oligoer indeholder syntetiske DNA-analoger bestående af et fladt heteroaromatisk og hydrofobisk molekyle samt en linker. Disse modifikationer indsættes i oligonukleotiderne på fikserede positioner under syntese. Ved brug af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet, kan tilstedeværelsen af viralt RNA i en prøve detekteres hurtigt, sensitivt og selektivt med RT-qPCR-analyse.

En HydrolEasy™ probe fungerer ligesom en standard TaqMan® probe ved at den hydrolyseres under PCR kørslen. Den er mærket med en fluorofor i 5'-enden og en quencher i 3'-enden, men er baseret på PentaBase-modificerede oligoer, der giver proben et signifikant bedre signal/støj-forhold, højere specificitet og højere følsomhed sammenlignet med andre konventionelle hydrolyse-prober. HydrolEasy™ prober i CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet er mærket med enten FAM™, HEX™, Texas Red™ eller Cy5™.

SuPrimers™ er standard DNA-primere som er modificeret med en PentaBase. PentaBaser giver øget specificitet og sensitivitet samt reducerer forekomsten af primer-dimere.

2.3 Principper bag proceduren

CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet detekterer tre virale RNA-sekvenser af SARS-CoV-2. Assayet detekterer to regioner i RNA-afhængige RNA-polymerases genet (kaldet IP2 og IP4) og én region i et kappeprotein-gen (kaldet E genet). Selektiv amplificering af IP2, IP4 og E sekvenserne opnås ved at bruge sekvens-specifikke forward- og revers-primere med HydrolEasy™ prober markeret med henholdsvis FAM™, HEX™, og Texas Red™. Selektiv amplificering af RNA intern-kontrol opnås ved brug af ikke-kompetetive sekvens-specifikke forward og revers primere med en Cy5™-markeret HydrolEasy™ probe som ikke har homologi med coronavirus genomet. De amplificerede gentiske regioner detekteres ved kløvning af fluorescens-markerede oligonukleotid-prober som specifikt binder til SARS-CoV-2 eller den humane sekvens af interesse. Et varme- og inhibitorresistent RT-enzym kombineret med et termostabilt DNA-polymerase-enzym bruges til revers transkription og efterfølgende amplificering.

CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet inkluderer SARS-CoV-2 RNA positive og negative kontrolprøver. De er nødvendige i RNA ekstraktionsproceduren og skal inkluderes i hver RT-qPCR kørsel for validering af hele workflowet.

Tabel 1. Liste over detekterede regioner i CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet

Targeteret region	Gen	Fluorofor
IP2	RNA afhængig RNA polymerase genmarkør	FAM™
IP4	RNA afhængig RNA polymerase genmarkør	HEX™
E	Kappeprotein genmarkør	Texas Red™
RNP	Humant RNase P (Podnings- og ekstraktionskontrol)	Cy5™

3. Reagenser og materialer

Materialerne inkluderet i CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay kan ses i Tabel 2. Materialer som skal anvendes, men som ikke er indeholdt i kittet kan ses i Tabel 4 og 5. Reagenshåndtering og opbevaring kan ses i Tabel 3.

Se afsnittet 4. **Forholdsregler og håndteringskrav for yderligere information omkring håndtering af produktet.**

3.1 CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay reagenser og kontroller

Alle uåbnede assay rør og Master Mix skal opbevares som anbefalet i Tabel 3.

Tabel 2. Liste over materialer inkluderet i CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay.

CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay Dispense ready (DR)		
Kit komponenter	**Reagens ingredienser**	**Sikkerhedssymbol og advarsler**
FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay	Syntetisk DNA	Ikke relevant
AmpliSmaRT™ One Step RT-qPCR Master Mix	Ikke relevant	EUH210 Sikkerhedsdatablad tilgængelig ved efterspørgsel
SARS CoV-2 RNA Positiv kontrol	Tris buffer, EDTA, Guanidinium Thiocyanate, 0.125% SDS	EUH210 Sikkerhedsdatablad tilgængelig ved efterspørgsel

		 FARE H302+H332 Farlig ved intagelse eller indånding H314 Forårsager svære ætsninger af huden og øjenskader EUH032 Kontakt med syrer frigiver meget giftig gas. P280 Brug beskyttende handsker/beskyttende tøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. P304+P340+P312 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejrtrækningen lettes. Kontakt GIFTLINJEN/læge i tilfælde af ubehag. VED KONTAKT MED ØJNE Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. 593-84-0 Guanidinium Thiocyanate
SARS CoV-2 RNA Negativ kontrol	DNase/RNase frit medie	Ikke relevant
CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay Ready-To-Use (RTU)		
Kit komponenter	**Reagens ingredienser**	**Sikkerhedssymbol og advarsler**
FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay	Syntetisk DNA	Ikke relevant
SARS CoV-2 RNA Positiv kontrol	Tris buffer, EDTA, Guanidinium Thiocyanate, 0.125% SDS	EUH210 Sikkerhedsdatablad tilgængelig ved efterspørgsel **FARE** H302+H332 Farlig ved indtagelse eller indånding H314 Forårsager svære ætsninger af huden og øjenskader EUH032 Kontakt med syrer frigiver meget giftig gas. P280 Brug beskyttende handsker/beskyttende tøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse. P304+P340+P312 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejrtrækningen lettes. Kontakt GIFTLINJEN/læge i tilfælde af ubehag. VED KONTAKT MED ØJNE Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. 593-84-0 Guanidinium Thiocyanate
SARS CoV-2 RNA Negativ kontrol	DNase/RNase frit medie	Ikke relevant

3.2 Opbevaring og håndtering af reagenser

CoviDetect™ FAST COVID-19 Mutation RT-PCR Assay transporters på tøris eller med fryseelementer. Reagenser skal opbevares og håndteres som angivet i Tabel 3 straks ved ankomst. CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay skal opbevares i original emballage og er stabilt ved -20°C indtil udløbsdatoen. Reagenser der har overskredet sidste anvendelsesdato, som er angivet på emballagen, skal ikke anvendes. Kontakt venligst PentaBase hvis produktets beskyttende emballage er beskadiget ved modtagelsen eller har været transporteret ved ukorrekt temperatur. Vær opmærksom på udløbsdatoen angivet på emballagens etikette. Reagenserne skal bortskaffes efter instruktionerne i Sektion 11.

Ved anvendelse skal assayets komponenter returneres til fryseren direkte efter brug for at minimere tiden ved stuetemperatur. Gentagen optøning skal holdes på et minimum og skal ikke overstige 12 frys/optøningsrunder.

Tabel 3. Reagensopbevaring og reagensudløbsbetingelser

Reagens	Opbevaringstemperatur	Opbevaringstid
CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay **(DR)**	-20°C til -80°C	Stabil indtil den indikerede udløbsdato
AmpliSmaRT™ One Step RT-qPCR Master Mix	-20°C til -80°C	Stabil indtil den indikerede udløbsdato
CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay **(RTU)**	-20°C til -80°C	Stabil indtil den indikerede udløbsdato
CoviDetect™ FAST SARS CoV-2 RNA Positive control	-20°C	Stabil indtil den indikerede udløbsdato
CoviDetect™ FAST SARS CoV-2 RNA Negative control	-20°C	Stabil indti denl indikerede udløbsdato

3.3 Andre nødvendige materialer

Tabel 4. Materialer og forbrugsvarer som skal anvendes, men ikke er inkluderet i kittet

Materialer
Plastikvarer kompatible med PCR-instrumentet
Pipettespidser
Centrifuge til at spinne rør
Nukleasefrit H_2O
Prøveindsamling
Svælgpodning
Næsepodning
Spytopsamlere
Extraction Kit
Viral DNA/RNA Extraction Kit

3.4 Instrumenter der skal anvendes

Tabel 5: Instrumenter

Udstyr
Nukleinsyre ekstraktionssystem
Real-Time PCR-instrument (fire kanaler)

4. Forholdsregler og håndteringskrav

Advarsler og forholdsregler

- Til *in vitro* anvendelse

- Omgå alt biologisk prøvemateriale, inklusiv brugte CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay rør og pipetter, med forsigtighed da de kan overføre smitte. Alt biologisk materiale skal håndteres efter universelle forholdsregler da det ofte er umuligt at vide hvilke prøver der er infektiøse.
- Følg din institutions sikkerhedsprocedurer når der arbejdes med kemikalier og biologisk prøvemateriale.
- God laboratorieadfærd og grundig overholdelse af procedurerne udspecificeret i denne *Brugervejledning* er nødvendig. Brug laboratoriekitler, laboratoriehandsker og øjenbeskyttelse ved håndtering af biologiske prøver og reagenser. Handskerne skal skiftes imellem håndtering af hver biologiske prøve for at undgå kontaminering.
- Fjern handsker og vask hænder grundigt efter håndtering af biologiske prøver og reagenser.
- Brug ikke beskadigede CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay rør.
- Brug ikke CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay pre-overført i et Ready-To-Use rør hvis det har været tabt under åbning.
- Åbn ikke rørene under eller efter amplificering i PCR-programmet
- For yderligere advarsler, forholdsregler og procedurer for at mindske kontamineringsrisiko ved brug af nucleinsyre ekstraktionssystem eller Real-Time PCR-instrumentet, henvises til de respektive brugervejledninger.
- Bortskaffelse af brugte CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay rør, pipettespidser og rør med prøvemateriale skal ske efter lokale og statslige regulativer for risikoaffald.
- Sikkerhedsdataark er tilgængelige ved anmodning hos din lokale PentaBase-repræsentant.
- Grundet den høje sensitivitet i analyserne kan kontaminering af arbejdsområdet fra tidligere prøver være skyld i falske resultater. Vær derfor ekstra opmærksom på ikke at kontaminere reagenser, og håndtering af alle prøver skal ske efter standard laboratorieprocedurer.
- CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay skal beskyttes mod direkte sollys, da assayet indeholder HydrolEasy™ prober.
- Reagenserne skal ikke fortyndes til en lavere koncentration end det er angivet i protokollen. Dette har indflydelse på analysen.
- Udskift ikke reagenserne med andet, da det kan påvirke analysen.
- Prøveindsamling skal udføres ved godkendte podningsmetoder som anbefalet i Tabel 4. Utilstrækkelig eller uhensigtsmæssig prøveindsamling, opbevaring og transport kan føre til ukorrekte eller inkonklusive resultater. BRUG IKKE podepinde lavet af bomuld eller calciumalginat, eller podepinde med træskaft.
- Det skal sikres at der ikke er tegn på lækage fra prøverørene, inden analysen foretages.

5. Prøveindsamling, transport og opbevaring

Bemærk: Alt biologisk materiale og kontroller skal håndteres som prøver, der kan overføre smitte.

5.1 Prøveindsamling

Prøvematerialet skal være oprenset RNA fra nasopharyngeale (næse) eller oropharyngeale (svælg) podninger eller spytprøver. Det anbefales at bruge den samme prøve, hvorfra SARS-CoV-2 blev fundet, til også at undersøge for mutationer. Ineffektiv eller uhensigtsmæssig prøveindsamling kan give falske testresultater. Forudgående undervisning i podning er derfor anbefalet for at sikre den bedste kvalitet.

5.2 Transport og opbevaring

- Transport af indsamlede prøver skal overholde alle gældende regulativer for transport af biologisk materiale.
- Læs brugsanvisningerne for prøvetagningsudstyret og følg disse.
- Biologiske prøver kan normalt opbevares i egnede buffere ved 2-8°C i op til 72 timer efter indsamling.
- Hvis levering og bearbejdning overskrider 72 timer, skal de biologiske prøver normalt opbevares ved -70°C eller lavere.
- Ekstraheret RNA skal altid opbevares ved -70°C eller lavere i RNase-frit miljø

6. Procedure

6.1 Bemærkninger til proceduren

- Brug ikke CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assays, AmpliSmaRT™ One-Step RT-qPCR Master Mix, SARS-CoV-2 RNA positiv kontrol eller SARS-CoV-2 RNA negativ kontrol efter udløbsdato.
- Genanvend ikke komponenterne. De er til engangsbrug

6.2 Reagensforberedelse

6.2.1 Dispense Ready

a. Tilsæt 6 µl 2x AmpliSmaRT™ One-Step RT-qPCR Master Mix til hver PCR-rør/brønd.
b. Tilsæt 1 µl 12x primer/probe multiplex mix til hver PCR-rør/brønd.
c. Tilsæt 5 µl af templaten til hver PCR-rør/brønd. Én patient analyseres i hver PCR-rør/brønd.
d. Luk alle PCR-strips eller forsegl plader.

6.2.2 Ready-To-Use

a. Spin alle PCR-strips eller plader inden tilsætning af template for at sikre at alle reagenser samles i bunden.
b. Tilsæt 5 µl af templaten til hver PCR-rør/brønd. Én patient analyseres i hvert PCR-rør/brønd.
c. Luk alle PCR-strips eller forsegl plader.

6.2.3 Positive og negative kontroller

Positive kontroller (20 kopier/µl) og negative kontroller er inkluderet i CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet og 200 µl skal tilsættes til RNA ekstraktionsprocessen.

Bemærk: Den positive kontrol indeholder Guanidine thiocyanate og SDS og kan ikke tilføjes direkte i CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay, men skal igennem en nukleinsyre-ekstraktionsproces først.

6.3 Kørsel af CoviDetect™ FAST COVID-19 RT-qPCR Assay

a. Spin PCR-strips eller plader for at sikre at alle reagenser samles i bunden af brøndene og for at undgå luftbobler i prøverne.
b. Placér PCR strips eller plader i Real-Time PCR-instrumentet og kør programmet som er vist i Tabel 6.

Tabel 6. RT-qPCR protokol til kørsel af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay.

Protokol	Temperatur [°C]	Tid [sek]	Cykler	Hastighed [°C/sek]	Kanal
Stadie 1					
Hold	52	180	1	8	
Stadie 2					
Hold	95	30	1	8	
Stadie 3 (Cyklus 1-45)					
2-trins amplificering	90 60	1 12	45	8 8	FAM™ (grøn) HEX™/VIC (yellow) Texas Red™ (orange) Cy5™ (red)

7. Dataanalyse

Bestemmelse af cyklus-tærskelværdien (Ct) er en central del af dataanalyseprocessen ved brug af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet. Ct er defineret som den cyklus hvorved det fluorescerende signal for en given analyse krydser tærskelværdien, som er fastsat som en del af analyseprocessen. Ct-værdierne fra PCR programmets Stadie 3 sammenlignes med predefinerede cutoff-værdier for at bestemme, om hver individuel prøve er positiv eller negativ for SARS-CoV-2 (Sektion 8.3). En prøve er gyldig hvis Ct-værdien for den interne kontrol er lavere end 34 eller hvis mindst to af de tre virale targets har Ct-værdier under 41.

7.1 Instrumenter

CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay er designet til at køre på åbne platforme og er blevet valideret på BaseTyper™ (PentaBase), og CFX96 (BioRad) Real-Time PCR instrumenter. Optimale PCR-profiler er udviklet for hvert valideret instrument. Venligst skriv til info@pentabase.com for opdaterede instrument-specifikke instruktioner til brug. For at køre CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay på andre instrumenter skal du selv validere dine indstillinger. Det anbefales at der laves en specifik validering ved at anvende prøver fra patienter og syntetiske kontroller for at sætte tærskelværdier og justeringer korrekt. Kontakt venligst PentaBase eller din lokale distributør for support.

7.2 Baseline og tærskelværdi-indstillinger

Resultater fra CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR kan analyseres ved brug af både automatisk og manuel baseline og tærskelværdi-indstillinger. Hvis automatisk baseline og tærskelværdi-indstillinger bruges, anbefales det også at lave en visuel inspektion af amplifikationskurverne da der i nogle tilfælde er behov for manuel justering af baseline og/eller tærskelværdi pga. baseline afvigelse eller ukorrekt baselining. Når basline indstilles manuelt, anbefales det at bruge intervaller af 5, fx fra cyklus 10 til 15 afhængig af amplifikationskurven for prøven. Når tærskelværdien indstilles manuelt, skal tærsklen indstilles til at krydse i starten af den eksponentielle PCR-fase og over enhver baggrunds- eller baseline fluorescens. Hvis der er signifikant baggrunds- eller baselinefluorescens skal baseline-intervallet justeres. Se evt. Sektion 10 for flere guides til at rette forkerte analyseindstillinger.

7.3 Fortolkning af resultater

En prøve kan enten være positiv, negativ eller inkonklusiv. Resultatet er kun gyldigt, hvis den inkluderede positive kontrols Ct-værdi er under 32 for IP2, IP4 og E, og under 28 for RNaseP intern kontrol. Ingen template (NTC) negativ kontrol skal ikke have nogle Ct-værdier.

7.3.1 Positive prøver

Prøven er positiv for SARS-CoV-2 hvis mindst to Ct-værdier for viralt IP2, IP4 og E er under 41, også selvom RNAse P er negativ. Bemærk at RNase P signalet kan være undertrykt i nogle prøver, og især hvis de indeholder store mængder viralt RNA eller har variationer i deres humane RNAse P gensekvens. En prøve er også positiv hvis mindst to ud af tre af IP2, IP4 og/eller E er positive, når RNAse P er positiv. Desuden er en prøve positiv hvis kun én ud af de tre virus-specifikke analyser viser sig i to uafhængige kørsler, forudsat at intern-, positiv-, og negativ kontroller er gyldige. Manglede signal på enten IP2, IP4 eller E kan skyldes et begrænset indhold af virus eller tilstedeværelse af mutationer i targetregionen for analysen (eller afspejler meget lavt indhold af viral template). I tilfælde af at en prøve konstateres positiv ved at der kun er signal i én eller to af generne (IP2, IP4 og E) anbefales det, at prøven sendes til sekventering og indrapportere den muterede stamme til support@pentabase.com.

7.3.2 Negative prøver

Prøven er negativ for påvisning af SARS-CoV-2 hvis prøven er positiv for RNase P, men negativ for IP2, IP4 og E.

7.3.3 Inkonklusive prøver

I tilfælde af ingen eller sen amplificering af RNase P (Ct ≥ 34), er testen inkonklusiv, medmindre at to ud af de tre virale gener (IP2, IP4 og E) er positive (Ct < 41). Hvis der er mere prøvemateriale tilbage, anbefales det at oprense forfra og køre testen igen. Hvis alle markører er negative efter gentagelse af testen, kan der ikke drages nogen konklusion, og en ny podning skal laves, hvis muligt.

8. Evaluering af ydeevne

8.1 Analytisk sensitivitet – Detektionsgrænse

8.1.1 Svælgpodning

Grænsen for detektering af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet er blevet evalueret ved at tilsætte syntetisk SARS-CoV-2 RNA (Twist Bioscience, Cat. no. 102015) til en negativ klinisk svælgpodningsprøve. Baseret på en indledende fortyndingsserie, blev 3000, 1500 og 750 kopier af SARS-CoV-2 RNA tilsat i 3 ml af 20-24 svælgpodningsprøver. RNA blev ekstraheret ved anvendelse af BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction Instrument og tilhørende Viral DNA/RNA Extraction Kit (Tabel 7).

Tabel 7. Detektionsgrænse for CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ved brug SARS-CoV-2 RNA tilsat til en orofaryngeal matrix. RNA blev ekstraheret ved brug af BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction Instrument.

RNA (kopier/ml)	Observationer (n)	Sekvens	Positive	Positive (%)
0	20	IP2	0	0
		IP4	0	0
		E	0	0
		IP2 eller IP4 eller E	0	0
0.25	24	IP2	11	46
		IP4	2	8.3
		E	13	54
		IP2 eller IP4 eller E	18	75
0.5	20	IP2	14	70
		IP4	2	10
		E	11	55
		IP2 eller IP4 eller E	16	80
1.0	20	IP2	18	90
		IP4	4	20
		E	17	85
		IP2 eller IP4 eller E	20	100

Detektionsgrænsen for CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ved brug af BaseTyper™ Real-Time PCR-instrument (Tabel 8) eller CFX96 instrument (Tabel 9), uafhængig af ekstraktionsmetoden, blev bestemt ved brug af SARS-CoV-2 RNA fortyndet i en 25 ng vildtype human genomisk DNA baggrund.

Tabel 8: Detektionsgrænse for CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ved brug af SARS-CoV-2 RNA tilsat til vildtype humant RNA. RT-qPCR af SARS-CoV-2 RNA blev udført ved brug af BaseTyper™ Real-Time PCR-instrument.

RNA (kopier pr reaktion)	Observationer (n)	Sekvens	Positive	Positive (%)
0	26	IP2	0	0
		IP4	0	0
		E	0	0
		IP2 eller IP4 eller E	0	0
2	22	IP2	11	50
		IP4	1	4.5
		E	6	27.3
		IP2 eller IP4 eller E	16	72.7
5	22	IP2	18	81.8
		IP4	8	36.4
		E	22	100
		IP2 eller IP4 eller E	22	100
10	23	IP2	18	78.3
		IP4	20	87.0
		E	23	100
		IP2 eller IP4 eller E	23	100
20	24	IP2	24	100
		IP4	24	100
		E	24	100
		IP2 eller IP4 eller E	24	100

Tabel 9: Detektionsgrænse for CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ved brug af SARS-CoV-2 RNA tilsat til vildtype humant RNA. RT-qPCR af SARS-CoV-2 RNA blev udført ved brug af CFX96 instrument.

RNA (kopier per reaktion)	Observationer (n)	Sekvens	Positive	Positive (%)
0	20	IP2	0	0
		IP4	0	0
		E	0	0
		IP2 eller IP4 eller E	0	0
2	20	IP2	10	50
		IP4	2	10
		E	10	50
		IP2 eller IP4 eller E	13	65
5	20	IP2	16	80
		IP4	3	15
		E	19	95
		IP2 eller IP4 eller E	20	100
10	20	IP2	19	95
		IP4	19	95
		E	19	95
		IP2 eller IP4 eller E	19	95

8.1.2 Spytmatrix

Grænsen for detektering af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet er blevet evalueret ved at tilsætte syntetisk SARS-CoV-2 RNA (Twist Bioscience, Cat. no. 102015) til en negativ klinisk spytprøve. Baseret på en indledende fortyndingsserie, blev 6000, 300 og 1500 kopier af SARS-CoV-2 RNA tilsat i 6 ml af 20-24 spytprøver. RNA blev ekstraheret ved anvendelse af BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction Instrument og tilhørende Viral DNA/RNA Extraction Kit (Tabel 10).

Tabel 10. Detektionsgrænse for CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ved brug af SARS-CoV-2 RNA tilsat til vildtype humant RNA. RT-qPCR af SARS-CoV-2 RNA blev udført ved brug af BaseTyper™ Real-Time PCR-instrument.

Kopier/µl medie	Observationer (n)	Sekvens	Positive	Positive (%)
0	**20**	**IP2**	**0**	**0**
		IP4	**0**	**0**
		E	**0**	**0**
		IP2 or IP4 or E	**0**	**0**
0.25	**20**	**IP2**	**5**	**0**
		IP4	**0**	**0**
		E	**7**	**0**
		IP2 or IP4 or E	**10**	**50**
0.5	**20**	**IP2**	**8**	**40**
		IP4	**0**	**0**
		E	**9**	**45**
		IP2 or IP4 or E	**14**	**70**
1.0	**20**	**IP2**	**14**	**70**
		IP4	**2**	**10**
		E	**13**	**65**
		IP2 or IP4 or E	**19**	**95**

8.1.2.2 Falsk-positiv rate af kliniske spytprøver

Falsk-positiv raten af kliniske spytprøver blev evalueret på 120 spytprøver fra ikke-inficerede individer. RNA blev ekstraheret ved anvendelse af Viral DNA og RNA Extraction Kit til BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction Instrumentet. Alle 120 spytprøver blev fundet SARS-CoV-2-negative ved anvendelse af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay. RNP signalet i den interne kontrol blev fundet til Ct<34.

8.2 Inklusivitet

CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay oligonukleotid-sekvenser er blevet alignet med Global SARS-CoV-2 sekvenser fra GISAID (Totalt 229.993 sekvenser). Mismatch-frekvensen viste sig at være mindre end 5% (1.7%).

IP2 Forward primer

```
CCTGTTGCACTACGACAGA
|||||||| |||||||||  >hCoV-19/India/GJ-GBRC-379/2020|EPI_ISL_524738|
||||| |||||||||||||  >hCoV-19/Wuhan/HB-WH4-200/2020|EPI_ISL_454952|
|||||||| ||||||||||  >hCoV-19/Japan/PG-0010/2020|EPI_ISL_479797|
|||||||||||| |||||  >hCoV-19/Australia/VIC16095/2020|EPI_ISL_640440|
|||||||| ||||||||||  >hCoV-19/England/ALDP-B1A0BD/2020|EPI_ISL_645731|
|||||||||| |||||||  >hCoV-19/England/LIVE-DB2BA5/2020|EPI_ISL_651355|
|||||||| |||||||||  >hCoV-19/England/ALDP-B1A545/2020|EPI_ISL_647546|
```

IP2 Revers Primer

```
GTAGTAAGCTAACGCATTGTCA
|||||||||||| |||||||||  >hCoV-19/South_Africa/KRISP-K002815/2020|EPI_ISL_602636|
|||||||||||| |||||||||  >hCoV-19/South_Africa/KRISP-0574/2020|EPI_ISL_498112|
||||| ||||||||||||||||  >hCoV-19/Singapore/739/2020|EPI_ISL_524446|
|||||||| ||||||||||||  >hCoV-19/Bangladesh/BCSIR-NILMRC-374/2020|EPI_ISL_514250|
|||||||||||| ||||||||  >hCoV-19/Lebanon/LAU4-53460/2020|EPI_ISL_637113|
|||||||||||| |||||||||  >hCoV-19/Ecuador/USFQ-520/2020|EPI_ISL_660539|
|||||||||||| |||||||||  >hCoV-19/Italy/APU-IZSPB_297PT/2020|EPI_ISL_653791|
```

IP2 Probe

```
CTTGTGCTGCCGGTACTA
||| |||||||||||||  >hCoV-19/India/MH-NIV-6285/2020|EPI_ISL_454541|
|||||||||| |||||||  >hCoV-19/India/MH-GA97/2020|EPI_ISL_511940|
|||||||||| |||||||  >hCoV-19/Japan/TKYT22342/2020|EPI_ISL_649126|
|||||||||||| |||||  >hCoV-19/India/DL-5504375-CSIR-IGIB/2020|EPI_ISL_636787|
|||||||||| |||||||  > hCoV-19/Japan/TKYT22342/2020|EPI_ISL_649126|
||||||| ||||||||||  >hCoV-19/Brazil/PE-IAM1468/2020|EPI_ISL_572396|
|||| ||||||||||||  >hCoV-19/Colombia/COR-GVI-97527/2020|EPI_ISL_447817|
|||||||||||| ||||  >hCoV-19/Australia/VIC4465/2020|EPI_ISL_519761|
```

IP4 Forward primer

```
GGTAACTGGTATGATTTCGGTGA
|||||||||||||||| |||||  >hCoV-19/South_Africa/KRISP-K002609/2020|EPI_ISL_535473|
|||||| ||||||||||||||||  >hCoV-19/South_Korea/CNUHV03/2020|EPI_ISL_479662|
|||||||||| ||||||||||  > hCoV-19/Bangladesh/BCSIR-NILMRC-364/2020|EPI_ISL_514237|
|||||||||||||||| |||||  > hCoV-19/India/KA-nimh-14834/2020|EPI_ISL_515958|
|||| ||||||||||||||||||  >hCoV-19/Australia/VIC4989/2020|EPI_ISL_519793|
|||| ||||||||||||||||||  >hCoV-19/Australia/VIC5603/2020|EPI_ISL_518418|
|||| ||||||||||||||||||  >hCoV-19/Australia/VIC17519/2020|EPI_ISL_663319|
```

IP4 Revers Primer

```
CCTGGTCAAGGTTAATATAGGCA
```

```
|||||||||||||||||| |||||  >hCoV-19/South_Africa/R05475/2020|EPI_ISL_435059|
|||||||| ||||||||||||||  > hCoV-19/India/OR-ILSCV32652/2020|EPI_ISL_481160|
|||| ||||||||||||||||||  >hCoV-19/Singapore/794/2020|EPI_ISL_512830|
|||| ||||||||||||||||||  >hCoV-19/Singapore/841/2020|EPI_ISL_518005|
|||||||||| ||||||||||||  >hCoV-19/Ecuador/52255/2020|EPI_ISL_491952|
|||| ||||||||||||||||||  >hCoV-19/Australia/VIC2134/2020|EPI_ISL_480732|
|||||||||||||||| ||||||  >hCoV-19/Australia/NSW1130/2020|EPI_ISL_593743|
|||||||||||||||| ||||||  >hCoV-19/Australia/VIC7844/2020|EPI_ISL_564695|
```

IP4 Probe

```
CATACAAACCACGCCAGGTAG
|||||||||||| ||||||||  >hCoV-19/South_Africa/KRISP-K003360/2020|EPI_ISL_602751|
|||||||||||||| ||||||  >hCoV-19/Gambia/GC192789/2020|EPI_ISL_561145|
|||||||||||| ||||||||  >hCoV-19/bat/Yunnan/RaTG13/2013|EPI_ISL_402131|
||||||||| ||||||||||  >hCoV-19/Indonesia/JI-NIHRD-PME2054/2020|EPI_ISL_538499|
|||||||||||| |||||||  >hCoV-19/United_Arab_Emirates/H9/2020|EPI_ISL_528721|
|||||||||||| ||||||||  >hCoV-19/Suriname/SR-62/2020|EPI_ISL_518811|
|||||||||||||| ||||||  >hCoV-19/Brazil/MG-0216/2020|EPI_ISL_470582|
|||||||||||||| ||||||  >hCoV-19/Australia/VIC1365/2020|EPI_ISL_456411|
|||||||||||||||| ||||  >hCoV-19/Australia/NSW145/2020|EPI_ISL_427708
|||||||||| |||||||||  >hCoV-19/Australia/SAP380/2020|EPI_ISL_492145|
```

E Forward Primer

```
GACAGGTACGTTAATAGTTAATAGC
|||||||||||||||||||| |||||  >hCoV-19/DRC/4012/2020|EPI_ISL_471402|
|||||||||| ||||||||||||||  >hCoV-19/India/UT-50464-CSIR-IGIB/2020|EPI_ISL_636759|
|||||||||||||||| |||||||  >hCoV-19/India/TG-NIV-906/2020|EPI_ISL_547877|
|||||||||||||||||| ||||||  >hCoV-19/Brazil/RJ-2669/2020|EPI_ISL_467353|
||||||| ||||||||||||||||  > hCoV-19/England/CAMB-1BA49F/2020|EPI_ISL_664983|
||||||| ||||||||||||||||  > hCoV-19/England/CAMB-1BB65C/2020|EPI_ISL_665016|
|||||||||||||||||||| |||  > hCoV-19/England/CAMC-B21596/2020|EPI_ISL_647538|
|||||||||||||||||||| |||||  > hCoV-19/England/QEUH-AAEADF/2020|EPI_ISL_652982|
```

E Revers Primer

```
CAGCAGTACGCACACAATC
||||||||| |||||||||  >hCoV-19/Mali/M002659/2020|EPI_ISL_487451|
||||| ||||||||||||  >hCoV-19/DRC/299/2020|EPI_ISL_420840|
||||| ||||||||||||  >hCoV-19/Thailand/Bangkok_323/2020|EPI_ISL_447916|
|||||||| ||||||||||  >hCoV-19/Singapore/1383/2020|EPI_ISL_648737|
||||||||| |||||||||  >hCoV-19/Argentina/argenTAG-12CF5045/2020|EPI_ISL_648212|
||||| ||||||||||||  >hCoV-19/Australia/VIC6036/2020|EPI_ISL_518077|
|||||||| ||||||||||  >hCoV-19/Australia/VIC15000/2020|EPI_ISL_593099|
||||| ||||||||||||  >hCoV-19/USA/NY-NYUMC259/2020|EPI_ISL_428773|
||||||||| |||||||||  >hCoV-19/USA/WA-S296/2020|EPI_ISL_430150|
```

E Probe

```
CTTTCGTGGTATTCTTGCTAG
|||  ||||||||||||||||  >hCoV-19/South_Africa/KRISP-K005335/2020|EPI_ISL_678623|
|||  ||||||||||||||||  >hCoV-19/South_Africa/KRISP-K005332/2020|EPI_ISL_678620|
|||||||||  |||||||||  >hCoV-19/India/TG-CCMB-K600B/2020|EPI_ISL_447581|
|||||||||||||||  ||||  >hCoV-19/Singapore/1283/2020|EPI_ISL_648768|
|||||||||  |||||||||  >hCoV-19/India/UT-AR8/2020|EPI_ISL_508205|
||||||  ||||||||||||||  >hCoV-19/Brazil/PE-IAM1126/2020|EPI_ISL_572379|
||||  ||||||||||||||||  >hCoV-19/Brazil/PE-IAM109/2020|EPI_ISL_572334|
||||  ||||||||||||||||  >hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-0126/2020|EPI_ISL_568522|
|||||||||  |||||||||  >hCoV-19/Australia/NSW335/2020|EPI_ISL_451597|
||||||||||||||||||||  >hCoV-19/Australia/VIC8638/2020|EPI_ISL_565125|
```

De følgende angivelser viste sig at indeholde mismatch mutationer i mere end én primer/probe sekvens. Da ingen angivelser med variation blev fundet i mere end to CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR oligonukleotider i ca. 200.000 offentliggjorte SARS-CoV-2 sekvenser, vurderer vi at det er usandsynligt at CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay ikke vil være i stand til at genkende aktuelle emner grundet sekvens mismatch.

Mismatch mutation in IP4.Rv1b and IP2.Fw2:

hCoV-19/India/GJ-GBRC-379/2020|EPI_ISL_524738|2020-06-18

Mismatch mutation in IP4.Probe1a and E.Probe2:

hCoV-19/USA/CA-ALSR-4459/2020|EPI_ISL_649042|

hCoV-19/England/ALDP-AA3C2F/2020|EPI_ISL_624440|

hCoV-19/England/ALDP-AA3C98/2020|EPI_ISL_624524|

hCoV-19/England/QEUH-B0E8B4/2020|EPI_ISL_642081|

hCoV-19/England/QEUH-B0F983/2020|EPI_ISL_641977|

hCoV-19/England/QEUH-B10BD4/2020|EPI_ISL_642584|

hCoV-19/Scotland/CVR5812/2020|EPI_ISL_666030|

Mismatch mutation in IP4.Rv1b and E.Probe2:

hCoV-19/England/QEUH-9F3395/2020|EPI_ISL_588625|

Mismatch mutation in IP2.Probe2 and IP2.Fw2:

hCoV-19/England/ALDP-B1A545/2020|EPI_ISL_647546|

Mismatch mutation IP2.Probe2 and E.Probe2:

hCoV-19/Czech_Republic/NRL-10208/2020|EPI_ISL_660583|
hCoV-19/Czech_Republic/NRL-10207/2020|EPI_ISL_660573|

8.3 Klinisk evaluering

8.3.1 Svælgpodning

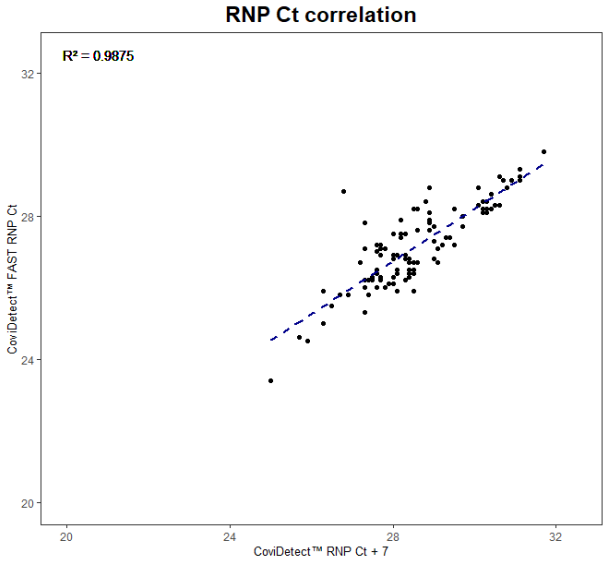
Den kliniske evaluering af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay blev udført ved at bruge overskydende materiale fra svælgpodninger. De biologiske prøver blev analyseret for tilstedeværelsen af SARS-CoV-2 ved at bruge CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet. Prøverne blev ligeledes analyseret med CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay. Ekstraheringen af RNA blev udført ved at bruge Viral DNA og RNA Extraction Kit til BasePurifier™

Nucleic Acid Extraction Instrumentet. RT-qPCR blev udført ved at bruge BaseTyper™ Real-Time PCR Instrument. Analysen blev foretaget med automatiske baseline- og tærskelværdi-indstillinger. Evalueringsresumé er vist i Tabel 10.

Tabel 11. Resumé af kliniske evaluering af CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR versus CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR.

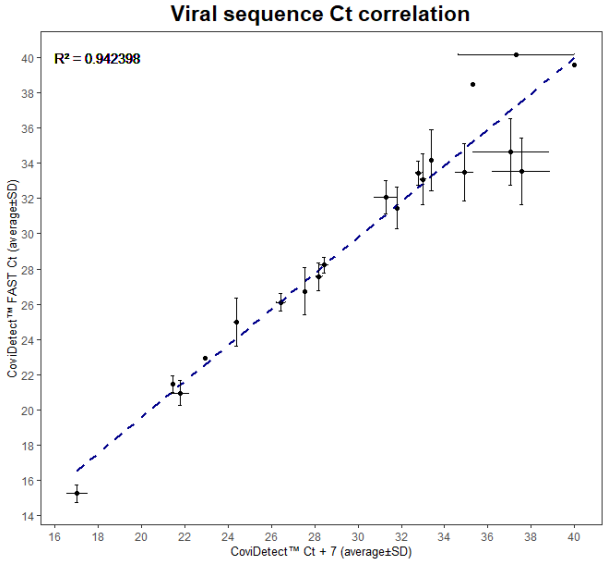
	Assay	CoviDetect™	CoviDetect™ FAST	Overensstemmelse
Oropharyngeale podninger	SARS-CoV-2 positiv	20	20	100% (PPA)
	SARS-CoV-2 negativ	44	44	100% (NPA)

RNP Ct værdierne fra CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay sammenlignet med CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay (Ct + 7) af fastslåede positive og negative prøver er illustreret i Figur 1.



Figur 1. Korrelation mellem intern kontrol human RNP Ct-værdier fra CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR og CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR ved oropharyngeale (svælg) podninger.

Korrelation mellem gennemsnitlig IP2, IP4 og E sekvensernes Ct-værdier fra CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay og CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayets gennemsnitlige N1 og N2 sekvenser Ct (+ 7) værdier er illustreret i Figur 2.



Figur 2. Korrelation **mellem gennemsnitlige Ct-værdier** (±SD) for virale sekvenser mellem CoviDetect™ COVID-19 Multiplex RT-qPCR og CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR ved kliniske oropharyngeale (svælg) podninger.

8.3.1 Spytprøve

Klinisk evaluering af spytprøver versus svælgpodning blev analyseret for tilstedeværelsen af SARS-CoV-2 hos 361 individer ved anvendelsen af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR (Tabel 12). Ekstraheringen af RNA blev udført ved at bruge Viral DNA og RNA Extraction Kit til BasePurifier™ Nucleic Acid Extraction Instrumentetet. RT-qPCR blev udført ved at bruge BaseTyper™ Real-Time PCR Instrumentet. Analysen blev foretaget med automatiske baseline- og tærskelværdi-indstillinger. Evalueringsresumé er vist i Tabel 12.

Tabel 12. SARS-CoV-2 positive og negative prøver fra svælgpodning og spyt.

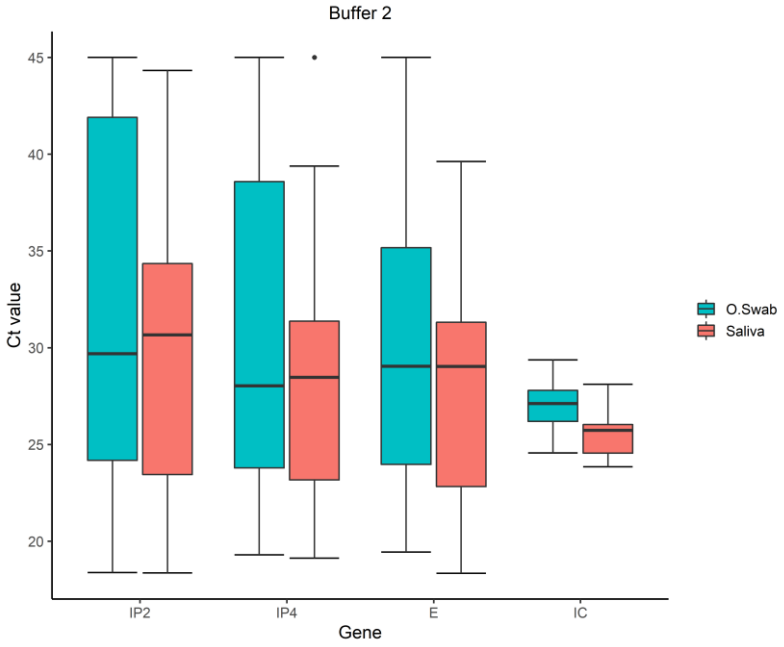
SARS-CoV-2 positive og negative prøver fra svælgpodning og spyt			
	Svælgpodning	**Spyt**	**Overensstemmelse**
SARS-CoV-2 positive	26	28	25
SARS-CoV-2 negative	332	329	329
Invalid prøver	0	3*	-

* Tre SARS-CoV-2 negative spytprøver blev fundet invalide.

Af de 361 testede individer blev 29 fundet positive for SARS-CoV-2 og 332 fundet negative ved anvendelse af enten svælgpodning, spytprøve eller begge prøvetagningsmetoder.

En prøve blev fundet SARS-CoV-2 positiv ved anvendelse af svælgpodning og negativ ved spytprøve. Tre prøver blev fundet SARS-CoV-2 positive ved spytprøve og negative ved svælgpodning. Specificiteten var 100% for begge prøvetagningsmetoder. Sensitiviteten var højere ved brug af spytprøver (96,6%) sammenlignet med svælgpodning (89.7%)

Boxplottet (Figur 3) illusterer at de gennemsnitlige Ct-værdier for de tre SARS-CoV-2 specifikke gener er meget ens for begge prøvetagningsmetoder. Den gennemsnitlige Ct-værdi for spytprøverne observeres at være lavere på den interne kontrol (IC) sammenlignet med svælgpodning. Dog observeres en højere standardafvigelse for svælgpodningsprøver for de SARS-CoV-2 specifikke gener.



Figur 3. Boxplot for Ct-værdier for tre SARS-CoV-2 specifikke gener (IP2, IP4 og E) for n=29 SARS-CoV-2 positive prøver. Data er grupperet som prøver taget ved svælgpodning (O. Swab) og spytprøve (Saliva). Gennemsnitlige Ct-værdier er ens for svælgpodningsprøver spytprøver for de virusspecifikke gener.

9. Begrænsninger

- Udførsel af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assayet har kun været testet på biologiske prøver fra nasopharyngeale (næse) og oropharyngeale (svælg) podninger.
- Et negativt test-resultat udelukker ikke infektion med SARS-CoV-2, og behandling af en patient skal ikke udelukkende baseres på testresultatet. Det kan være nødvendigt at indsamle flere podninger på forskellige tidspunkter fra samme patient for at detektere virussen, da det er uvist hvornår det virale niveau i kroppen er højest.
- Ukorrekt prøveindsamling, transport og håndtering af prøverne kan give falsk-negative testresultater. En lav mængde virus RNA i prøven eller amplificeringsinhibitorer kan også give falsk-negative testresultater
- Hvis der er mutationer i den targeterede region af virus kan det have indflydelse på sensitiviteten af testen og kan resultere i falsk-negative resultater.
- Testen kan ikke udelukke at patienten er inficeret med andre vira eller bakterier

10. Troubleshooting

Troubleshooting-guiden besvarer nogle af de mest stillede spørgsmål og problemer som kan opstå ved brug af CoviDetect™ FAST COVID-19 Multiplex RT-qPCR Assay samt hvordan disse bør løses.

Tabel 9. Troubleshooting guide

Problem	Solution
Intet ekstraktions-kontrol signal	Sørg for at PCR-programmet er korrekt sat op og at instrumentet måler på FAM™, HEX™, Texas Red™ og Cy5™ kanalerne ved trin 2 i Stadie 3.
Intet prøve-signal	Koncentrationen eller kvaliteten af RNA i prøven er for lav. Tilsæt mere prøve hvis muligt, eller indsaml nyt prøvemateriale fra en ny podning.
Signal i negativ kontrol	Sørg for at tærskelværdi er sat korrekt over baggrundsfluorescensen. I tilfælde af baggrundsfluorescens kan reagenserne være kontaminerede. Find grunden til kontaminering ved at tjekke og/eller fjerne alle potentielle kilder til kontaminering fx. pipetter og instrumenter. Hvis kontamineringen ikke kan lokaliseres, kontakt venligst PentaBase eller din lokale distributør.
Baseline drift	Baseline drift ses som et langsomt stigende signal på amplificeringsgrafen med ingen eller sen eksponentiel fase. Baseline drift kan ske hvis baselining ikke har været tilstrækkelig. Det kan rettes

	ved at justere baseline intervallet manuelt eller inkludere baseline-drift-korrektion som en del af analyseindstillingerne. I begge tilfælde skal amplificeringskurven alignes så tæt på baseline som muligt og må ikke ligge under nogen efterfølgende eksponentiel fase. Prøven skal køres om, hvis baseline drift ikke kan rettes og/eller der er nogen tvivl om kvaliteten af amplificeringskurven.

11. Bortskaffelse

Bortskaffelse af ubrugte kit-reagenser, biologiske prøver eller post-amplificerede PCR-rør eller plader skal ske efter lokale og statslige regulativer.

12. Symboler

Følgende symboler er brugt til mærkning af CoviDetect™ COVID-19 RT-qPCR produkter.

Table 12. Symboler brugt til mærkning af CoviDetect™ COVID-19 RT-qPCR produkter.

Fremstillingsdato

tro-diagnostisk medicinsk udstyr

Sidste anvendelsesdato

Genbrug ikke

Indeholder tilstrækkelig til <*n*>

Producent

Temperaturgrænse

Overensstemmelse af CE-mærkning: denne enhed er i overensstemmelse med krav til CR for in vitro-diagnostisk medisk udstyr

Se brugsanvisningen

13. Forhandlere og distributører

For teknisk assistance i Danmark kontakt venligst Forhandler PentaBase ApS:

Petersmindevej 1A
DK-5000 Odense, Danmark
Telefon: (+45) 36 96 94 96

Email**:** support@pentabase.com
Hjemmeside**:** www.pentabase.com

For teknisk assistance i alle andre lande, kontakt venligst din lokale distributør. En fuldendt liste over distributører er tilgængelig på: www.pentabase.com.