

SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit (IVD)

Kvalitatiivne analüüs kasutamiseks reaalaaja RT-qPCR seadmetel



Kasutusjuhend



08-85-00100 SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit 100 rxn

08-85-00400 SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit 400 rxn

Ensüümide segu 1

Ensüümide segu 2

Praimeri/sondi segu

Positiivne kontroll

Nukleasivaba vesi



SOLIS BIODYNE OÜ

A: Teaduspargi 9, 50411 Tartu, Estonia
REG NO: 10242922



Sisukord

Sisukord	2
1. Kasutusotstarve	3
2. Testi kokkuvõte ja kirjeldus	3
3. Analüüsikomplekti kirjeldus ja sisu	4
4. Säilitamisjuhised	5
5. Täiendavad vajalikud reagentid ja vajalikud seadmed	5
6. Ettevaatusabinõud ja hoiatused	5
7. Proovide võtmine ja RNA eraldamine	6
8. Testi töövoog	7
8.1 Töökoha ettevalmistus	7
8.2 Reaktsioonisegu valmistamine	7
8.3 Reaalaja PCR-i seadme ja signaali tuvastamise kanalite seadistamine	8
8.4 Kvaliteedikontroll ja tulemuste tõlgendamine	9
9. Meetodi piirangud	12
10. Analüütilised toimivusnäitajad	12
10.1 Analüütiline tundlikkus ehk avastamispiir	12
10.2 Analüütiline spetsiifilisus	13
10.3 Inklusiivsus või analüütiline reaktiivsus	16
10.4 Kliiniline tundlikkus ja spetsiifilisus	19
11. Utiliseerimine	20
12. Versiooni haldus	20
13. Solis BioDyne kvaliteedikontrollisüsteem	20
14. Tehniline tugi	21
15. Kaubamärgid ja õigusalsed märkused	21
16. Sümbolite loetelu	21
17. Viited	22

1. Kasutusotstarve

SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit on *in vitro* kvalitatiivne diagnostiline test, mis on mõeldud ägeda raskekujulise respiratoorse sündroomiga koroonaviiruse (SARS-CoV-2) geneetilise materjali tuvastamiseks bioloogilistes proovides, mis on võetud ülemistest hingamisteedest (nina või ninaneelu kaaped).

Analüüsikomplekt SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit sisaldab praimereid ja kahekordselt märgistatud hüdrolüüsisonde, samuti kontrollmaterjali SARS-CoV-2 RNA *in vitro* kvalitatiivseks tuvastamiseks reaallaja RT-PCR meetodil.

Analüüsikomplekt on mõeldud professionaalseks kasutamiseks kvalifitseeritud ja väljaõppinud kasutajatele diagnostikalaboris, kus järgitakse kehtivaid ohutusstandardeid ja on olemas sobivad seadmed.

2. Testi kokkuvõte ja kirjeldus

Koroonaviirushaigus COVID-19 on nakkushaigus, mida põhjustab ägeda raskekujulise respiratoorse sündroomiga koroonaviirus (SARS-CoV-2). COVID-19 sümptomid on erinevad, sealhulgas palavik, peavalu, halb enesetunne, lihasvalu ning respiratoorsed sümptomid nagu köha, hingeldus ja hüpokseemia.

SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit on molekulaarne *in vitro* diagnostiline test SARS-CoV-2 RNA avastamiseks bioloogilistes proovides, mis on võetud ülemistest hingamisteedest (nina- või ninaneelu kaaped).

Reaallaja RT-PCR käigus sünteesitakse pöördtranskriptaasi (RT) abil patogeeni RNA-st komplementaarne DNA (cDNA), millelt omakorda reaallaja PCR-i käigus amplifitseeritakse tuvastatavas koguses patogeeni järjestused märklaudspetsiifiliste primerite ja hüdrolüüsisondide abil.

Analüüsikomplekt on mõeldud SARS-CoV-2 genoomi kolme erineva piirkonna samaaegseks tuvastamiseks, milleks on: nukleokapsiidi geen (N, tuvastatakse FAM kanalis), ümbrise geen (E, tuvastatakse HEX kanalis) ja RNA-sõltuv RNA polümeraasi geen (RdRP, tuvastatakse ROX kanalis), samuti inimese RNAas P transkript (RPP30, tuvastatakse Cy5 kanalis). Inimese RNAas P analüüs on mõeldud ainult mRNA transkriptide tuvastamiseks (inimese genoomset DNA-d ei amplifitseerita) ja toimib testi sisemise kontrollina, mida kasutatakse proovi võtmise ja RNA eraldamise, RNA ning PCR-i amplifitseerimise protsesside jälgimiseks, vähendades sellega valenegatiivseid tulemusi.

3. Analüüsikomplekti kirjeldus ja sisu

Tabel 1. SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit komponendid

Tootesilt	Põhikomponendid	Kogus, 100 reaktsiooni	Kogus, 400 reaktsiooni	Korgi värv
Ensüümide segu 1	HOT FIREPol® DNA polümeraas, reaktsioonipuhver, dNTPd	1 x 440 µL	2 x 880 µL	Pruun
Ensüümide segu 2	SOLIScript® Reverse Transcriptase, RiboGrip™ RNAasi inhibiitor	1 x 55 µL	1 x 220 µL	Kollane
Praimeri/sondi segu	Praimerid ja fluorestseeruvalt märgistatud sondid SARS-CoV-2 piirkondade jaoks N (FAM), E (HEX), RdRP (ROX) geenides, inimese RNAas P mRNA (Cy5) jaoks	1 x 110 µL	1 x 440 µL	Sinine
Positiivne kontroll	dsDNA positiivne kontroll, mis sisaldab SARS-CoV-2 genoomi piirkondade N, E ja RdRP spetsiifilisi järjestusi	1 x 80 µL	1 x 320 µL	Roheline
Nukleasivaba vesi	RNAasi-/DNAasivaba PCR-i puhtusastmega vesi	1 x 1.25 mL	2 x 1.50 mL	Läbipaistev

Fluorestsents emiteeritakse ja salvestatakse individuaalselt optiliste mõõtmiste abil termotsükli ajal. Amplifitseeritud fragmendi tuvastamine toimub fluoromeetriga.

Tabel 2. Fluorestsentsi kanalite seaded

Märklaud	Optiline kanal	Ergastus	Emissioon
N geen	FAM	450-490 nm	510-530 nm
E geen	HEX/VIC/JOE	515-535 nm	560-580 nm
RdRP geen	Texas Red/ROX	560-590 nm	610-650 nm
RPP30 geen (sisemine kontroll)	Cy5	620-650 nm	675-690 nm

4. Säilitamisjuhised

- Analüüsikomplekti võib säilitada -20°C juures kuni sildil märgitud aegumistähtajani.
- Analüüsikomplekti võib säilitada +4°C juures kuni 1 kuu.
- Külmutamis-/sulatamistsükleid tuleb minimeerida, lubatud on kuni 5 külmutamis-/sulatamistsükli. Vajadusel võib reagente laiali villida ning säilitada -20 °C juures.
- Analüüsikomplekti komponentide laialivillimine vähendab vajadust katsutite taasavamiseks ning seeläbi komponentide saastumise ohtu.
- Praimeri/sondi segu säilitada valguse eest kaitstult.

5. Täiendavad vajalikud reagensid ja vajalikud seadmed

Järgnev loend sisaldab seadmeid ja materjale, mis on vajalikud analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit kasutamiseks, kuid ei sisaldu selles.

- RNA eraldamise komplekt.
- Reaalaja PCR-i seade (termotsükler).
- Tsentrifuug 1.5 ml katsutite jaoks ja PCR-i tuubid või PCR-i plaat.
- Laborisegaja (keerissegaja, *vortex*, või sellele sarnane seade).
- Ühe- ja mitmekanalilised reguleeritavad mikropipetid (1,00 µl kuni 1000,0 µl).
- DNAasi- ja RNAasivabad filterotsikud mikropipettide jaoks.
- Pulbrivabad ühekordsed kindad ja teised isikukaitsevahendid.

Analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit on testitud ja valideeritud järgmistel seadmetel: Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

6. Ettevaatusabinõud ja hoiatused

- Bioloogilisi proove tuleb alati käsitseda kui potentsiaalselt nakkusohtlikku materjali, otsest kokkupuudet bioloogilise materjaliga tuleb vältida.
- Proove tuleb töödelda järgides riiklikke bioloogilise ohutuse määruseid ning Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) soovitatavaid bioohutuse ja bioturvalisuse juhiseid [1].
- Kõiki analüüsikomplektiga tehtavaid töid peavad läbi viima kvalifitseeritud ja väljaõppinud kasutajad. Tööd tuleb teha diagnostikalaboris, kus järgitakse kehtivaid ohutusstandardeid ning kasutusel on sobivad seadmed.
- Ärge segage omavahel erinevatest analüüsikomplektidest ja/või partiidest pärit reagente.
- Ärge segage omavahel erinevate tarnijate reagente.
- Vajadusel tutvuge analüüsikomplekti ohutuskaartidega.

- Testimise töövoo iga etapi jaoks kasutage selleks ettenähtud ruume: nukleiinhappe eraldamine, amplifikatsioonireaktsioonide ettevalmistamine, reaktsioonide amplifitseerimine ja tuvastamine.
- Ärge viige proove, seadmeid ega reagente tagasi alasse, kus toimus töövoo eelmine etapp.
- Igas ruumis tuleb kasutada ettenähtud seadmeid, tarvikuid ja isikukaitsevahendeid (laborikitlid, ühekordsed kindad, silmakaitsevahendid jne).
- Järgige hea laboritava nõudeid ja korda. Kandke kaitseriietust, kasutage ühekordseid kindaid, prille ja maski. Laboriruumides ärge sööge, jooge, suitsetage ega kasutage kosmeetikatooteid.
- Puhastage seadmeid ja pindu pärast iga kasutamist värskelt valmistatud 10% valgendi lahusega (või sarnase nukleiinhappeid eemaldava dekontaminatsiooni vahendiga) ning seejärel 70% etanooli lahusega. Veenduge, et puhastusmaterjalid sobiksid kasutatavatele seadmetele.
- SARS-CoV-2 positiivset kontrolli (N/E/RdRP) tuleb käsitseda ettevaatlikult, et vältida analüüsikomplekti teiste reaktiivide ja testitavate RNA proovide võimalikku saastumist.
- Järgige reaalaja PCR-i seadme käsiraamatu hoiatusi, ettevaatusabinõusid ja protseduure. Seadmed peavad olema õigesti paigaldatud, kalibreeritud ja hooldatud tootja soovitude kohaselt.

7. Proovide võtmine ja RNA eraldamine

Rakendage vajalikke ettevaatusabinõusid proovide võtmisel, transpordil, säilitamisel, käsitlemisel ja hävitamisel. Kliinilisi proove tuleb töödelda järgides riiklikke bioloogilise ohutuse määruseid ning Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) soovitatavaid bioohutuse ja bioturvalisuse juhiseid.[1]

Analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit toimivus sõltub puhastatud RNA kogusest ja kvaliteedist. Kasutaja kohustus on valideerida proovide võtmise, transpordi ja säilitamise tingimused ning RNA eraldamiseks sobivaid komplekte ja süsteeme, et saada hea kvaliteediga RNA.

Analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit toimivus on määratud ainult nina- või ninaneelukaape proovidest. Teisi proovi tüüpe ei ole hinnatud ning nende valideerimise eest vastutab kasutaja. RNA eraldamiseks soovitatakse kasutada meetodeid, mis on mõeldud tööks respiratoorsete proovidega ning järgida tootja kasutusjuhiseid. Analüüsikomplektiga koos kasutamiseks on valideeritud järgmised müügilolevad RNA eraldamise komplektid ja süsteemid:

- LifeRiver EX3600 (Shanghai ZJ Bio-Tech) with Ribonucleic Acid (RNA) Isolation Kit (Preloaded for Auto-Extraction) (Cat. No. ME-0014).
- QIA Symphony SP (Qiagen), QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Cat. No. 57704).

RNA eraldamisel tuleb järgida tootja kasutusjuhiseid ja protseduure.

8. Testi töövoog

8.1 Töökoha ettevalmistus

- Testimise töövoog iga etapi jaoks kasutage selleks ettenähtud ruume: nukleiinhappe eraldamine, amplifikatsioonireaktsioonide ettevalmistamine, reaktsioonide amplifitseerimine ja tuvastamine.
- Igas ruumis tuleb kasutada ettenähtud seadmeid, tarvikuid ja isikukaitsevahendeid (laborikitlid, ühekordsed kindad, silmakaitsevahendid jne).
- Enne kasutamist puhastage ja dekontamineerige kõik tööpinnad, mikropipetid, tsentrifuugid ja muud seadmed. Nukleiinhapetega saastumise riski vähendamiseks on dekontamineerimiseks sobilikud 10% valgendi, 70% etanooli lahus, RNA-d/DNA-d eemaldavad ained.

8.2 Reaktsioonisegu valmistamine

TÄHTIS!

- Kõiki analüüsikomplektiga tehtavaid töid peavad tegema kvalifitseeritud ja väljaõppinud kasutajad. Tööd tuleb teha diagnostikalaboris, kus järgitakse kehtivaid ohutusstandardeid ning kasutusel on sobivad seadmed.
- Positiivset kontrolli tuleb käsitseda ettevaatlikult, et vältida analüüsikomplekti teiste reaktiivide ja testitavate RNA proovide võimalikku saastumist.
- Kasutage ainult analüüsikomplektis sisalduvaid ja tootja poolt soovitatud reagente.
- Ärge kombineerige ega segage erinevatest partiidest pärit reagente.
- Ärge kombineerige erinevate tootjate komplektidest pärit reagente.
- Eraldatud RNA-d hoidke jääl, võimalusel kasutage kohe pärast proovidest eraldamist.
- Reaktsiooni kokkusegamisel võib kasutada ka -20°C kuni -80°C hoiustatud RNA-d. Vältida tuleks RNA pikaajalist toatemperatuuril hoidmist, sulatage jääl ning vajadusel külmutage uuesti.

REAKTSIOONIDE ETTEVALMISTAMINE

Määrake kindlaks vajalike reaktsioonide, sealhulgas testitavate proovide ja kontrollide koguarv. Lisaks testitavatele RNA proovidele peab iga analüüs sisaldama:

- ühte positiivset kontrolli (PK), kasutades reaktsiooni kokkusegamisel komplektis sisalduvat positiivset kontrolli (N/E/RdRP);
- ühte negatiivset kontrolli (NK), kasutades reaktsiooni kokkusegamisel komplektis sisalduvat nukleaaasivaba vett.

Pipeteerimise vigade kompenseerimiseks on soovitatav reaktsiooni põhisegu mahu arvutamisel lisada sellele 10%.

1. Kõik analüüsikomplekti reagentid ja proovid tuleb enne kasutamist tõsta jääle sulama. Pärast täielikku sulamist segada (pöörates ümber või õrnalt pipeteerides) ning lühidalt tsentrifuugida.
2. Valmistage reaktsiooni põhisegu jää. Puhverlahuse viskoossusest tulenevate pipeteerimise vigade vältimiseks soovitatakse ensüümide segusid 1 ja 2 pipeteerida hoolikalt ja aeglaselt. Reaktsiooni põhisegu valmistamiseks tuleb analüüsikomplekti üksikud komponendid segada alltoodu protokolliga kohaselt.

Reaktsiooni põhisegu valmistamine

Tabel 3. Reaktsiooni põhisegu komponendid ja valmistamine

Reaktsioonisegu komponent	Maht proovi või kontrolli kohta	Maht n-proovi ja 2 kontrolli kohta ¹	Maht 94 proovi ja 2 kontrolli kohta ¹
Nukleasivaba vesi	6.5 µL	7.15 x (n + 2) µL	686.4 µL
Praimeri/sondi segu	1.0 µL	1.10 x (n + 2) µL	105.6 µL
Ensüümide segu 1	4.0 µL	4.40 x (n + 2) µL	422.4 µL
Ensüümide segu 2	0.5 µL	0.55 x (n + 2) µL	52.8 µL
Reaktsiooni põhisegu kogumaht	12 µL	-	1267.2 µL

¹ Kõik mahud sisaldavad reagente 10% üleliias.

3. Segage reaktsioonisegu põhjalikult ning seejärel tsentrifuugige lühidalt. Pipeteerige 12 µl ettevalmistatud reaktsioonisegu vastavasse PCR-i plaadi süvendisse.
4. Lisage vastavatesse PCR-i plaadi süvenditesse 8 µl testitavat RNA proovi, negatiivset kontrolli või positiivset kontrolli.
5. Sulgege plaat sobiva kattega, tsentrifuugige plaati lühidalt ja asetage reaalka PCR-i seadmesse.

8.3 Reaalka PCR-i seadme ja signaali tuvastamise kanalite seadistamine

Järgige reaalka PCR-i seadme käsiraamatus ära toodud kasutusjuhendit. Seade peab olema tootja soovitude kohaselt paigaldatud, kalibreeritud ja hooldatud. Amplifitseeritud fragmendid tuvastatakse järgmistes kanalites:

- N geen: FAM kanal
- E geen: VIC/HEX/JOE kanal
- RdRP geen: Cal Red 610/ROX/Texas Red kanal
- Sisemine kontroll RNase P, RPP30: Quasar 670/Cy5 kanal

Bio-Rad CFX96™ seadistamine:

1. Avage Bio-Rad CFX Maestro tarkvara, ning valige menüüst „Fail“, mille alt saate luua uue protokollid ja plaadi failid „Uus“, „Protokoll“ või „Plaat“.
2. Programmi seadistamine: määrake PCR-i protokoll nagu toodud allpool. Kinnitage valik vajutades OK.

Tabel 4. PCR-i protokoll

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Pöördtranskriptsioon	50°C	10 minutit	1
Ensüümi aktivatsioon	95°C	10 minutit	1
Denaturatsioon	95°C	3 sekundit	45
Praimerite seondumine/elongatsioon	62°C	15 sekundit*	

* Selle etapi lõpus peab toimuma plaadi lugemine

3. Plaadi seadistamine: määrake ala vastavalt proovide arvule. Valige “määrake fluorofoorid” ning valige vastavad kanalid. Valige vastav ala ning määrake sobiv proovi tüüp. Valiku “Sätted” alt valige kasutatava plaadi tüüp. Plaadi seadete näidis; flouorfoorid: FAM, HEX, Texas Red, CY5; proovi tüüp: teadmata; plaadi tüüp “BR valge”.

Plaadi seadistamise lõpetamiseks vajutage OK.

4. Käivitage programm: eksperimendi seadete menüüst valige “ava kaas” ning asetage plaat seadmesse. Valige “sulge kaas”, seejärel “käivita programm”.

8.4 Kvaliteedikontroll ja tulemuste tõlgendamine

Järgige alati reaalaraja PCR-i seadme tootja kasutusjuhiseid. Eksperimendi planeerimisel võtke arvesse häid laboritavasid, seadistamisel arvestage proovi tüübi, proovide arvu, proovide jaotusega plaadil ning kasutatava laboriplastiku tüüpi (PCR-i tuubid, PCR-i plaadid jmt).

Andmete analüüsiks tuleb kasutada reaalaraja PCR-i seadme tootja poolt määratud tarkvara.

Kliinilise RNA proovi analüüsi tulemusi tuleb hinnata pärast seda, kui positiivse ja negatiivse kontrolli vastavus kriteeriumitele on kinnitatud. Igal analüüsi protseduuril tuleb lisaks kliinilistele proovidele kasutada ühte negatiivset kontrolli (NK) ja ühte positiivset kontrolli (PK).

Testi tulemus on kehtiv, kui täidetud on järgnevad kriteeriumid:

- negatiivne kontroll ei näita amplifikatsiooni (Cq väärtused < 40.0) mitte üheski fluorestsentsi kanalis (FAM, HEX, ROX, Cy5 kanal);
- positiivne kontroll näitab amplifikatsiooni (Cq väärtused < 38.0) kõigis fluorestsentsi kanalites (FAM, N geen; HEX, E geen; ROX, RdRP geen).

Kui kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei ole täidetud, tuleks kaaluda kordusanalüüsi tegemist. Proovi analüüsi võib korrata eraldatud nukleiinhapest või eraldada RNA algsest kliinilise proovi materjalist järgides kõiki protokolliga etappe. Kui kordusanalüüs jääb samuti ebaselgeks võib olla vajalik uue kliinilise proovi kogumine.

Positiivse amplifikatsiooni kinnitamiseks kontrollige palun käsitsi kõikide Cq väärtusega proovide amplifikatsioonikõveraid. Amplifikatsioonikõveraid tuleb kontrollida nii logaritmilises kui lineaarses skaalas ning võrrelda negatiivse kontrolli tulemustega. Vajalik võib olla läviväärtuse muutmine.

Testi tulemusi peab hindama tervishoiutöötaja meditsiinilise anamneesi, kliiniliste sümptomite ja teiste diagnostiliste testide kontekstis.

- SARS-CoV-2 sihtmärk (N geen, E geen, RdRP geen) loetakse positiivseks (POS) siis, kui amplifikatsioonikõver ületab läviväärtuse enne 40. tsüklit (Cq < 40).
- Sisemine kontroll (Rnase P geen (RPP30)) detekteeritakse Cy5 kanalis, näitab (POS) signaali (Cq ≤ 40) või ei anna amplifikatsiooni signaali (NEG). Sisemise kontrolli kasutamine ei pruugi olla vajalik kõrge koopiaarvuga SARS-CoV-2 proovimaterjali (N geen, E geen, RdRP geen) puhul, kus eelistatuna paljundatakse sihtmärgi spetsiifilised fragmendid.

Patsiendi proovi tulemuste tõlgendamiseks kasutage juhiseid tabelis 5.

Tabel 5. Analüüsitulemuste tõlgendamine

N (FAM)	E (HEX)	RdRP (ROX)	Rnase P, PP30 (Cy5)	Tõlgendus	Tegevus
Üks SARS-CoV-2 sihtmärk on positiivne			POS või NEG	SARS-CoV-2 RNA ebaselge	Korrake testi. Kui tõlgendus jääb ebaselgeks, on vajalik täiendav testimine, kui see on kliiniliselt näidustatud. ¹
Kaks või enam SARS-CoV-2 sihtmärki on positiivsed			POS või NEG	SARS-CoV-2 RNA tuvastatud	Esitage tulemused tervishoiuteenuse pakkujale.
NEG	NEG	NEG	POS	SARS-CoV-2 RNA ei ole tuvastatud	Esitage tulemused tervishoiuteenuse pakkujale. Kaaluma peaks testimist teiste respiratoorsete patogeenide suhtes.
NEG	NEG	NEG	NEG	Kehtetu	Korrake testi. Kui kordusanalüüs on samuti kehtetu, kaaluge uue proovi kogumist. ¹

¹ Proovi uuesti testimine tuleb teha nukleiinhappe kordustestimise ja/või RNA ekstraheerimise teel proovist ja RT-qPCR-i testi kordamise teel. Kui kordustestimise tulemus jääb ebaselgeks, tuleb kaaluda uue kliinilise proovi võtmist ja testimist.

9. Meetodi piirangud

- Analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit toimivus on kindlaks tehtud ainult ninaneelust võetud proovidest. Teisi proovitüüpe ei ole hinnatud. Kõikide teiste proovitüüpide sobivust selle analüüsikomplektiga peab testima ja kinnitama kasutaja.
- Kliiniline proov tuleb koguda, transportida ja säilitada, järgides nõuetekohaseid protseduure ja tingimusi. Proovi ebakorrektna kogumine, transport või säilitamine võib mõjutada analüüsi toimivust ja usaldusväärsust.
- Kliinilisest proovist RNA eraldamisel tuleb kinni pidada eraldamise protokollide juhistest. Sobiliku nukleiinhappe eraldamise meetodi valideerimine on kasutaja vastutus.
- Oluline on järgida analüüsikomplekti kasutusjuhendit. Kõik kõrvalekalded võivad põhjustada analüüsi ebaõnnestumise või anda ebaõigeid tulemusi.
- Headest laboritavadest kinnipidamine tagab analüüsikomplekti korrektse toimivuse ning väldib komponentide saastumist. Komponentide saastumise kahtluse korral tuleb need käidelda tavaliste laborijäätmetena.
- Uued variatsioonid ja mutatsioonid SARS-CoV-2 märklaujärjestustes võivad mõjutada analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit praimerite ja/või sondide seondumist ning SARS-CoV-2 viiruse tuvastamist.
- Valenegatiivse tulemuse põhjus võib olla:
 - proovi ebakorrektna kogumine, käsitsemine või säilitamine;
 - valideerimata RNA eralduskomplekti või PCR-i platvormi kasutamine, RNA eralduskomplekti või PCR-i platvormi käsiraamatu protseduuride ja juhiste mittejärgimine;
 - analüüsikomplekti kasutusjuhendis toodud juhiste eiramine.
- Valepositiivse tulemuse põhjus võib olla:
 - kõrge SARS-CoV-2 viiruse RNA kontsentratsiooniga proovi või positiivse kontrolli ebakorrektna käsitsemine.
 - amplifitseeritud saaduse ebakorrektna käsitsemine.
- Tulemuste tõlgendamise õigus on vastava väljaõppe saanud tervishoiutöötajal, võttes arvesse patsiendi anamneesi ja kliinilisi sümptomeid.
- Selle testi põhjal ei saa välistada teiste patogeenide põhjustatud haiguseid.
- Ükskõik millise PCR-i testi negatiivne tulemus ei välista lõplikult infektsiooni võimalust.

10. Analüütilised toimivusnäitajad

10.1 Analüütiline tundlikkus ehk avastamispiir

Avastamispiir (*Limit of Detection, LoD*) on määratletud kui väikseim analüüdi kontsentratsioon, mida saab usaldusväärselt (95% tõenäosusega saadakse õige testi tulemus) tuvastada.

Analüütilise tundlikkuse (avastamispiir, LoD) hindamiseks kasutati sünteetilist SARS-CoV-2 ssRNAd (*Helix Elite™ Synthetic Standard SARS-CoV-2 Synthetic RNA Pool* (N/E/RdRp/S geeni sihtmärgid, *Microbiologics, Cat. No. HE0061S*)) ja *Quantitative PCR Human Reference Total RNA* (*Agilent, Cat. No. 750500*) reagente. Sünteetilise SARS-CoV-2 ssRNA segu lahjendused valmistati lahjenduste reana 10000, 1000, 100, 10 ja 5 koopiat reaktsiooni kohta. LoD analüüsiks tehti iga lahjenduse aste kolmes korduses. Iga reaktsioon sisaldas lisaks 0,6 ng *Quantitative PCR Human Reference Total RNA*. Esiagne avastamispiiri analüüs viidi läbi kolme tehnilise replikaadiga iga valmistatud lahjenduse jaoks. Proovid analüüsiti reaallaja PCR-süsteemiga Bio-Rad CFX96™.

Avastamispiiri määramiseks kasutati sünteetilist SARS-CoV-2 ssRNAd ning määrati usaldusväärseks avastamispiiriks 10 koopiat reaktsiooni kohta. **Tabelis 6** on toodud 24 tehnilise replikaadi tulemused kindlaksmääratud analüüsi avastamispiiri juures. Andmed näitavad, et SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit tuvastab $\geq 95\%$ tõenäosusega 10 koopiat SARS-CoV-2 sünteetilist ssRNA-d reaktsiooni kohta.

Tabel 6. Analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit analüütilise tundlikkuse määramise tulemused sünteetilise SARS-CoV-2 ssRNA kontsentratsioonil 10 koopiat reaktsiooni kohta.

Märklaud	N geen	E geen	RdRP geen
Positiivne/Kokku	24/24	24/24	22/24
Tuvastamise edukus	100%	100%	91.6%

10.2 Analüütiline spetsiifilisus

Analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit praimerite ja sondide ristreaktiivsust SARS-CoV-2 viirusele lähedaste liikide/tüvede ja organismide genoomidega hinnati *in silico*. Kokku analüüsiti *in silico* 42 organismi genoomi, mis esindavad erinevaid patogeene (sh bakterid, viirused või seened). Andmed laaditi alla NCBI nukleotiidide kolleksioonist (NCBI GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), kasutades Entrez Direct (EDirect) liidest. Otsing oli piiratud vastava patogeeni taksonoomia ID (txid) kasutamisega.

Analüüsikomplekti praimerite ja sondide joondatud järjestuste üksikasjalik individuaalne ning kombineeritud analüüs näitas, et puudub potentsiaalne ristreaktiivsus 42 organismiga, mis esindavad erinevate patogeeni (bakterid, viirused ja seened) genoomi. BLAST analüüsileitud homoloogia oli väiksem kui 80%. Tulemused on esitatud tabelis 7.

Tabel 7. Ristreaktiivsuse analüüs *in silico*

Patogeen	NCBI taksonoomia ID	Analüüsitud genoomide koguarv	Ristreaktiivsus
Adenovirus	NCBI:txid10509	1049	Ei tuvastatud
<i>Bacillus anthracosis</i>	NCBI:txid1392	927	Ei tuvastatud
<i>Bordetella pertussis</i>	NCBI:txid520	2782	Ei tuvastatud
<i>Candida albicans</i>	NCBI:txid5476	870	Ei tuvastatud
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	NCBI:txid83558	375	Ei tuvastatud
<i>Chlamydia psittaci</i>	NCBI:txid83554	145	Ei tuvastatud
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	NCBI:txid1717	243	Ei tuvastatud
<i>Coxiella burnetii</i>	NCBI:txid777	178	Ei tuvastatud
Enterovirus A-D	NCBI:txid138948, NCBI:txid138949, NCBI:txid138950, NCBI:txid138951	3963	Ei tuvastatud
<i>Haemophilus influenzae</i>	NCBI:txid727	473	Ei tuvastatud
Human coronavirus 229E	NCBI:txid11137	72	Ei tuvastatud
Human coronavirus HKU1	NCBI:txid290028	39	Ei tuvastatud
Human coronavirus NL63	NCBI:txid277944	60	Ei tuvastatud
Human coronavirus OC43	NCBI:txid31631	182	Ei tuvastatud
Human mastadenovirus C	NCBI:txid129951	101	Ei tuvastatud
Human Metapneumovirus	NCBI:txid162145	157	Ei tuvastatud
Human Parainfluenza virus 1-4	NCBI:txid12730, NCBI:txid11216, NCBI:txid1979160, NCBI:txid1979161	482	Ei tuvastatud
Human Respiratory syncytial virus	NCBI:txid11250	2045	Ei tuvastatud
<i>Influenza A virus</i>	NCBI:txid11320	3764	Ei tuvastatud
<i>Influenza B virus</i>	NCBI:txid11520	120	Ei tuvastatud

<i>Influenza C virus</i>	NCBI:txid11552	13	Ei tuvastatud
<i>Legionella longbeachae</i>	NCBI:txid450	31	Ei tuvastatud
<i>Legionella non-pneumophila</i>	NCBI:txid445, exclude NCBI:txid446	255	Ei tuvastatud
<i>Legionella pneumophila</i>	NCBI:txid446	983	Ei tuvastatud
Leptospira	NCBI:txid171	690	Ei tuvastatud
MERS-coronavirus	NCBI:txid1335626	612	Ei tuvastatud
<i>Moraxella catarrhalis</i>	NCBI:txid480	108	Ei tuvastatud
<i>Moraxella osloensis</i>	NCBI:txid34062	110	Ei tuvastatud
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NCBI:txid1773	4136	Ei tuvastatud
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NCBI:txid2104	159	Ei tuvastatud
<i>Neisseria elongata</i>	NCBI:txid495	11	Ei tuvastatud
<i>Neisseria meningitidis</i>	NCBI:txid487	1414	Ei tuvastatud
Parechovirus	NCBI:txid138954	200	Ei tuvastatud
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	NCBI:txid42068	16	Ei tuvastatud
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCBI:txid287	14576	Ei tuvastatud
Rhinovirus	NCBI:txid147711, NCBI:txid147712, NCBI:txid463676	362	Ei tuvastatud
SARS-coronavirus	NCBI:txid694009, exclude HCoV-19 (taxid:2697049)	331	Ei tuvastatud
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCBI:txid1280	23552	Ei tuvastatud
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NCBI:txid1282	2621	Ei tuvastatud
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NCBI:txid1313	50542	Ei tuvastatud
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NCBI:txid1314	2888	Ei tuvastatud
<i>Tatlockia micdadei</i>	NCBI:txid451	5	Ei tuvastatud

10.3 Inklusiivsus või analüütiline reaktiivsus

Analüütilist reaktiivsust hinnati *in silico* analüüsil ning kasutati kõiki SARS-CoV-2 genoomi järjestusi, mis olid 19. novembri 2021. a seisuga kättesaadavad NCBI nukleotiidsete järjestuste andmebaasis (NCBI GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

NCBI GenBank andmebaasist laaditi alla ning analüüsiti kokku 2253291 SARS-CoV-2 genoomi järjestust. Analüüsikomplekti N, E ja RdRP geenide spetsiifiliste praimerite ja sondide järjestusi võrreldi SARS-CoV-2 järjestustega. Iga üksiku geeni analüüsi jaoks olid positiivse tulemuse kriteeriumid järgmised: (i) iga üksiku geeni analüüsi (sond + mõlemad praimerid) kõik kolm oligonukleotiidi annavad 100% identsuse (homoloogia) ja täies pikkuses vastavuse, (ii) sond paikneb kahe praimerite vahel ja (iii) produkti pikkus on alla 1000 aluspaari. *In silico* analüüs näitas 100% praimerite ja sondide järjestuse identsust enam kui 98% SARS-CoV-2 genoomidega (98,22% RdRP geeni analüüsi jaoks, 99,02% E geeni analüüsi jaoks, 99,07% N geeni analüüsi jaoks), mis olid deponeeritud NCBI GenBank andmebaasis.

Rahvatervisele potentsiaalselt tähtsate tsirkuleerivate SARS-CoV-2 variantide tuvastamise võimekuse *in silico* hindamine

Analüüsikomplekti RdRP, E ja N geeni praimerite ning sondide järjestused joondati SARS-CoV-2 variantide järjestustega, millel on potentsiaalne tähtsus rahvatervisele (*Variants of Concern, VOC; Variants of Interest, VOI*). Analüüsiti NCBI nukleotiidsete järjestuste andmebaasist (NCBI GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) kättesaadavaid järjestusi, mis olid sinna laetud 19. novembri 2021. a seisuga. Analüüsikomplekti praimerite ja sondide *in silico* analüüs viidi läbi 12 erineva SARS-CoV-2 tüve suhtes: B.1.1.7 (alfa), B.1.351 (beeta), P.1 (gamma), B.1.617.2 (delta), B.1.427+B.1.429 (epsilon), B.1.525 (eeta), B.1.526 (iota), B.1.617.1 (kapa), P.2 (dzeeta), B.1.621 (müü), C.37 (lambda), P.3 (teeta). Tulemused on esitatud **Tabelis 8**.

In silico analüüs ennustab, et SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit tuvastab analüüsi kaasatud tsirkuleerivad SARS-CoV-2 tüved. 100% praimerite ja sondide järjestuse identsus leiti enam kui 97% ülalmainitud tüvede SARS-CoV-2 genoomidega, mis olid deponeeritud NCBI GenBank andmebaasis. P.2 (dzeeta) liini analüüs näitas, et P.2 liini RdRP geen tuvastati 91,50% SARS-CoV-2 järjestustest. SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit toimivust P.2 (dzeeta) tüvega ei tohiks see mõjutada, sest SARS-CoV-2 loetakse tuvastatuks, kui positiivse signaali annavad vähemalt kaks sihtmärki kolmest (RdRP, N ja E).

Tabel 8. VOC ja VOI tüvede tuvastamise *in silico* analüüsi tulemused.

	RdRP geen	E geen	N geen
B.1.1.7 (Alfa)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	495858 (495800)	495858 (495801)	495858 (495776)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	99.69	99.50	99.94
B.1.351 (beeta)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	5121 (5119)	5121 (5121)	5121 (5121)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	98.26	99.45	98.87
P.1 (gamma)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	13617 (13598)	13617 (13615)	13617 (13616)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	99.71	99.32	99.29
B.1.617.2 (delta)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	98188 (98153)	98188 (98174)	98188 (98148)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	98.86	99.11	99.20
B.1.427+B.1.429 (epsilon)			
B.1.427			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	10099 (10096)	10099 (10097)	10099 (10096)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	95.38	99.38	97.72
B.1.429			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	23628 (23625)	23628 (23622)	23628 (23624)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	97.36	98.29	99.54
B.1.525 (eeta)			

tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	2221 (2221)	2221 (2221)	2221 (2220)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	98.15	97.39	99.23
B.1.526 (iota)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	32291 (32281)	32291 (32289)	32291 (32279)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	97.37	99.29	98.44
B.1.617.1 (kapa)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	822 (822)	822 (822)	822 (822)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	99.15	100.00	99.76
P.2 (dzeeta)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	1060 (1059)	1060 (1060)	1060 (1060)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	91.50	99.62	97.64
B.1.621 (müü)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	3561 (3555)	3561 (3556)	3561 (3560)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	99.94	98.31	98.93
C.37 (lambda)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	1054 (1054)	1054 (1054)	1054 (1054)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	99.24	99.15	98.96
P.3 (teeta)			
tuvastatud (analüüsitud) genoomide koguarv	40 (40)	40 (40)	40 (40)
avastamismäär (% analüüsitud genoomidest)	100.00	100.00	100.00

Analüüsikomplektiga SARS-CoV-2 omikroni variandi/tüve tuvastamise võimekuse *in silico* hindamine

Analüüsikomplekti RdRP, E ja N geeni praimerite ning sondide järjestused joondati GISAID andmebaasi järjestusega EPI_ISL_6841980. Järjestus EPI_ISL_6841980 on aluseks sünteetilisele SARS-CoV-2 omikron referentskontrollmaterjalile [Twist Bioscience (Control 48 (B.1.1.529/BA.1) Hong Kong/HKU-211129-001/2021, catalog #105204)].

Analüüsikomplekti RdRP, E ja N geeni praimerite ning sondide järjestuste joondamisel EPI_ISL_6841980 järjestusega tuvastati kaks üksiknukleotiidi mittepaardumist, millest üks paiknes E geeni pärisuunalise praimeri järjestuses (5. nukleotiid 5' otsast) ja teine N geeni sondi järjestuses (3. nukleotiid 5' otsast).

Analüüsikomplekti komponentide hindamine, mis ei vastanud 100% EPI_ISL_6841980 sihtmärkjärjestusele koos mittepaardumise sulamistemperatuuri analüüsiga, näitas, et E geeni pärisuunalise praimeri ja N geeni sondi üksiknukleotiidi mittepaardumised ei mõjuta tõenäoliselt analüüsikomplekti toimivust. E geeni pärisuunalisel praimeri ja N geeni sondi matriitsahela sulamistemperatuurid on kõrgemad, kui qPCR-i tsükleerimise seondumistemperatuur (E geeni praimer analüüsis T_m 64,9°C, E geeni praimer 100% homoloogiaga EPI_ISL_6841980-le T_m 63,2°C; N geeni sondi analüüsis T_m 73,5°C, N geeni sondi 100% homoloogiaga EPI_ISL_6841980-le T_m 71,7°C).

Analüüsikomplekti võimekust tuvastada SARS-CoV-2 omikroni varianti eksperimentaalseks hindamiseks kasutati Twist Bioscience [(Control 48 (B.1.1.529/BA.1)] poolt toodetud sünteetilist viiruse ssRNA-d (catalog #105204). Tootekirjelduse alusel katab Twist Bioscience'i sünteetiline viiruse RNA kontroll rohkem kui 99,9% SARS-CoV-2 viiruse genoomi alast.

Analüüsikomplekti tundlikkuse test tehti Twist Bioscience Control 48 (B.1.1.529/BA.1) nelja 10-kordse seeria lahjendusega (10 000, 1000, 100, 10 koopiit reaktsioon). Tulemused näitasid, et analüüsikomplekti tundlikkust SARS-CoV-2 omikroni variandiga sünteetilise viiruse RNA suhtes ei mõjuta üksiku nukleotiidi mittepaardumised E geeni pärisuunalise praimeri ja N geeni sondi järjestustes.

10.4 Kliiniline tundlikkus ja spetsiifilisus

Analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit kliinilist toimivust hinnati võrdlusmeetodiga. Hindamisel kasutati kliinilisi proove, millest 45 olid SARS-CoV-2 suhtes kinnitatud positiivsed ning 24 negatiivsed. RNA eraldati ninaneelu kaapeproovidest eralduskomplektiga *LifeRiver EX3600 (Shanghai ZJ Bio-Tech) Ribonucleic Acid (RNA) Isolation Kit (Preloaded for Auto-Extraction) (ME-0014)*, kasutades seadet LifeRiver EX3600 (Shanghai ZJ Bio-Tech). Proovid analüüsiti reaalaaja PCR-süsteemiga Bio-Rad CFX96™ ning kõrvutati võrdlusanalüüsi tulemustega.

Kliinilise uuringu tulemused (**Tabel 9**) ning positiivset ühilduvust protsentides (*Positive Percentage Agreement, PPA*) ja negatiivset ühilduvust protsentides (*Negative Percentage Agreement, NPA*) 95% usaldusintervalli juures on esitatud allpool.

Tabel 9. Analüüsikomplekti SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit kliinilise hindamisuuringu tulemused.

		Võrdlusanalüüs (CE-IVD)		
		Positiivne	Negatiivne	Kokku
SOLIScript® SARS-CoV-2 RT- qPCR Multiplex Assay Kit	Positiivne	45	0	45
	Negatiivne	0	24	24
	Kokku	45	24	69

Analüüsi toimivus võrreldes molekulaargiagnostilise võrdlusmeetodiga:

Positive Percent Agreement $45/45 = 100\%$ (95% CI: 92.1% - 100%)

Negative Percent Agreement $24/24 = 100\%$ (95% CI: 85.8%-100%)

11. Utiliseerimine

Kõrvaldage analüüsikomplekti kasutamata ja/või kontamineeritud reagentid, inimeste kliinilised proovid ja kaetud amplifikatsiooniplaadid kliiniliste jäätmetena kohalike ja riiklike määruste kohaselt.

12. Versiooni haldus

Kasutusjuhendi versioon DS-08-85 ET v1, 10.03.2022.

13. Solis BioDyne OÜ kvaliteedikontrollisüsteem

SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit on toodetud Solis BioDyne OÜ poolt, järgides ISO 9001 ja ISO 13485 sertifitseeritud kvaliteedijuhtimissüsteemi.

Solis BioDyne OÜ tootmine järgib ISO 13485 sertifitseeritud kvaliteedijuhtimissüsteemi, millele vastavalt tagatakse toote järjepidev kvaliteet, testides iga SOLIScript® SARS-CoV-2 RT-qPCR Multiplex Assay Kit partiid eelnevalt kinnitatud kvaliteedi spetsifikatsiooni alusel.

14. Tehniline tugi

Küsimuste korral või tehnilise toe saamiseks võtke palun ühendust:

Telefon: +372 740 9960

Email: support@solisbiodyne.com

15. Kaubamärgid ja õigusalsed märkused

SOLIScript® ja HOT FIREPoI® on EÜs registreeritud kaubamärgid, mis kuuluvad Solis BioDyne OÜ-le. RiboGrip™ on Solis BioDyne OÜ-le kuuluv kaubamärk.

Kõik teised kaubamärgid, millele käesolevas toote kasutusjuhendis viidatakse, kuuluvad vastavate kaubamärkide omanikele.

16. Sümbolite loetelu

 LOT	Partiinumber		Aegumiskuupäev
 REF	Katalooginumber		Tootja
 Σ	Testide arv		Temperatuurivahemik
 CE	Euroopa vastavusmärgis	 IVD	Kasutamiseks in vitro diagnostikas

17. Viited

[1] Laboratory biosafety manual, 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2004
(<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>, accessed 18 February 2022)

[2] <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>,
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>)