



Σεπτέμβριος 2022

Οδηγίες χρήσης (Εγχειρίδιο) του *artus*[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp[™] UM Kit



Έκδοση 1



Για in vitro διαγνωστική χρήση στα όργανα Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM, ABI[®] 7500 Fast Dx, QuantStudio[®] 5 Dx, cobas[®] z 480 ή CFX96[™] Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R5

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Περιγραφή και αρχή λειτουργίας.....	5
Πληροφορίες για τους παθογόνους μικροοργανισμούς.....	5
Σύνοψη και επεξήγηση.....	6
Υλικά που παρέχονται	10
Περιεχόμενα του κιτ.....	10
Συστατικά του κιτ.....	11
Πλατφόρμες και λογισμικό.....	13
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	14
Αναλώσιμα και εξοπλισμός	14
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	16
Πληροφορίες ασφάλειας.....	16
Προφυλάξεις.....	17
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	18
Μεταφορά, φύλαξη και χειρισμός δειγμάτων	18
Πρωτόκολλο: παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο RGQ MDx 5plex HRM	20
Πρωτόκολλο: παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο ABI 7500 Fast Dx	27
Πρωτόκολλο: Παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο CFX96 Dx.....	33
Πρωτόκολλο: Παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο cobas z 480	39

Πρωτόκολλο: Παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο QuantStudio 5 Dx	45
Αποτελέσματα	51
Ανάλυση στο RGQ MDx 5plex HRM	51
Ανάλυση στο ABI 7500 Fast Dx	53
Ανάλυση στο CFX96 Dx.....	54
Ανάλυση στο cobas z 480	56
Ανάλυση στο QuantStudio 5 Dx	58
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	59
Περιορισμοί	61
Χαρακτηριστικά απόδοσης	62
Αναλυτική ευαισθησία (Όριο ανίχνευσης).....	62
Μελέτες ειδικότητας ανάλυσης (Συμπεριληψιμότητα και αποκλειστικότητα/ διασταυρούμενη αντιδραστικότητα).....	63
Ακρίβεια.....	75
Κλινική απόδοση.....	76
Βιβλιογραφία	81
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	82
Σύμβολα	84
Στοιχεία επικοινωνίας	86
Πληροφορίες παραγγελιών.....	87
Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου	89

Προβλεπόμενη χρήση

Το κιτ *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit είναι μια εξέταση real-time RT-PCR που προορίζεται για την ποιοτική ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος SARS-CoV-2 σε επιχρίσματα από ρινοφαρυγγικό στείλειό (Nasopharyngeal Swabs, NPS), ρινικό στείλειό και στοματοφαρυγγικό στείλειό από άτομα με σημεία και συμπτώματα λοίμωξης ή άτομα χωρίς συμπτώματα και χωρίς άλλη αιτία που οδηγεί σε υποψία λοίμωξης από τη νόσο COVID-19. Για τα δείγματα καθαρού σάλιου, η εξέταση προορίζεται για άτομα με σημεία και συμπτώματα λοίμωξης ή υποψίας λοίμωξης από τη νόσο COVID-19.

Προορίζεται να συνδράμει στη διάγνωση της COVID-19 στην οξεία φάση της λοίμωξης σε συνδυασμό με κλινικές παρατηρήσεις, το ιστορικό του ασθενούς και επιδημιολογικές πληροφορίες.

Το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit προορίζεται για χρήση σε περιβάλλον εργαστηρίου μοριακής βιολογίας από επαγγελματίες χρήστες, όπως το εκπαιδευμένο προσωπικό κλινικού εργαστηρίου που είναι ειδικά καταρτισμένο στις τεχνικές των διαδικασιών της real-time RT-PCR και των διαγνωστικών διαδικασιών *in vitro*.

Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν λοίμωξη από SARS-CoV-2 και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως αποκλειστική βάση για τη λήψη αποφάσεων διαχείρισης των ασθενών.

Το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit προορίζεται για χρήση με τα όργανα Rotor-Gene Q MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 ή CFX96 Dx ως συστήματα real-time PCR.

Περιγραφή και αρχή λειτουργίας

Πληροφορίες για τους παθογόνους μικροοργανισμούς

Οι κοροναϊοί, ένα γένος της οικογένειας *Coronaviridae*, είναι μεγάλοι ιοί RNA θετικής πολικότητας με φάκελο οι οποίοι προκαλούν ασθένειες υψηλής μολυσματικότητας σε ανθρώπους και οικόσιτα ζώα (1). Οι κοροναϊοί είναι γνωστό ότι προκαλούν λοιμώξεις σε ανθρώπους σε ποσοστό που αντιστοιχεί στο ένα τρίτο των λοιμώξεων του κοινού κρυολογήματος και είναι επίσης ευρέως γνωστό ότι αποτελούν αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος σε πρόωρα βρέφη (2).

Ένα νέο μέλος της οικογένειας των κοροναϊών προκάλεσε την εξάπλωση της αναπνευστικής νόσου που εκδηλώθηκε αρχικά στην πόλη Γουχάν της Κίνας (1, 3). Ο SARS-CoV-2, ο οποίος ονομάστηκε αρχικά νέος κοροναϊός (2019-nCoV), διαφέρει από τον SARS-CoV (1, 3), που ήταν υπεύθυνος για την επιδημία του 2003 και από τον MERS-CoV, ο οποίος κυκλοφορεί στη Μέση Ανατολή από το 2012. Ο SARS-CoV-2 είναι ο αιτιώδης παράγοντας της νόσου COVID-19. Το RNA του SARS-CoV-2 είναι ανιχνεύσιμο κατά την πρώιμη και την οξεία φάση της λοίμωξης από ποικίλα δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού στείλεού) και σε δείγματα καθαρού σάλιου (3).

Σε συνδυασμό με το ιστορικό του ασθενούς και τα επιδημιολογικά στοιχεία για τον SARS-CoV-2, οι προσδιορισμοί real-time RT-PCR αποτελούν τον χρυσό κανόνα για διαγνώσεις που αφορούν τον SARS-CoV-2. Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) έχει προτείνει τον συνδυασμό προσδιορισμών με βάση τη μέθοδο real-time RT-PCR με ανοσολογικούς προσδιορισμούς για την παρακολούθηση της κατάστασης της λοίμωξης και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των περιοριστικών μέτρων που λαμβάνονται για τον έλεγχο της επιδημίας (4, 5).

Το κιτ *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να καλύπτει 2 στόχους (N1 και N2) του N γονιδίου που ανιχνεύονται στο ίδιο κανάλι φθορισμού. Οι δύο στόχοι δεν διαφοροποιούνται και η ενίσχυση του ενός ή και των δύο στόχων οδηγεί σε σήμα φθορισμού. Τα θετικά αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της παρουσίας SARS-CoV-2 αλλά δεν αποκλείουν συλλοίμωξη με άλλα παθογόνα. Από την άλλη πλευρά, τα αρνητικά αποτελέσματα στην real-time RT-PCR δεν αποκλείουν το ενδεχόμενο λοίμωξης.

Σύνοψη και επεξήγηση

Το κιτ *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit αποτελεί ένα έτοιμο για χρήση σύστημα με ένα απλό στάδιο παρασκευής δείγματος ακολουθούμενο από την ανίχνευση RNA του SARS-CoV-2 με χρήση real-time RT-PCR στο σύστημα RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ή QuantStudio 5 Dx (Εικόνα 1).

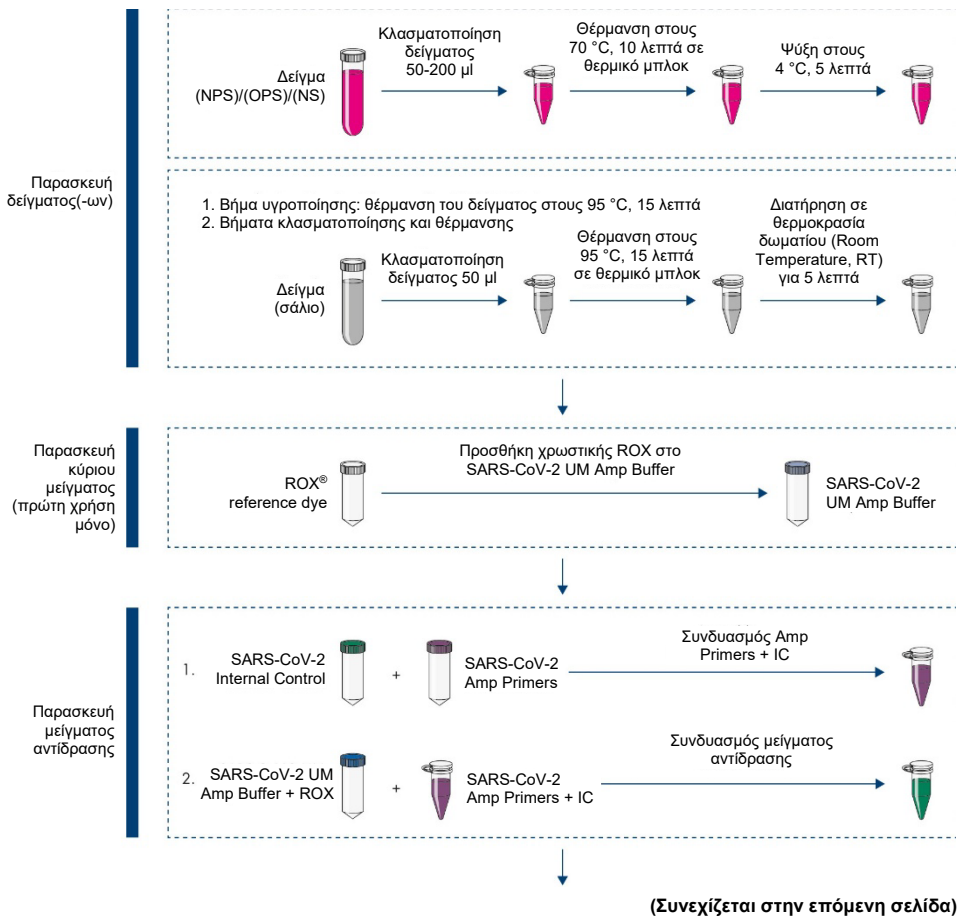
Το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ειδική ενίσχυση μίας περιοχής 72 ζευγών βάσεων (bp) και μιας περιοχής 67 (bp) του γονιδιώματος RNA του SARS-CoV-2 και για την άμεση ανίχνευσή τους στο κανάλι φθορισμού «Green» των οργάνων RGQ MDx και στο κανάλι φθορισμού «FAM» των ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ή QuantStudio 5 Dx.

Το μείγμα εκκινήτων και ανιχνευτών του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit περιέχει επίσης τα ολιγονουκλεοτίδια που απαιτούνται για τις ενισχύσεις RNase P. Όταν ανιχνεύονται στο κανάλι φθορισμού «Yellow» του οργάνου RGQ MDx, στο VIC/HEX του ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ή QuantStudio 5 Dx, οι ενισχύσεις αυτές διασφαλίζουν ότι έχει συλλεχθεί επαρκές βιολογικό δείγμα. Ο έλεγχος είναι ουσιαστικής σημασίας προκειμένου να διασφαλιστεί η παρουσία βιολογικών δειγμάτων σε αρνητικά δείγματα SARS-CoV-2. Η ενίσχυση θα πρέπει να είναι πάντα ανιχνεύσιμη, διαφορετικά αμφισβητεί την ποιότητα του δείγματος.

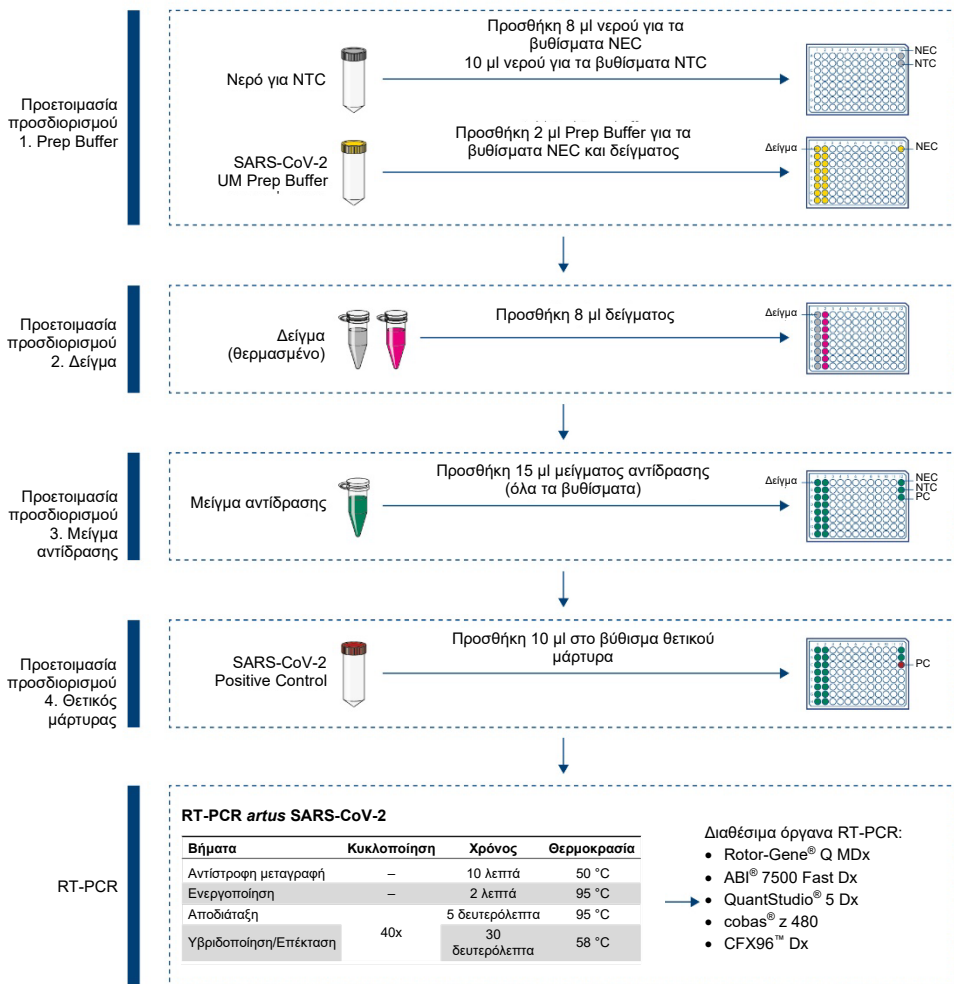
Το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit περιέχει επίσης ένα τρίτο ετερόλογο σύστημα ενίσχυσης για την αποκάλυψη ενδεχόμενης αναστολής της *real-time* RT-PCR. Ανιχνεύεται ως εσωτερικός μάρτυρας RNA (Internal Control, IC) στο κανάλι φθορισμού «Red» των οργάνων RGQ MDx ή στο Cy5/ATTO647N του ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ή QuantStudio 5 Dx. Επειδή ο εσωτερικός μάρτυρας περιλαμβάνεται στο SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, η ενίσχυσή του θα πρέπει να είναι συνεχής, εκτός αν υπάρχει παρουσία αναστολέα της *real-time* RT-PCR μέσα στο δείγμα ή στην αντίδραση της PCR, ο οποίος καθυστερεί ή αποτρέπει την ενίσχυση.

Εξωτερικοί θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (SARS-CoV-2 Positive Control και νερό χωρίς νουκλεάση για χρήση ως NTC, αντίστοιχα) παρέχονται στο kit *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit για την επιβεβαίωση της απόδοσης του βήματος της PCR. Συνιστάται ιδιαίτερα ένας μάρτυρας χωρίς εκχύλιση (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer για χρήση ως NEC) για να επικυρώσει την απουσία αναστολέων της *real-time* RT-PCR στο παρασκευαστικό ρυθμιστικό διάλυμα.

Η αποτελεσματικότητα του βήματος της αντίστροφης μεταγραφής και της PCR παρακολουθείται στο σύνολό της από αυτούς τους μάρτυρες.



(συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)



Εικόνα 1. Ποή εργασίας του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του kit

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Αρ. Καταλόγου

Αριθμός αντιδράσεων

4511460

768

4511469

3072

Χρώμα σωληναρίου	Χρώμα καπακιού	Αναγνωριστικό	Αναγνωριστικό σωληναρίου	Όγκος (μl)	Όγκος (μl)
Διαυγές	Κίτρινο	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	Preparation Buffer (Διάλυμα προετοιμασίας)	2 x 930	8 x 930
Διαυγές	Μπλε	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	Master Mix (Κύριο μείγμα)	4 x 1440	16 x 1440
Διαυγές	Πορφυρό	SARS-CoV-2 Amp Primers	Primers and Probes (Εκκινητές και ανιχνευτές)	4 x 1680	16 x 1680
Διαυγές	Πράσινο	SARS-CoV-2 Internal Control	Internal Control (IC) [Εσωτερικός μάρτυρας (Internal Control, IC)]	1 x 1390	4 x 1390
Διαυγές	Κόκκινο	SARS-CoV-2 Positive Control	Positive Control (Θετικός μάρτυρας)	1 x 220	4 x 220
Διαυγές	Διαυγές	Water for NTC (Νερό για NTC)	Water (NTC) [Νερό (No template Control, NTC)]	1 x 1900	4 x 1900
Διαυγές	Διαυγές	ROX Reference Dye (Χρωστική αναφοράς ROX)	ROX Dye (Χρωστική ROX)	1 x 210	4 x 210

Συστατικά του kit

Αντιδραστήρια

Σε κάθε σωληνάριο οι όγκοι αντιδραστηρίων έχουν βελτιστοποιηθεί για 8 παρτίδες 96 δειγμάτων (για το kit των 768 αντιδράσεων) ή για 32 παρτίδες 96 αντιδράσεων (για το kit των 3.072 αντιδράσεων), συμπεριλαμβανομένου ενός θετικού μάρτυρα (Positive Control, PC), ενός μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC) και ενός μάρτυρα χωρίς εκχύλιση (No Extraction Control, NEC).

Μπορείτε να αναλύσετε λιγότερα ή περισσότερα δείγματα, ωστόσο θα προκύψει υποβέλτιστη χρήση των αντιδραστηρίων. Συνιστάται να αποφεύγετε τους πολλούς κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Μπορείτε να κλασματοποιείτε τα αντιδραστήρια για να αποφεύγετε τους πολλούς κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

Εκκινητές και ανιχνευτές

Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές που στοχεύουν τις αλληλουχίες του SARS-CoV-2 βασίζονται στους εκκινητές και τους ανιχνευτές που σχεδιάζονται από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC).

Μάρτυρες και βαθμονομητές

Ο προσδιορισμός περιέχει 5 μάρτυρες για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της real-time RT-PCR.

Εσωτερικός μάρτυρας (Internal Control, IC): Ο εσωτερικός μάρτυρας είναι ένα μονόκλωνο IVT RNA που επαληθεύει την παρουσία επιμολυντών που θα μπορούσαν να αναστείλουν την αντίστροφη μεταγραφή. Ο εσωτερικός μάρτυρας παρακολουθεί επίσης την αποτελεσματικότητα της αντίστροφης μεταγραφής στον μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC) και τον μάρτυρα χωρίς εκχύλιση (No Extraction Control, NEC).

Μάρτυρας χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC): Ο μάρτυρας χωρίς μήτρα αποτελείται από νερό χωρίς νουκλεάση. Προστίθεται στην πλάκα PCR για να επαληθεύσει την εισαγωγή επιμολυντών στη διάρκεια της προετοιμασίας της πλάκας PCR που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εσφαλμένη ερμηνεία των στόχων SARS-CoV-2.

Θετικός μάρτυρας (Positive Control, PC): Ο θετικός μάρτυρας είναι ένα δίκλωνο DNA ενισχυμένο με SARS-CoV-2 Primers and Probes (μείγμα P&P). Η ανίχνευσή του επαληθεύει την αποτελεσματικότητα του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιείται στο βήμα ενίσχυσης της PCR.

Μάρτυρας χωρίς εκχύλιση (No Extraction Control, NEC): Ο μάρτυρας χωρίς εκχύλιση αποτελείται από το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Υποβάλλεται σε επεξεργασία παράλληλα με τα κλινικά δείγματα για να επαληθεύσει την εισαγωγή επιμολυντών στη διάρκεια της παρασκευής των δειγμάτων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εσφαλμένη ερμηνεία των στόχων SARS-CoV-2.

Μάρτυρας δειγματοληψίας: Ο μάρτυρας δειγματοληψίας ανιχνεύει το γονίδιο RNase P και είναι ουσιώδης για να διασφαλιστεί η παρουσία βιολογικών δειγμάτων σε αρνητικά δείγματα SARS-CoV-2. Η ενίσχυση του μάρτυρα δειγματοληψίας θα πρέπει να είναι πάντα ανιχνεύσιμη, διαφορετικά αμφισβητεί την ποιότητα του δείγματος.

Πλατφόρμες και λογισμικό

Πριν από τη χρήση, βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Αυτό το κιτ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πέντε ροές εργασίας που απαιτούν τη χρήση των ακόλουθων οργάνων real-time RT-PCR και του κατάλληλου λογισμικού τους:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.1 ή νεότερη
- ABI 7500 Fast Dx: Λογισμικό SDS, έκδοση 1.4.1 ή νεότερη
- CFX96 Dx με λογισμικό CFX Manager Dx Software, έκδοση 3.1.3090.1022 ή νεότερη
- cobas z 480 με LightCycler® 480 SW UDF, έκδοση 2.0.0 ή νεότερη
- QuantStudio 5 Dx με λογισμικό QuantStudio 5 Dx IVD, έκδοση 1.0.1 ή νεότερη και QuantStudio 5 Dx με λογισμικό TD, έκδοση 1.0.1 ή νεότερη

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Αναλώσιμα και εξοπλισμός

Συνήθη αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης 2 ml
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Αναδευτήρας Vortex
- Θερμικό μπλοκ
- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας χωρίς νουκλεάση με φίλτρα
- Σωληνάρια 1,5 ml ή 2 ml χωρίς PCR
- Όργανο φυγοκέντρισης πλάκας 96 βυθισμάτων

Αναλώσιμα και εξοπλισμός για κάθε πλατφόρμα

Όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

- Σωληνάρια PCR 0,1 ml για χρήση με Rotor-Gene Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, αρ. κατ. 981103).
- 72-Well Rotor (αρ. κατ. 9018903) και Locking Ring 72-Well Rotor (αρ. κατ. 9018904)

Όργανο ABI 7500 Fast Dx

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

Όργανο CFX96 Dx

- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, χαμηλού προφίλ, λεπτού τοιχώματος, με παρυφή, λευκή/διαφανής (Bio-Rad Laboratories Inc., αρ. κατ. HSP9601)
- Microseal «B» PCR Plate Sealing Film, Adhesive, Optical (Bio-Rad Laboratories Inc., αρ. κατ. MSB1001).

Όργανο cobas z 480

- LightCycler 480 Multiwell Plate, λευκή (Roche Group, αρ. κατ. 04729692001).
- LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Group, αρ. κατ. 04729757001).

Όργανο QuantStudio 5 Dx

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

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Λάβετε υπόψη ότι ενδέχεται να χρειαστεί να ανατρέξετε στους τοπικούς κανονισμούς για την αναφορά σοβαρών συμβάντων που σχετίζονται με το προϊόν στον κατασκευαστή και στη ρυθμιστική αρχή στην οποία υπάγεται ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

Πληροφορίες ασφάλειας

Κατά τον χειρισμό χημικών ουσιών, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/safety, όπου μπορείτε να βρείτε, να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit της QIAGEN, καθώς και για τα εξαρτήματά του.

Φοράτε πάντοτε κατάλληλα μέσα ατομικής προστασίας, όπως μεταξύ άλλων γάντια μίας χρήσης χωρίς πούδρα, ποδιά εργαστηρίου και προστατευτικά γυαλιά. Να προστατεύετε το δέρμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους υμένες. Να αλλάζετε συχνά γάντια κατά τον χειρισμό δειγμάτων.

Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα. Τηρείτε πάντοτε τις προφυλάξεις ασφάλειας, όπως περιγράφονται σε σχετικές κατευθυντήριες οδηγίες, π.χ. στο έγγραφο του Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guideline (M29)* ή σε άλλα κατάλληλα έγγραφα.

Τα δοκίμια και τα δείγματα είναι δυνητικώς μολυσματικά. Τα απόβλητα των δειγμάτων και των προσδιορισμών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες ασφαλείας.

Προφυλάξεις

- Τηρείτε τις πρότυπες διαδικασίες εργαστηρίου για τη διατήρηση του χώρου εργασίας καθαρού και απαλλαγμένου από επιμόλυνση. Αφιερώστε έναν χώρο με ειδικό εξοπλισμό αποκλειστικά για τον χειρισμό RNA.
- Ακολουθείτε ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιείτε τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης.
- Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγετε την επιμόλυνση με RNάση κατά το πείραμα και χρησιμοποιείτε πλαστικά υλικά χωρίς RNάση.
- Διασφαλίστε ότι διαθέτετε καλή ιχνηλασιμότητα στα αρχεία σας, ειδικά όσον αφορά την ταυτοποίηση δειγμάτων.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή στις ημερομηνίες λήξης και τις συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μην χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.

Το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit μπορεί να διατηρηθεί σε θερμοκρασία $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την ημερομηνία λήξης.

Μεταφορά, φύλαξη και χειρισμός δειγμάτων

Το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit προορίζεται για χρήση με επιχρίσματα από ρινοφαρυγγικό στείλειό, ρινικό στείλειό και στοματοφαρυγγικό στείλειό και δείγματα καθαρού σάλιου. Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα. Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) και η υπηρεσίας δημόσιας υγείας της Αγγλίας (Public Health England) έχουν εκδώσει κατευθυντήριες οδηγίες για τη συλλογή, τον χειρισμό και την εξέταση δειγμάτων κλινικών δοκιμών. Ανατρέξτε στις εν λόγω κατευθυντήριες οδηγίες ή σε άλλα σχετικά εθνικά εργαστηριακά πρωτόκολλα αναφοράς για πρόσθετες πληροφορίες.

Συλλογή, μεταφορά και φύλαξη επιχρίσματος από ρινοφαρυγγικό, ρινικό και στοματοφαρυγγικό στείλειό

Για τη συλλογή, τη φύλαξη και τη μεταφορά επιχρισμάτων από στείλειό, ανατρέξτε στις συστάσεις του προμηθευτή. Ο στείλειός πρέπει να είναι πλήρως εμβυθισμένος στο μέσο μεταφοράς για να διατηρείται η ακεραιότητα του δείγματος. Τα δείγματα σε ρινοφαρυγγικό στείλειό παραμένουν σταθερά και μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία:

- 4 °C (2 έως 8 °C) για έως και 72 ώρες
- -70 °C για 2 εβδομάδες

Τα δείγματα σε ρινοφαρυγγικό στειλεό παραμένουν σταθερά για 3 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση δείγματος καθαρού σάλιου

Τα δείγματα καθαρού σάλιου πρέπει να συλλέγονται σε αποστειρωμένους περιέκτες χωρίς συντηρητικά, ρυθμιστικά διαλύματα ή άλλες πρόσθετες ουσίες.

Οδηγίες για τη συλλογή καθαρού σάλιου:

- Αποφεύγετε τον βήχα πριν από τη συλλογή καθαρού σάλιου.
- Μην τρώτε, πίνετε, καπνίζετε ή χρησιμοποιείτε ηλεκτρονικό τσιγάρο, μασάτε τσίχλα ή βουρτσίζετε τα δόντια σας 30 λεπτά πριν από τη συλλογή καθαρού σάλιου.
- Δεν πρέπει να διενεργηθούν οδοντιατρικές εργασίες ή οδοντιατρική εξέταση 24 ώρες πριν από τη συλλογή καθαρού σάλιου.

Τα δείγματα καθαρού σάλιου παραμένουν σταθερά και μπορούν να φυλαχθούν σε:

- Θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) για έως και 72 ώρες
- 4 °C (2 έως 8 °C) για έως και 72 ώρες
- Συνδυασμένη αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, RT), στη συνέχεια στους 4 °C και κατόπιν στους -20 °C (-30 έως -15 °C) για έως και 12 ημέρες
- -20 °C (-30 έως -15 °C) για 1 μήνα

Τα δείγματα καθαρού σάλιου παραμένουν σταθερά για 3 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

Σε περίπτωση που οι συνθήκες φύλαξης αποκλίνουν από αυτές τις οδηγίες, επαληθεύστε τις δικές σας συνθήκες φύλαξης.

Πρωτόκολλο: παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο RGQ MDx 5plex HRM

Το πρωτόκολλο αυτό περιγράφει την παρασκευή δείγματος και την προετοιμασία της real-time RT-PCR για την ανίχνευση των στόχων SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα επιχρίσματα από ρινικό, ρινοφαρυγγικό ή στοματοφαρυγγικό στείλειό αποθηκευμένα σε μέσο μεταφοράς και σε δείγματα καθαρού σάλιου στο όργανο RGQ MDx 5plex HRM real-time RT-PCR, συνδυνασμένο με το λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.1.49 (ή νεότερη).

Σημαντικά σημεία πριν ξεκινήσετε

- Επαληθεύστε ότι τηρούνται οι ημερομηνίες λήξης και οι συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μην χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.
- Χρησιμοποιείτε εξοπλισμό που έχει συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σωστά.
- Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγετε την επιμόλυνση με RNάσες κατά το πείραμα και χρησιμοποιείτε πλαστικά υλικά χωρίς νουκλεάσες.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την εκκίνηση

- Τα δείγματα από το αναπνευστικό μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) κατά τα βήματα της παρασκευής και της προετοιμασίας της αντίδρασης αλλά συνιστάται να διατηρούνται σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης.
- Τα δείγματα σάλιου μπορούν να φυλαχθούν σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης αλλά συνιστάται να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) κατά διάρκεια των βημάτων της παρασκευής και της προετοιμασίας της αντίδρασης.

- Πριν από τη χρήση, αφήστε τα SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, Water for NTC και SARS-CoV-2 Positive Control να αποψυχθούν πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου. Διατηρήστε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένα από το φως μέχρι τη χρήση.
- Πριν από τη χρήση, ομογενοποιήστε το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer και το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer αναστρέφοντάς τα 2–3 φορές (μην στροβιλίσετε) και στη συνέχεια εκτελέστε σύντομη φυγοκέντριση. Μπορείτε να ομογενοποιήσετε όλα τα άλλα επιμέρους αντιδραστήρια με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα ή αναστρέφοντας 2–3 φορές και στη συνέχεια εκτελώντας σύντομη φυγοκέντριση.
- Το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer αναστέλλει τις RNάσες που είναι παρούσες στα κλινικά δείγματα για το βήμα της ανίχνευσης αλλά δεν αποτελεί διάλυμα αδρανοποίησης του ιού. Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα.
- Επαληθεύστε ότι οι συνθήκες κυκλοποίησης της πλατφόρμας real-time RT-PCR είναι όπως ορίζει το πρωτόκολλο.
- Μπορείτε να κλασματοποιείτε τα αντιδραστήρια για να αποφεύγετε τους πολλούς κύκλους κατάψυξης–απόψυξης.
- Παρασκευάζετε πρόσφατα το μείγμα αντίδρασης (<2 ώρες μέχρι την εκκίνηση της πλάκας RT-PCR).
- Για να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο μόλυνσης, οι παρασκευές των δειγμάτων και της RT-PCR θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ξεχωριστούς χώρους.

Διαδικασία

Παρασκευή δείγματος: Για δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού στειλεού), ακολουθήστε το Βήμα 1. Για δείγματα σάλιου προχωρήστε στο Βήμα 2.

1. Δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού στειλεού):
 - 1a. Στροβιλίστε έντονα σε αναδευτήρα τύπου vortex τον στειλεό που περιέχει το δείγμα.

- 1b. Διαμοιράστε κλάσματα 50–200 µl του δείγματος σε σωληνάρια 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 1c. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 70 °C για 10 λεπτά σε θερμικό μπλοκ. Αφήστε τα δείγματα να κρυώσουν σε πάγο για τουλάχιστον 5 λεπτά και, στη συνέχεια, διατηρήστε τα δείγματα σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C.
2. Δείγματα σάλιου:
- 2a. Υγροποίηση (για τη διευκόλυνση της διανομής με πιπέτα): θερμάνετε το δείγμα σάλιου στους 95 °C για 15 λεπτά (μη καθορισμένος όγκος, περιέκτης ή θερμαντική συσκευή).
 - 2b. Ομογενοποιήστε το δείγμα αναροφώντας και διανέμοντας προσεκτικά με πιπέτα 8–10 φορές.
 - 2c. Διαμοιράστε ένα κλάσμα 50 µl του δείγματος σε σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 2d. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 95 °C για 15 λεπτά σε θερμικό μπλοκ, στη συνέχεια αφήστε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά μέχρι τη χορήγησή του στο βύθισμα PCR ή στο σωληνάριο.
3. Κατά την πρώτη χρήση, συμπληρώστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer με τη χρωστική ROX Reference Dye.
- 3a. Προσθέστε 32,8 µl της χρωστικής ROX σε 1 σωληνάριο με SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Κλείστε το καπάκι που περιέχει το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και τη χρωστική ROX και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές.
 - 3c. Φυγοκεντρίστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer που περιέχει χρωστική ROX ώστε να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
4. Για μια πλήρη πλάκα RGQ MDx (72 βυθισμάτων), παρασκευάστε ένα μείγμα κλασμάτων από εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers με εσωτερικό μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control.
- 4a. Μεταφέρετε τους απαιτούμενους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του SARS-CoV-2 Internal Control σύμφωνα με τον Πίνακα 1 σε ένα νέο σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.

- 4b. Κλείστε το καπάκι και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές ή εκτελέστε παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα.
- 4c. Φυγοκεντρίστε τους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers που περιέχουν τον εσωτερικό μάρτυρα (Internal Control, IC) ώστε να συγκεντρωθούν στον πυθμένα του σωληναρίου.

Πίνακας 1. Προετοιμασία μείγματος SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντίδρ.	72 αντιδρ. (+20% επιπλέον όγκος*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	626,4
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/μl	10 cp/μl	1,5	129,6
Συνολικό μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	756

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του εσωτερικού μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

5. Παρασκευάστε ένα μείγμα αντίδρασης σύμφωνα με τον Πίνακα 2 και αναμείξτε πλήρως, αναστρέφοντας 3 φορές το σωληνάριο.

Πίνακας 2. Προετοιμασία μείγματος αντίδρασης

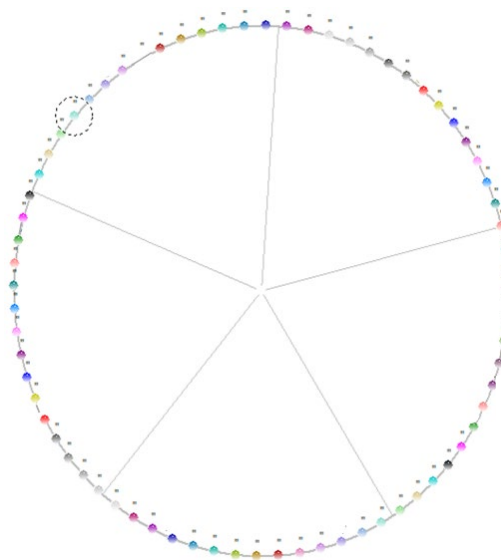
Μείγμα αντίδρασης RT-PCR				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντίδρ.	72 αντιδρ. (+20% επιπλέον όγκος*)
Μείγμα SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	540
Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	756
Συνολικός όγκος αντίδρασης		–	15,00	1296

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους των SARS-CoV-2 Amp Buffer και SARS-CoV-2 Amp Primers ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

6. Διανείμετε 8 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο σωληνάριο PCR που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NEC.
7. Χορηγήστε 10 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο σωληνάριο PCR που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NTC.
8. Διανείμετε 2 μl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer σε κάθε σωληνάριο PCR που αντιστοιχίζεται στον μάρτυρα NEC και τα παρασκευασμένα δείγματα.
9. Προσθέστε 8 μl του παρασκευασμένου δείγματος σε σωληνάριο PCR που περιέχει SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
10. Προσθέστε 15 μl από το μείγμα αντίδρασης που παρασκευάσατε στο βήμα 5 στα σωληνάρια που αντιστοιχούν στα δείγματα και τους μάρτυρες (δείτε ένα παράδειγμα στην Εικόνα 2). Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές και ύστερα κλείστε τα καπάκια των σωληναρίων PCR, με εξαίρεση εκείνο που αντιστοιχεί στον μάρτυρα SARS-CoV-2 Positive Control.
Σημείωση: Επιβεβαιώστε ότι τα σωληνάρια έχουν κλείσει καλά προς αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης.
11. Χορηγήστε 10 μl SARS-CoV-2 Positive Control στο κατάλληλο σωληνάριο PCR. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
12. Ρυθμίστε το πρόγραμμα της RT-PCR στο όργανο RGQ MDx 5plex HRM σύμφωνα με τις προδιαγραφές που ορίζει ο Πίνακας 3.
Σημείωση: Η λήψη δεδομένων θα πρέπει να πραγματοποιείται στη διάρκεια του βήματος υβριδοποίησης/επέκτασης.
13. Τοποθετήστε τα σωληνάρια στον κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου (παράδειγμα διάταξης σωληναρίων δίνεται στην Εικόνα 2) και ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης όπως περιγράφεται στον Πίνακα 3.
Σημείωση: Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να τηρείτε την ίδια τοποθέτηση και σειρά των σωληναρίων στο βήμα προετοιμασίας του προσδιορισμού και το βήμα κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου.

Πίνακας 3. Πρόγραμμα SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Βήματα	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αριθμός κύκλων	Λήψη
Αντίστροφη μεταγραφή	10 λεπτά	50	1	Όχι
Αρχική ενεργοποίηση θέρμανσης PCR	2 λεπτά	95	1	Όχι
Κυκλοποίηση 2 βημάτων				
Αποδιάταξη	5 s	95	40	Όχι
Υβριδοποίηση/Επέκταση	30 s	58		



- 1: PC
- 2: NTC
- 3: NEC
- 4: Δείγμα 1
- 5: Δείγμα 2
- 6: Δείγμα 3
- 7: ...

Εικόνα 2. Παράδειγμα διάταξης σωληναρίων στην πλατφόρμα RGQ MDx 5plex HRM

14. Πατήστε Gain optimization (Βελτιστοποίηση απολαβής) στο παράθυρο «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) και ανοίξτε το πλαίσιο Auto-gain Optimization Setup (Ρύθμιση παραμέτρων αυτόματης βελτιστοποίησης απολαβής).
15. Επαληθεύστε ότι τα κανάλια λήψης έχουν οριστεί όπως περιγράφει ο Πίνακας 4.

Πίνακας 4. Διαμόρφωση RGQ MDx 5plex HRM

Όνομα	Θέση σωληναρίου PC	Ελάχιστη τιμή ανάγνωσης (FI)	Μέγιστη τιμή ανάγνωσης (FI)	Ελάχιστη απολαβή	Μέγιστη απολαβή
Green	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

* **Σημείωση:** Πρέπει να αλλάζει ανάλογα με τη θέση του σωληναρίου SARS-CoV-2 Positive Control.

16. Επιλέξτε Perform optimization before the first acquisition (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν από την πρώτη λήψη).
17. Ξεκινήστε την εκτέλεση.
18. Στο τέλος της εκτέλεσης αναλύστε τα αποτελέσματα (βλ. ενότητα Αποτελέσματα).

Πρωτόκολλο: παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο ABI 7500 Fast Dx

Το πρωτόκολλο αφορά την παρασκευή και ανίχνευση στόχων SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα επιχρίσματα από ρινικό, ρινοφαρυγγικό ή στοματοφαρυγγικό στειλεό αποθηκευμένα σε μέσο μεταφοράς και σε δείγματα καθαρού σάλιου στο όργανο ABI 7500 Fast Dx real-time RT-PCR.

Σημαντικά σημεία πριν ξεκινήσετε

- Επαληθεύστε ότι τηρούνται οι ημερομηνίες λήξης και οι συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μην χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.
- Χρησιμοποιείτε εξοπλισμό που έχει συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σωστά.
- Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγετε την επιμόλυνση με RNάσες κατά το πείραμα και χρησιμοποιείτε πλαστικά υλικά χωρίς νουκλεάσες.
- Κατά τη χρήση του ABI 7500 Fast Dx πρέπει να προστίθεται χρωστική ROX στο σωληνάριο κύριου μείγματος πριν από την πρώτη χρήση.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την εκκίνηση

- Τα δείγματα από το αναπνευστικό μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) κατά τα βήματα της παρασκευής και της προετοιμασίας της αντίδρασης αλλά συνιστάται να διατηρούνται σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης.
- Τα δείγματα σάλιου μπορούν να φυλαχθούν σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης αλλά συνιστάται να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) κατά τη διάρκεια των βημάτων της παρασκευής και της προετοιμασίας της αντίδρασης.
- Η χρωστική ROX απαιτείται όταν γίνεται χρήση του ABI 7500 Fast Dx.
- Η λήψη δεδομένων πρέπει να πραγματοποιείται με ρύθμιση παθητικής χρωστικής ROX.

- Πριν από τη χρήση, αφήστε τα SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, Water for NTC και SARS-CoV-2 Positive Control να αποψυχθούν πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου. Διατηρήστε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένα από το φως μέχρι τη χρήση.
- Πριν από τη χρήση, ομογενοποιήστε το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer και το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer αναστρέφοντάς τα 2–3 φορές (μην στροβιλίσετε) και στη συνέχεια εκτελέστε σύντομη φυγοκέντριση. Μπορείτε να ομογενοποιήσετε όλα τα άλλα επιμέρους αντιδραστήρια με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα ή αναστρέφοντας 2–3 φορές και στη συνέχεια εκτελώντας σύντομη φυγοκέντριση.
- Το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer αναστέλλει τις RNάσες που είναι παρούσες στα κλινικά δείγματα για το βήμα της ανίχνευσης αλλά δεν αποτελεί διάλυμα αδρανοποίησης του ιού. Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα.
- Επαληθεύστε ότι οι συνθήκες κυκλοποίησης της πλατφόρμας real-time RT-PCR είναι όπως ορίζει το πρωτόκολλο.
- Μπορείτε να κλασματοποιείτε τα αντιδραστήρια για να αποφεύγετε τους πολλούς κύκλους κατάψυξης–απόψυξης.
- Παρασκευάζετε πρόσφατα το μείγμα αντίδρασης (<2 ώρες μέχρι την εκκίνηση της πλάκας RT-PCR).
- Για να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο μόλυνσης, οι παρασκευές των δειγμάτων και της RT-PCR θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ξεχωριστούς χώρους.

Διαδικασία

Παρασκευή δείγματος: Για δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού σπειλεού), ακολουθήστε το Βήμα 1. Για δείγματα σάλιου προχωρήστε στο Βήμα 2.

1. Δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού σπειλεού):
 - 1a. Στροβιλίστε έντονα σε αναδευτήρα τύπου vortex τον σπειλεό που περιέχει το δείγμα.
 - 1b. Διαμοιράστε κλάσματα 50–200 μl του δείγματος σε σωληνάρια 1,5 ml χωρίς PCR.

- 1c. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 70 °C για 10 λεπτά σε θερμικό μπλοκ.
 - 1d. Αφήστε τα δείγματα να κρυσώσουν σε πάγο για τουλάχιστον 5 λεπτά και, στη συνέχεια, διατηρήστε τα δείγματα σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C.
2. Δείγματα σάλιου:
- 2a. Υγροποίηση (για τη διευκόλυνση της διανομής με πιπέτα): θερμάνετε το δείγμα σάλιου στους 95 °C για 15 λεπτά (μη καθορισμένος όγκος, περιέκτης ή θερμαντική συσκευή).
 - 2b. Ομογενοποιήστε το δείγμα αναροφώντας και διανέμοντας προσεκτικά με πιπέτα 8–10 φορές
 - 2c. Διαμοιράστε ένα κλάσμα 50 μl του δείγματος σε σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 2d. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 95 °C για 15 λεπτά σε θερμικό μπλοκ, στη συνέχεια αφήστε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά μέχρι τη χορήγησή του στο βύθισμα PCR ή στο σωληνάριο.
3. Κατά την πρώτη χρήση, συμπληρώστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer με τη χρωστική ROX Reference Dye.
- 3a. Προσθέστε 32,8 μl της χρωστικής ROX σε σωληνάριο με SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Κλείστε το καπάκι που περιέχει το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και τη χρωστική ROX και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές.
 - 3c. Φυγοκεντρίστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer που περιέχει χρωστική ROX ώστε να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
4. Για μια πλήρη πλάκα ABI 7500 Fast Dx (96 βυθισμάτων), παρασκευάστε ένα μείγμα κλασμάτων από εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers με εσωτερικό μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control.
- 4a. Μεταφέρετε τους απαιτούμενους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του SARS-CoV-2 Internal Control σύμφωνα με τον Πίνακα 5 σε ένα νέο σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 4b. Κλείστε το καπάκι και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές ή εκτελέστε παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα.

- 4c. Φυγοκεντρίστε τους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers που περιέχουν τον εσωτερικό μάρτυρα (Internal Control, IC) ώστε το διάλυμα να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

Πίνακας 5. Προετοιμασία μείγματος SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντίδρ.	96 αντιδρ. (+ 20% επιπλέον όγκος*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/μl	10 cp/μl	1,5	172,8
Συνολικό μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του εσωτερικού μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

5. Παρασκευάστε ένα μείγμα αντίδρασης σύμφωνα με τον Πίνακα 6 και αναμειξτε πλήρως, αναστρέφοντας 3 φορές το σωληνάριο.

Πίνακας 6. Προετοιμασία μείγματος αντίδρασης

Μείγμα αντίδρασης RT-PCR				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντίδρ.	96 αντιδρ. (+20% επιπλέον όγκος*)
Μείγμα SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Συνολικός όγκος αντίδρασης		–	15,00	1728

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τον όγκο του SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

6. Διανείμετε 8 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NEC.
7. Χορηγήστε 10 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NTC.

8. Διανείμετε 2 μl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer σε κάθε βύθισμα που αντιστοιχίζεται στον μάρτυρα NEC και τα παρασκευασμένα δείγματα.
9. Προσθέστε 8 μl του παρασκευασμένου δείγματος σε βύθισμα που περιέχει SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
10. Προσθέστε 15 μl από το μείγμα αντίδρασης που παρασκευάσατε στο Βήμα 5 στα βύθισμα που αντιστοιχούν στα δείγματα και τους μάρτυρες (δείτε ένα παράδειγμα στην Εικόνα 3). Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
11. Χορηγήστε 10 μl SARS-CoV-2 Positive Control στο κατάλληλο βύθισμα. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
12. Σφραγίστε καλά την πλάκα PCR προς αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης. Διασφαλίστε ότι πιέζετε ομοιόμορφα σε όλη την έκταση της πλάκας για να επιτύχετε καλή σφράγιση σε κάθε βύθισμα ξεχωριστά.
13. Φυγοκεντρίστε για σύντομο διάστημα την πλάκα PCR ώστε το υγρό να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του βυθίσματος.
14. Ρυθμίστε το πρόγραμμα της real-time RT-PCR στη λειτουργία εκτέλεσης «Standard 7500» του ABI 7500 Fast Dx, όπως ορίζει ο Πίνακας 7.

Σημείωση: Αφού κάνετε κλικ στο **file** (αρχείο) και στο **new** (νέο), επαληθεύστε ότι ο προσδιορισμός είναι **Standard Curve (Absolute Quantitation)** [Πρότυπη καμπύλη (Απόλυτη ποσοτικοποίηση)] και το Run Mode (Τρόπος λειτουργίας εκτέλεσης) έχει οριστεί σε **Standard 7500**. Επιλέξτε τους FAM, VIC και Cy5 ως ανταποκριτές, με το Quencher (Παραμποδιστής) ορισμένο σε **None** (Κανένας), και η λήψη δεδομένων πρέπει να πραγματοποιείται με την ένδειξη **ROX** ως **passive reference** (αναφορά παθητικού).

Σημείωση: Η λήψη δεδομένων θα πρέπει να πραγματοποιείται στη διάρκεια του βήματος υβριδοποίησης/επέκτασης.

Σημείωση: Για περισσότερες λεπτομέρειες ανατρέξτε στις *Οδηγίες χρήσης του ABI 7500 Fast Dx*.

15. Τοποθετήστε την πλάκα στον κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου (παράδειγμα διάταξης πλάκας PCR δίνεται στην Εικόνα 3) και ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης όπως περιγράφεται στον Πίνακα 7.
16. Επιλέξτε τα βυθίσματα που χρησιμοποιούνται και εφαρμόστε τους ανταποκριτές FAM, VIC και Cy5. Η λήψη δεδομένων πρέπει να πραγματοποιείται με την παθητική χρωστική ROX στην επιλογή **ON** (Ενεργοποιημένη).
17. Επαληθεύστε ότι η πρότυπη καμπύλη του ABI 7500 Fast Dx είναι ρυθμισμένη στην επιλογή Absolute Quantitation (Απόλυτη ποσοτικοποίηση).
18. Ξεκινήστε την εκτέλεση.
19. Στο τέλος της εκτέλεσης αναλύστε τα αποτελέσματα (βλ. ενότητα «Αποτελέσματα»).

Πίνακας 7. Πρόγραμμα SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Βήματα	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αριθμός κύκλων	Λήψη
Αντίστροφη μεταγραφή	10 λεπτά	50	1	Όχι
Αρχική ενεργοποίηση θέρμανσης PCR	2 λεπτά	95	1	Όχι
Κυκλοποίηση 2 βημάτων				
Αποδιάταξη	5 s	95	40	Όχι
Υβριδοποίηση/Επέκταση	30 s	58		FAM, VIC και Cy5

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

Εικόνα 3. Παράδειγμα διάταξης πλάκας σε ABI 7500 Fast Dx

Πρωτόκολλο: Παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο CFX96 Dx

Το πρωτόκολλο αυτό αφορά την παρασκευή και ανίχνευση στόχων SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα επιχρίσματα από ρινικό, ρινοφαρυγγικό ή στοματοφαρυγγικό στείλει αποθηκευμένα σε μέσο μεταφοράς και σε δείγματα καθαρού σάλιου στο CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., αρ. κατ. 1845097-IVD). (μονάδα οπτικής αντίδρασης) και 1841000-IVD (μονάδα θερμικού κυκλοποιητή) με λογισμικό CFX Manager Dx, έκδοση 3.1.309001022 ή νεότερη.

Σημαντικά σημεία πριν ξεκινήσετε

- Επαληθεύστε ότι τηρούνται οι ημερομηνίες λήξης και οι συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μην χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.
- Χρησιμοποιείτε εξοπλισμό που έχει συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σωστά.
- Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγετε την επιμόλυνση με RNάσες κατά το πείραμα και χρησιμοποιείτε πλαστικά υλικά χωρίς νουκλεάσες.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την εκκίνηση

- Τα δείγματα από το αναπνευστικό μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) κατά τα βήματα της παρασκευής και της προετοιμασίας της αντίδρασης αλλά συνιστάται να διατηρούνται σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης.
- Τα δείγματα σάλιου μπορούν να φυλαχθούν σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης αλλά συνιστάται να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) κατά τη διάρκεια των βημάτων της παρασκευής και της προετοιμασίας της αντίδρασης.

- Πριν από τη χρήση, αφήστε τα SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, Water for NTC και SARS-CoV-2 Positive Control να αποψυχθούν πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου. Διατηρήστε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένα από το φως μέχρι τη χρήση.
- Πριν από τη χρήση, ομογενοποιήστε το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer και το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer αναστρέφοντάς τα 2–3 φορές (μην στροβιλίσετε) και στη συνέχεια εκτελέστε σύντομη φυγοκέντριση. Μπορείτε να ομογενοποιήσετε όλα τα άλλα επιμέρους αντιδραστήρια με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα ή αναστρέφοντας 2–3 φορές και στη συνέχεια εκτελώντας σύντομη φυγοκέντριση.
- Το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer αναστέλλει τις RNάσες που είναι παρούσες στα κλινικά δείγματα για το βήμα της ανίχνευσης αλλά δεν αποτελεί διάλυμα αδρανοποίησης του ιού. Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα.
- Επαληθεύστε ότι οι συνθήκες κυκλοποίησης της πλατφόρμας real-time RT-PCR είναι όπως ορίζει το πρωτόκολλο.
- Μπορείτε να κλασματοποιείτε τα αντιδραστήρια για να αποφεύγετε τους πολλούς κύκλους κατάψυξης–απόψυξης.
- Παρασκευάζετε εκείνη την ώρα το μείγμα αντίδρασης (<2 ώρες μέχρι την εκκίνηση της πλάκας PCR).
- Για να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο μόλυνσης, οι παρασκευές των δειγμάτων και της real-time RT-PCR θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ξεχωριστούς χώρους.

Διαδικασία:

Παρασκευή δείγματος: Για δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού σπειλεού), ακολουθήστε το Βήμα 1. Για δείγματα σάλιου προχωρήστε στο Βήμα 2.

1. Δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού σπειλεού):
 - 1a. Στροβιλίστε έντονα σε αναδευτήρα τύπου vortex τον σπειλεό που περιέχει το δείγμα

- 1b. Διαμοιράστε κλάσματα 50–200 μl του δείγματος σε σωληνάρια 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 1c. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 70 °C για 10 λεπτά σε θερμικό μπλοκ.
 - 1d. Αφήστε τα δείγματα να κρυώσουν σε πάγο για τουλάχιστον 5 λεπτά και, στη συνέχεια, διατηρήστε τα δείγματα σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C.
2. Δείγματα σάλιου:
- 2a. Υγροποίηση (για τη διευκόλυνση της διανομής με πιπέτα): θερμάνετε το δείγμα σάλιου στους 95 °C για 15 λεπτά (μη καθορισμένος όγκος, περιέκτης ή θερμομαντική συσκευή).
 - 2b. Ομογενοποιήστε το δείγμα αναροφώντας και διανέμοντας προσεκτικά με πιπέτα 8–10 φορές.
 - 2c. Διαμοιράστε ένα κλάσμα 50 μl του δείγματος σε σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 2d. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 95 °C για 15 λεπτά σε θερμικό μπλοκ. Στη συνέχεια αφήστε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά μέχρι τη χορήγησή του στο βύθισμα PCR ή στο σωληνάριο.
3. Κατά την πρώτη χρήση, συμπληρώστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer με τη χρωστική ROX Reference Dye.
- 3a. Προσθέστε 32,8 μl της χρωστικής ROX σε 1 σωληνάριο με SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Κλείστε το καπάκι που περιέχει το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και τη χρωστική ROX και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές.
 - 3c. Φυγοκεντρίστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer που περιέχει χρωστική ROX ώστε να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
4. Για μια πλήρη πλάκα CFX96 Dx (96 βυθισμάτων), παρασκευάστε ένα μείγμα κλασμάτων από εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers με εσωτερικό μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control.
- 4a. Μεταφέρετε τους απαιτούμενους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του εσωτερικού μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control σύμφωνα με τον Πίνακα 8 σε ένα νέο σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 4b. Κλείστε το καπάκι και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές ή εκτελέστε παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα.

- 4c. Φυγοκεντρίστε τους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers που περιέχουν τον εσωτερικό μάρτυρα (IC) ώστε το διάλυμα να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

Πίνακας 8. Προετοιμασία μείγματος SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντιδρ.	Αριθμός αντιδράσεων
				Όγκος (μl)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	96 αντιδρ. (+ 20% επιπλέον όγκος*)
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/μl	10 cp/μl	1,5	172,8
Συνολικό μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του εσωτερικού μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

5. Παρασκευάστε ένα μείγμα αντίδρασης σύμφωνα με τον Πίνακα 9 και αναμείξτε πλήρως, αναστρέφοντας 3 φορές το σωληνάριο.

Πίνακας 9. Προετοιμασία μείγματος αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντιδρ.	Αριθμός αντιδράσεων
				Όγκος (μl)
Μείγμα SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	96 αντιδρ. (+20% επιπλέον όγκος*)
Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Συνολικός όγκος αντίδρασης		–	15,00	1728

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους του SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

6. Διανείμετε 8 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NEC.
7. Χορηγήστε 10 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NTC.

8. Διανείμετε 2 μl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer σε κάθε βύθισμα που αντιστοιχίζεται στον μάρτυρα NEC και τα παρασκευασμένα δείγματα.
9. Προσθέστε 8 μl του παρασκευασμένου δείγματος σε βύθισμα που περιέχει SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
10. Προσθέστε 15 μl από το μείγμα αντίδρασης που παρασκευάσατε στο βήμα 5 στα βύθισμα που αντιστοιχούν στα δείγματα και τους μάρτυρες (δείτε ένα παράδειγμα στην Εικόνα 4). Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
11. Χορηγήστε 10 μl SARS-CoV-2 Positive Control στο κατάλληλο βύθισμα. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
12. Σφραγίστε καλά την πλάκα PCR προς αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης. Διασφαλίστε ότι πιέζετε ομοιόμορφα σε όλη την έκταση της πλάκας για να επιτύχετε καλή σφράγιση σε κάθε βύθισμα ξεχωριστά.
13. Φυγοκεντρίστε για σύντομο διάστημα την πλάκα PCR ώστε το υγρό να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του βυθίσματος.
14. Στο CFX Manager Dx Software (Λογισμικό CFX Manager Dx) > Startup Wizard (Οδηγός εκκίνησης), για το run type (τύπος εκτέλεσης) επιλέξτε user defined (καθοριζόμενο από τον χρήστη).
15. Καρτέλα **Protocol** (Πρωτόκολλο): Ρυθμίστε το πρόγραμμα της real-time RT-PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 10 για 25 μl όγκου αντίδρασης.

Σημείωση: Στο παράθυρο **Protocol Editor** (Πρόγραμμα επεξεργασίας πρωτοκόλλου), κάντε κλικ στο κουμπί **Step Options** (Επιλογές βήματος) για να προσαρμόσετε τον ρυθμό κλιμάκωσης σε 1,6 °C/sec σε κάθε ένα από τα 4 βήματα του προγράμματος RT-PCR.

Σημείωση: Η λήψη δεδομένων θα πρέπει να πραγματοποιείται στη διάρκεια του βήματος υβριδοποίησης/επέκτασης.

Σημείωση: Για περισσότερες λεπτομέρειες ανατρέξτε στις *Οδηγίες χρήσης του CFX96 Dx*.
16. Καρτέλα **Plate** (Πλάκα): Επιλέξτε τα βυθίσματα που χρησιμοποιούνται και εφαρμόστε τους ανταποκριτές FAM, HEX και Cy5.

17. Τοποθετήστε την πλάκα στον κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου (παράδειγμα διάταξης πλάκας PCR δίνεται στην Εικόνα 4).
18. Καρτέλα **Start Run** (Έναρξη εκτέλεσης): κάντε κλικ στο Start the run (Έναρξη της εκτέλεσης).
19. Στο τέλος της εκτέλεσης αναλύστε τα αποτελέσματα (βλ. ενότητα «Αποτελέσματα»).

Πίνακας 10. Πρόγραμμα SARS-CoV-2 Prep&Amp UM για το CFX96 Dx

Βήματα	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός κλιμάκωσης (°C/sec)	Αριθμός επαναλήψεων	Λήψη
1. Αντίστροφη μεταγραφή	10 λεπτά	50	1,6	1	Όχι
2. Αρχική ενεργοποίηση θέρμανσης PCR	2 λεπτά	95	1,6	1	Όχι
Κυκλοποίηση 2 βημάτων				39*	
Αποδιάταξη	5 s	95	1,6	1	Όχι
Υβριδοποίηση/Επέκταση	30 s	58	1,6	1	FAM, HEX και Cy5

*Το CFX λειτουργεί με επανάληψη. Για να εκτελέσει 40 κύκλους το πρόγραμμα, πρέπει να οριστούν 39 επαναλήψεις για την κυκλοποίηση δύο βημάτων (ως Βήμα 5 «GOTO» στο λογισμικό).

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

Εικόνα 4. Παράδειγμα διάταξης πλάκας στο CFX96 Dx

Πρωτόκολλο: Παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο cobas z 480

Το πρωτόκολλο αυτό περιγράφει την παρασκευή δείγματος και την προετοιμασία της real-time RT-PCR για την ανίχνευση των στόχων SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα επιχρίσματα από ρινικό, ρινοφαρυγγικό ή στοματοφαρυγγικό στείλειο αποθηκευμένα σε μέσο μεταφοράς και σε δείγματα καθαρού σάλιου στο cobas z 480 με LightCycler 480 SW UDF, έκδοση 2.0.0 (ή νεότερη).

Σημαντικά σημεία πριν ξεκινήσετε.

- Επαληθεύστε ότι τηρούνται οι ημερομηνίες λήξης και οι συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μην χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.
- Χρησιμοποιείτε εξοπλισμό που έχει συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σωστά.
- Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγετε την επιμόλυνση με RNάσες κατά το πείραμα και χρησιμοποιείτε πλαστικά υλικά χωρίς νουκλεάσες.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την εκκίνηση.

- Τα δείγματα από το αναπνευστικό μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου κατά το βήμα της παρασκευής και της προετοιμασίας αντίδρασης αλλά συνιστάται να διατηρούνται σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης.
- Τα δείγματα σάλιου μπορούν να φυλαχθούν σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης αλλά συνιστάται να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) κατά τη διάρκεια των βημάτων της παρασκευής και της προετοιμασίας της αντίδρασης.
- Πριν από τη χρήση, αφήστε τα SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, Water for NTC και SARS-CoV-2 Positive Control να αποψυχθούν πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C).

Διατηρήστε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένα από το φως μέχρι τη χρήση.

- Πριν από τη χρήση, ομογενοποιήστε το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer και το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer αναστρέφοντάς τα 2–3 φορές (μην στροβιλίσετε) και στη συνέχεια εκτελέστε σύντομη φυγοκέντριση. Μπορείτε να ομογενοποιήσετε όλα τα άλλα επιμέρους αντιδραστήρια με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα ή αναστρέφοντας 2–3 φορές και στη συνέχεια εκτελώντας σύντομη φυγοκέντριση.
- Το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer αναστέλλει τις RNάσες που είναι παρούσες στα κλινικά δείγματα για το βήμα της ανίχνευσης αλλά δεν αποτελεί διάλυμα αδρανοποίησης του ιού. Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα.
- Επαληθεύστε ότι οι συνθήκες κυκλοποίησης της πλατφόρμας real-time RT-PCR είναι όπως ορίζει το πρωτόκολλο.
- Μπορείτε να κλασματοποιείτε τα αντιδραστήρια για να αποφεύγετε τους πολλούς κύκλους κατάψυξης–απόψυξης.
- Παρασκευάζετε εκείνη την ώρα το μείγμα αντίδρασης (<2 ώρες μέχρι την εκκίνηση της πλάκας real-time RT-PCR).
- Για να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο μόλυνσης, οι παρασκευές των δειγμάτων και της real-time RT-PCR θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ξεχωριστούς χώρους.

Διαδικασία:

Παρασκευή δείγματος: Για δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού σπειλεού), ακολουθήστε το Βήμα 1. Για δείγματα σάλιου προχωρήστε στο Βήμα 2.

1. Δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού σπειλεού):
 - 1a. Στροβιλίστε έντονα σε αναδευτήρα τύπου vortex τον σπειλεό που περιέχει το δείγμα.
 - 1b. Διαμοιράστε κλάσματα 50–200 μl του δείγματος σε σωληνάρια 1,5 ml χωρίς PCR.

- 1c. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 70 °C για 10 λεπτά σε θερμικό μπλοκ.
 - 1d. Αφήστε τα δείγματα να κρυσώσουν σε πάγο για τουλάχιστον 5 λεπτά και, στη συνέχεια, διατηρήστε τα δείγματα σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C.
2. Δείγματα σάλιου:
- 2a. Υγροποίηση (για τη διευκόλυνση της διανομής με πιπέτα): θερμάνετε το δείγμα σάλιου στους 95 °C για 15 λεπτά (μη καθορισμένος όγκος, περιέκτης ή θερμαντική συσκευή).
 - 2b. Ομογενοποιήστε το δείγμα αναροφώντας και διανέμοντας προσεκτικά με πιπέτα 8–10 φορές.
 - 2c. Διαμοιράστε ένα κλάσμα 50 μl του δείγματος σε σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 2d. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 95 °C για 15 λεπτά σε θερμικό μπλοκ, στη συνέχεια αφήστε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά μέχρι τη χορήγησή του στο βύθισμα PCR ή στο σωληνάριο.
3. Κατά την πρώτη χρήση, συμπληρώστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer με τη χρωστική ROX Reference Dye.
- 3a. Προσθέστε 32,8 μl της χρωστικής ROX σε 1 σωληνάριο με SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Κλείστε το καπάκι που περιέχει το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και τη χρωστική ROX και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές.
 - 3c. Φυγοκεντρίστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer που περιέχει χρωστική ROX ώστε να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
4. Για μια πλήρη πλάκα cobas z 480 (96 βυθισμάτων), παρασκευάστε ένα μείγμα κλασμάτων από εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers με εσωτερικό μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control.
- 4a. Μεταφέρετε τους απαιτούμενους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του εσωτερικού μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control σύμφωνα με τον Πίνακα 11 σε ένα νέο σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 4b. Κλείστε το καπάκι και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές ή εκτελέστε παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα.

- 4c. Φυγοκεντρίστε τους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers που περιέχουν τον εσωτερικό μάρτυρα (Internal Control, IC) ώστε το διάλυμα να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

Πίνακας 11. Προετοιμασία μείγματος SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντίδρ.	96 αντιδρ. (+ 20% επιπλέον όγκος*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/μl	10 cp/μl	1,5	172,8
Συνολικό μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του εσωτερικού μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

5. Παρασκευάστε ένα μείγμα αντίδρασης σύμφωνα με τον Πίνακα 12 και αναμειξτε πλήρως, αναστρέφοντας 3 φορές το σωληνάριο.

Πίνακας 12. Προετοιμασία μείγματος αντίδρασης

Μείγμα αντίδρασης RT-PCR				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντίδρ.	96 αντιδρ. (+20% επιπλέον όγκος*)
Μείγμα SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Συνολικός όγκος αντίδρασης		–	15,00	1728

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους του SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

6. Διανείμετε 8 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NEC.

7. Χορηγήστε 10 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NTC.
8. Διανείμετε 2 μl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer σε κάθε βύθισμα που αντιστοιχίζεται στον μάρτυρα NEC και τα παρασκευασμένα δείγματα.
9. Προσθέστε 8 μl του παρασκευασμένου δείγματος σε βύθισμα που περιέχει SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
10. Προσθέστε 15 μl από το μείγμα αντίδρασης που παρασκευάσατε στο βήμα 5 στα βύθισμα που αντιστοιχούν στα δείγματα και τους μάρτυρες (δείτε ένα παράδειγμα στην Εικόνα 5). Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
11. Χορηγήστε 10 μl SARS-CoV-2 Positive Control στο κατάλληλο βύθισμα. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
12. Σφραγίστε καλά την πλάκα PCR προς αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης. Διασφαλίστε ότι πιέζετε ομοιόμορφα σε όλη την έκταση της πλάκας για να επιτύχετε καλή σφράγιση σε κάθε βύθισμα ξεχωριστά.
13. Φυγοκεντρίστε για σύντομο διάστημα την πλάκα PCR ώστε το υγρό να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του βυθίσματος.
14. **Πρώτη χρήση:** Στο λογισμικό Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0, κάντε κλικ στο **open tools** (άνοιγμα εργαλείων) και επιλέξτε **detection formats** (Μορφές ανίχνευσης) για να ορίσετε τους παρακάτω συνδυασμούς διέγερσης-εκπομπής: 465-510 (FAM), 540-580 (HEX) και 610-670 (ATTO647N).
15. Ρυθμίστε το πρόγραμμα της real-time RT-PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 13 για 25 μl όγκου αντίδρασης.

Σημείωση: Στο επάνω μέρος της σελίδας, ορίστε **detection format** (μορφή ανίχνευσης) για να επιλεγεί η μορφή ανίχνευσης που δημιουργήθηκε στο Βήμα 14.

Σημείωση: Χρησιμοποιήστε έναν προσαρμοσμένο ρυθμό κλιμάκωσης 1,6 °C/sec σε κάθε ένα από τα 5 βήματα του προγράμματος real-time RT-PCR.

Σημείωση: Η λήψη δεδομένων θα πρέπει να πραγματοποιείται στη διάρκεια του βήματος υβριδοποίησης/επέκτασης.

Σημείωση: Για περισσότερες λεπτομέρειες ανατρέξτε στις *Οδηγίες χρήσης του cobas z 480*.

16. Τοποθετήστε την πλάκα στον κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου (παράδειγμα διάταξης πλάκας PCR δίνεται στην Εικόνα 5).
17. Ξεκινήστε την εκτέλεση.
18. Στο τέλος της εκτέλεσης αναλύστε τα αποτελέσματα (βλ. ενότητα «Αποτελέσματα»).

Πίνακας 13. Πρόγραμμα SARS-CoV-2 Prep&Amp UM για το cobas z 480

Βήματα	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός κλιμάκωσης (°C/sec)	Αριθμός κύκλων	Τρόπος ανάλυσης
Αντίστροφη μεταγραφή	10 λεπτά	50	1,6	1	Κανένας
Αρχική ενεργοποίηση θέρμανσης PCR	2 λεπτά	95	1,6	1	Κανένας
Κυκλοποίηση 2 βημάτων				40	Ποσοτικοποίηση
Αποδιάταξη	5 s	95	1,6		Κανένας
Υβριδοποίηση/Επέκταση	30 s	58	1,6		Μεμονωμένος
Ψύξη	1 λεπτό	37	1,6	1	Κανένας

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

Εικόνα 5. Παράδειγμα διάταξης πλακιδίου στο cobas z 480

Πρωτόκολλο: Παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο QuantStudio 5 Dx

Το πρωτόκολλο αυτό αφορά την παρασκευή και ανίχνευση στόχων SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα επιχρίσματα από ρινικό, ρινοφαρυγγικό ή στοματοφαρυγγικό στείλειό αποθηκευμένα σε μέσο μεταφοράς και σε δείγματα καθαρού σάλιου στο όργανο QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR.

Σημαντικά σημεία πριν ξεκινήσετε.

- Επαληθεύστε ότι τηρούνται οι ημερομηνίες λήξης και οι συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μην χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.
- Χρησιμοποιείτε εξοπλισμό που έχει συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σωστά.
- Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγετε την επιμόλυνση με RNάσες κατά το πείραμα και χρησιμοποιείτε πλαστικά υλικά χωρίς νουκλεάσες.
- Κατά τη χρήση του QuantStudio 5 Dx πρέπει να προστίθεται χρωστική ROX στο σωληνάριο κύριου μείγματος πριν από την πρώτη χρήση.

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την εκκίνηση

- Τα δείγματα από το αναπνευστικό μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου κατά το βήμα της παρασκευής και της προετοιμασίας αντίδρασης αλλά συνιστάται να διατηρούνται σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης.
- Το δείγμα σάλιου μπορεί να φυλαχθεί σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C σε θήκη ψύξης αλλά συνιστάται να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) κατά τη διάρκεια των βημάτων της παρασκευής και της προετοιμασίας της αντίδρασης.
- Η χρωστική ROX απαιτείται όταν γίνεται χρήση του QuantStudio 5.

- Πριν από τη χρήση, αφήστε τα SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, Water for NTC και SARS-CoV-2 Positive Control να αποψυχθούν πλήρως σε θερμοκρασία 15–25 °C. Διατηρήστε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένα από το φως μέχρι τη χρήση.
- Πριν από τη χρήση, ομογενοποιήστε το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer και το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer αναστρέφοντάς τα 2–3 φορές (μην στροβιλίσετε) και στη συνέχεια εκτελέστε σύντομη φυγοκέντριση. Μπορείτε να ομογενοποιήσετε όλα τα άλλα επιμέρους αντιδραστήρια με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα ή αναστρέφοντας 2–3 φορές και στη συνέχεια εκτελώντας σύντομη φυγοκέντριση.
- Το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer αναστέλλει τις RNάσες που είναι παρούσες στα κλινικά δείγματα για το βήμα της ανίχνευσης αλλά δεν αποτελεί διάλυμα αδρανοποίησης του ιού. Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα.
- Επαληθεύστε ότι οι συνθήκες κυκλοποίησης της πλατφόρμας real-time RT-PCR είναι όπως ορίζει το πρωτόκολλο.
- Μπορείτε να κλασματοποιείτε τα αντιδραστήρια για να αποφεύγετε τους πολλούς κύκλους κατάψυξης–απόψυξης.
- Παρασκευάζετε εκείνη την ώρα το μείγμα αντίδρασης (<2 ώρες μέχρι την εκκίνηση της πλάκας real-time RT-PCR).
- Για να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο μόλυνσης, οι παρασκευές των δειγμάτων και της real-time RT-PCR θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ξεχωριστούς χώρους.

Διαδικασία

Παρασκευή δείγματος: Για δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού στειλεού), ακολουθήστε το Βήμα 1. Για δείγματα σάλιου προχωρήστε στο Βήμα 2.

1. Δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινικού, στοματοφαρυγγικού και ρινοφαρυγγικού στειλεού):
 - 1a. Στροβιλίστε έντονα σε αναδευτήρα τύπου vortex τον στειλεό που περιέχει το δείγμα.
 - 1b. Διαμοιράστε κλάσματα 50–200 μl του δείγματος σε σωληνάρια 1,5 ml χωρίς PCR.

- 1c. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 70 °C για 10 λεπτά σε θερμικό μπλοκ.
- 1d. Αφήστε τα δείγματα να κρυώσουν σε πάγο για τουλάχιστον 5 λεπτά και, στη συνέχεια, διατηρήστε τα δείγματα σε πάγο ή σε θερμοκρασία 4 °C.
2. Δείγματα σάλιου:
 - 2a. Υγροποίηση (για τη διευκόλυνση της διανομής με πιπέτα): θερμάνετε το δείγμα σάλιου στους 95 °C για 15 λεπτά (μη καθορισμένος όγκος, περιέκτης ή θερμαντική συσκευή).
 - 2b. Ομογενοποιήστε το δείγμα αναροφώντας και διανέμοντας προσεκτικά με πιπέτα 8–10 φορές.
 - 2c. Διαμοιράστε ένα κλάσμα 50 μl του δείγματος σε σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 2d. Εκτελέστε το βήμα της θέρμανσης σε θερμοκρασία 95 °C για 15 λεπτά σε θερμικό μπλοκ, στη συνέχεια αφήστε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά μέχρι τη χορήγησή του στο βύθισμα PCR ή στο σωληνάριο.
3. Κατά την πρώτη χρήση, συμπληρώστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer με τη χρωστική ROX Reference Dye.
 - 3a. Προσθέστε 32,8 μl της χρωστικής ROX σε σωληνάριο με SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Κλείστε το καπάκι που περιέχει το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και τη χρωστική ROX και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές.
 - 3c. Φυγοκεντρίστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer που περιέχει χρωστική ROX ώστε να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
4. Για μια πλήρη πλάκα QuantStudio 5 Dx (96 βυθισμάτων), παρασκευάστε ένα μείγμα κλασμάτων από εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers με εσωτερικό μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Μεταφέρετε τους απαιτούμενους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του εσωτερικού μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control σύμφωνα με τον Πίνακα 14 σε ένα νέο σωληνάριο 1,5 ml χωρίς PCR.
 - 4b. Κλείστε το καπάκι και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές ή εκτελέστε παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3–5 δευτερόλεπτα.

- 4c. Φυγοκεντρίστε τους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers που περιέχουν τον εσωτερικό μάρτυρα (Internal Control, IC) ώστε το διάλυμα να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

Πίνακας 14. Προετοιμασία μείγματος SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντιδρ.	96 αντιδρ. (+ 20% επιπλέον όγκος*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/μl	10 cp/μl	1,5	172,8
Συνολικό μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers και του εσωτερικού μάρτυρα SARS-CoV-2 Internal Control ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

5. Παρασκευάστε ένα μείγμα αντίδρασης σύμφωνα με τον Πίνακα 15 και αναμείξτε πλήρως αναστρέφοντας το σωληνάριο 3 φορές.

Πίνακας 15. Προετοιμασία μείγματος αντίδρασης

Μείγμα αντίδρασης RT-PCR				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντιδρ.	96 αντιδρ. (+20% επιπλέον όγκος*)
Μείγμα SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Συνολικός όγκος αντίδρασης		–	15,00	1728

* **Σημείωση:** Προσαρμόζετε τους όγκους του SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και των εκκινητών SARS-CoV-2 Amp Primers ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση. Εξετάστε το ενδεχόμενο επιπλέον όγκου για να αντισταθμίσετε τον νεκρό όγκο.

6. Διανείμετε 8 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NEC.
7. Χορηγήστε 10 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NTC.

8. Διανείμετε 2 μl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer σε κάθε βύθισμα που αντιστοιχίζεται στον μάρτυρα NEC και τα παρασκευασμένα δείγματα.
9. Προσθέστε 8 μl του παρασκευασμένου δείγματος σε βύθισμα που περιέχει SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Αναμείξτε αναρροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
10. Προσθέστε 15 μl από το μείγμα αντίδρασης που παρασκευάσατε στο βήμα 5 στα βυθίσματα που αντιστοιχούν στα δείγματα και τους μάρτυρες (δείτε ένα παράδειγμα στην Εικόνα 6). Αναμείξτε αναρροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
11. Χορηγήστε 10 μl SARS-CoV-2 Positive Control στο κατάλληλο βύθισμα. Αναμείξτε αναρροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
12. Σφραγίστε καλά την πλάκα PCR προς αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης. Διασφαλίστε ότι πιέζετε ομοιόμορφα σε όλη την έκταση της πλάκας για να επιτύχετε καλή σφράγιση σε κάθε βύθισμα ξεχωριστά.
13. Φυγοκεντρίστε για σύντομο διάστημα την πλάκα PCR ώστε το υγρό να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του βυθίσματος.
14. **Πρώτη χρήση:** Το πρότυπο πρέπει να δημιουργηθεί στο λογισμικό QuantStudio 5 Dx TD, έκδοση 1.0.1 ή νεότερη και να δημοσιευτεί πριν από την έναρξη της εκτέλεσης στο λογισμικό QuantStudio 5 Dx IVD. Ρυθμίστε το πρότυπο αναλόγως:

Σημείωση: Στην καρτέλα **Properties** (Ιδιότητες), διαμορφώστε το **Experiment type** (Τύπος πειράματος) σε **Standard Curve** (Πρότυπη καμπύλη) και το **Run mode** (Τρόπος λειτουργίας εκτέλεσης) σε **Standard** (Πρότυπο).

Σημείωση: Στην καρτέλα **Method** (Μέθοδος), ρυθμίστε το πρόγραμμα της real-time RT-PCR για 25 μl όγκου αντίδρασης (Πίνακας 16).

Σημείωση: Η λήψη δεδομένων θα πρέπει να πραγματοποιείται στη διάρκεια του βήματος υβριδοποίησης/επέκτασης.

Σημείωση: Στην καρτέλα **Plate** (Πλάκα), επιλέξτε **ROX** ως **Passive Reference** (Αναφορά παθητικού) και ορίστε τα FAM, VIC και Cy5 ως Targets (Στόχοι) χωρίς Quencher (Παραμποδιστής) [Επιλέξτε **None** (Κανένας)].

Σημείωση: Για περισσότερες λεπτομέρειες ανατρέξτε στις *Οδηγίες χρήσης του QuantStudio 5 Dx*.

15. Στο λογισμικό QuantStudio 5 Dx IVD, φορτώστε το πρότυπο που δημιουργήθηκε προηγουμένως στο Βήμα 14. Επιλέξτε τα βυθίσματα που χρησιμοποιούνται και εφαρμόστε τους στόχους FAM, VIC και Cy5.
16. Τοποθετήστε την πλάκα στον κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου (παράδειγμα διάταξης πλάκας PCR δίνεται στην Εικόνα 6).
17. Ξεκινήστε την εκτέλεση.
18. Στο τέλος της εκτέλεσης αναλύστε τα αποτελέσματα (βλ. ενότητα «Αποτελέσματα»).

Πίνακας 16. Πρόγραμμα SARS-CoV-2 Prep&Amp UM για το QuantStudio 5 Dx

Στάδιο	Βήμα	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αριθμός κύκλων	Λήψη
Διατήρηση	1. Αντίστροφη μεταγραφή	10 λεπτά	50	1	Όχι
	2. Αρχική ενεργοποίηση θέρμανσης PCR	2 λεπτά	95	1	Όχι
PCR	Κυκλοποίηση 2 βημάτων			40	
	Αποδιάταξη	5 s	95	1	Όχι
	Υβριδοποίηση/Επέκταση	30 s	58	1	FAM, VIC και Cy5

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

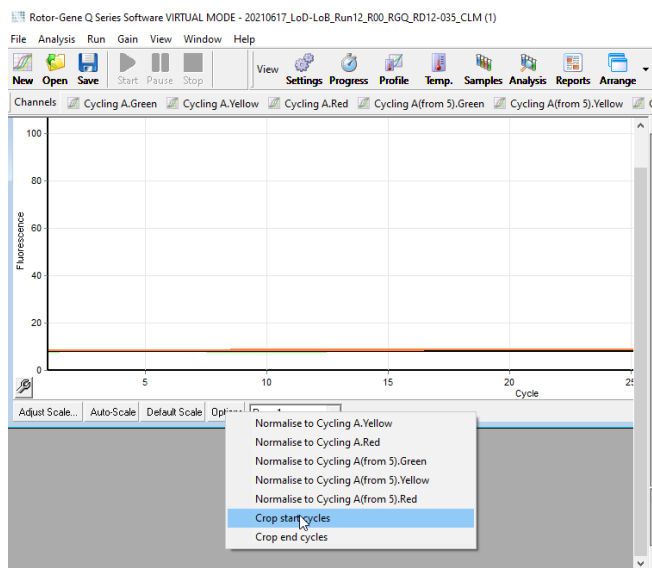
Εικόνα 6. Παράδειγμα διάταξης πλάκας στο QuantStudio 5 Dx

Αποτελέσματα

Ανάλυση στο RGQ MDx 5plex HRM

Στο RGQ MDx 5plex HRM τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό Rotor-Gene Q έκδοσης 2.3.1 (ή νεότερης) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (εγχειρίδιο χρήστη του Rotor-Gene Q MDx, αναθεώρηση 7, Σεπτέμβριος 2018).

Για την ανάλυση των δεδομένων, πρέπει να χρησιμοποιηθεί περικοπή κύκλου (Εικόνα 7): Ανοίξτε το ακατέργαστο κανάλι **Cycling A.Green**. Μεταβείτε στη διαδρομή **Options (Επιλογές) > Crop Start Cycles** (Διαγραφή κύκλων έναρξης) και εισαγάγετε **5** στο πλαίσιο διαλόγου. Θα δημιουργηθεί ένα νέο κανάλι με την ονομασία **Cycling A(from 5).Green**. Το ίδιο πρέπει να γίνει για τα ακατέργαστα κανάλια Red και Yellow ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια **Cycling A(from 5).Red** και **Cycling A(from 5).Yellow**.



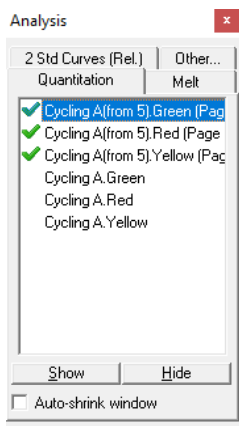
Εικόνα 7. Στιγμιότυπο οθόνης από τη ρύθμιση της διαγραφής κύκλων για την ανάλυση των εκτελέσεων στο RGQ MDx 5plex HRM

Ανοίξτε το μενού της ανάλυσης (Εικόνα 8) και για κάθε κανάλι Cycling A(from 5) που δημιουργήθηκε, εφαρμόστε τις παρακάτω παραμέτρους ανάλυσης για να διατηρήσετε τη συνέπεια μεταξύ των διαφορετικών αναλύσεων (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Παράμετροι ανάλυσης του RGQ MDx 5plex HRM

Κανάλια	Green	Red	Yellow
Τιμή κατωφλίου φθορισμού	0,03	0,03	0,03
Διόρθωση κλίσης	Ναι	Ναι	Ναι
Δυναμικό σωληνάριο	Ναι	Ναι	Ναι
Σημείο μέτρησης	Όχι	10–20	10–20
Αφαίρεση έκτοπων τιμών: Όριο απόδοσης αντίδρασης	Ναι Ενεργοποίηση 0%	Όχι	Ναι Ενεργοποίηση -85%
Διαγραφή κύκλων έναρξης	5	5	5
Κύκλοι αποκοπής	Τιμή Ct >38,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00	Όχι	Τιμή Ct >35,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00

Στο λογισμικό του RGQ τα αποτελέσματα της εκτέλεσης διατίθενται στο πλέγμα αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού που ανοίγει στη διάρκεια της ανάλυσης. Τα δεδομένα μπορούν να εξαχθούν σε αρχείο τιμών διαχωρισμένων με κόμματα (μορφής .csv): Στο παράθυρο λογισμικού RGQ, επιλέξτε **File (Αρχείο) > save as (αποθήκευση ως) > Excel analysis sheet** (Φύλλο ανάλυσης Excel). Βεβαιωθείτε ότι έχουν επιλεγεί όλα τα δείγματα πριν από την εξαγωγή των αποτελεσμάτων (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Στιγμιότυπο οθόνης από τα επιλεγμένα κανάλια για την εφαρμογή των παραμέτρων ανάλυσης και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων (ανάλυση των εκτελέσεων στο RGQ MDx 5plex HRM).

Ανάλυση στο ABI 7500 Fast Dx

Στο ABI 7500 Fast Dx τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό 7500 Fast System Software, έκδοση 1.4.1 (ή νεότερη) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στην καρτέλα **setup** (ρύθμιση), επιλέξτε την ομάδα βυθισμάτων ή ολόκληρη την πλάκα που είναι διαθέσιμη στην ανάλυση και κάντε δεξί κλικ για να ανοίξετε τα παράθυρα του ελεγκτή βυθίσματος. Τα 3 φθορισμοφόρα (FAM, VIC και Cy5) πρέπει να είναι επιλεγμένα και το **ROX** πρέπει να είναι επιλεγμένο ως **Passive reference** (Αναφορά παθητικού). Απαιτούνται οι παρακάτω παράμετροι για τη διατήρηση της συνέπειας μεταξύ των διαφορετικών αναλύσεων (Πίνακας 18).

Πίνακας 18. Παράμετροι ανάλυσης του ABI 7500 Fast Dx

Κανάλια	FAM	Cy5	VIC
Παθητική χρωστική	ROX	ROX	ROX
Τιμή κατωφλίου φθορισμού	0,13	0,025	0,05
Ρύθμιση γραμμής βάσης	Αυτόματα	Αυτόματα	Αυτόματα
Κύκλοι αποκοπήs	Τιμή Ct >39,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00	Όχι	Τιμή Ct >35,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00

Στο λογισμικό SDS του ABI οι τιμές Ct μιας επιλεγμένης ομάδας βυθισμάτων ή ολόκληρης της πλάκας διατίθενται στο φύλλο **data** (δεδομένα) της κύριας ενότητας **Results** (Αποτελέσματα). Τα δεδομένα μπορούν να εξαχθούν σε αρχείο τιμών διαχωρισμένων με κόμματα (μορφής .csv): Στο παράθυρο του λογισμικού SDS επιλέξτε **File** (Αρχείο) > **Export** (Εξαγωγή) > **Results** (Αποτελέσματα) (μπορεί επίσης να επιλεγεί το στοιχείο μενού **Ct**). Επιλέξτε .csv ως μορφή του αρχείου εξαγωγής.

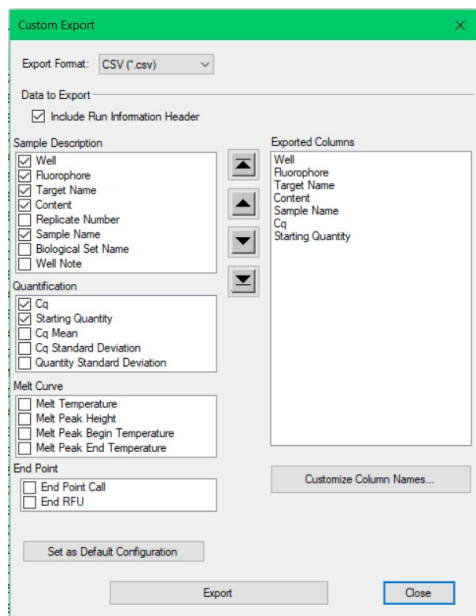
Ανάλυση στο CFX96 Dx

Στο CFX96 Dx τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό CFX Manager Dx, έκδοση 3.1.3090.1022 (ή νεότερη) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα FAM, HEX και Cy5 πρέπει να είναι επιλεγμένα για όλα τα βυθίσματα που χρησιμοποιούνται στο πείραμα. Απαιτούνται οι παρακάτω παράμετροι για τη διατήρηση της συνέπειας μεταξύ των διαφορετικών αναλύσεων (Πίνακας 19).

Πίνακας 19. Παράμετροι ανάλυσης για το CFX96 Dx

Κανάλια	FAM	HEX	Cy5
Τρόπος προσδιορισμού Cq: Ενιαία τιμή κατωφλίου	Ναι	Ναι	Ναι
Ρύθμιση τιμής αναφοράς:			
• αφαιρούμενη προσαρμογή καμπύλης	Ναι	Ναι	Ναι
• Εφαρμογή διόρθωσης μετατόπισης φθορισμού	Ναι	Ναι	Ναι
Τιμή κατωφλίου (RFU)	250	300	100
Κύκλοι αποκοπής	Τιμή Ct >39,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00	Τιμή Ct >35,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00	Όχι

Στο λογισμικό CFX Manager Dx οι τιμές Ct (ονομάζονται **Cq** στο λογισμικό) μιας επιλεγμένης ομάδας βυθισμάτων ή ολόκληρης της πλάκας διατίθενται στο φύλλο δεδομένων της ενότητας **Quantification Data** (Δεδομένα ποσοτικοποίησης). Τα δεδομένα μπορούν να εξαχθούν σε αρχείο τιμών διαχωρισμένων με κόμματα (μορφής **.csv**) επιλέγοντας **Export** (Εξαγωγή) > **Custom Export** (Προσαρμοσμένη εξαγωγή) και ρυθμίζοντας τις παραμέτρους σύμφωνα με την Εικόνα 9.



Εικόνα 9. Παράμετροι αρχείου πρωτογενών δεδομένων για το CFX96 Dx

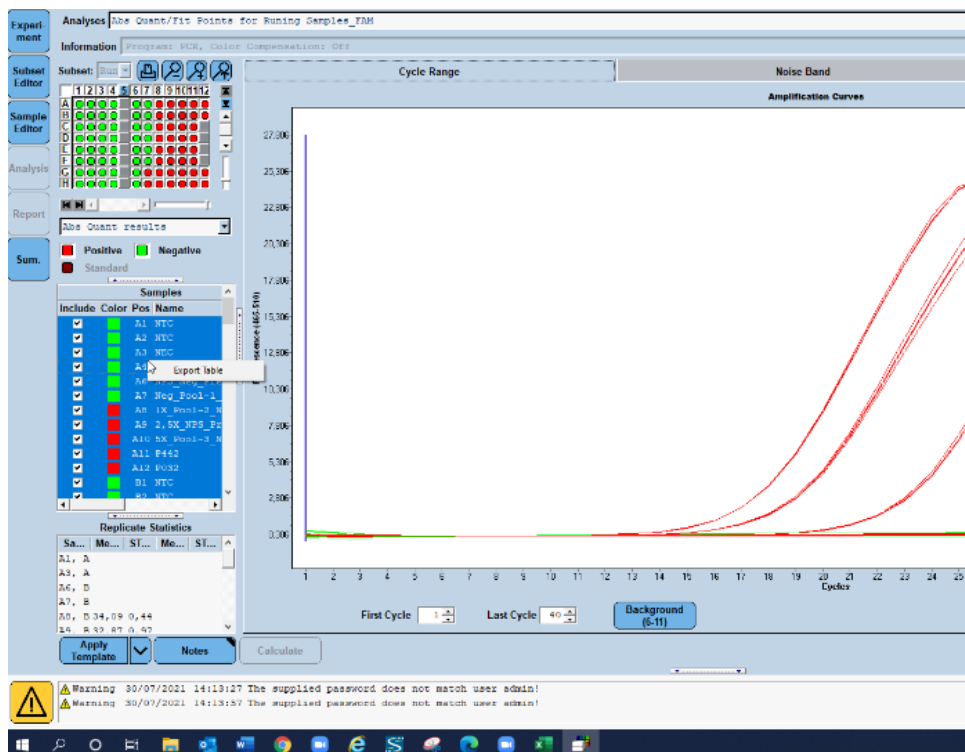
Ανάλυση στο cobas z 480

Στο cobas z 480 τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό LightCycler 480 SW UDF, έκδοση 2.0.0 (ή νεότερη) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Δημιουργήστε ένα υποσύνολο δειγμάτων μόνο με τα βυθίσματα που χρησιμοποιούνται στο πείραμα. Για κάθε κανάλι, δημιουργήστε μία σελίδα ανάλυσης **Abs Quant/Fit Points** (Απόλυτη ποσοτικοποίηση/Προσαρμογή σημείων) και χρησιμοποιήστε τις ακόλουθες παραμέτρους για τη διατήρηση της συνέπειας μεταξύ των διαφορετικών πειραμάτων (Πίνακας 20).

Πίνακας 20. Παράμετροι ανάλυσης για το cobas z 480

Κανάλια	FAM (465-510)	HEX (540-580)	ATTO647N (610-670)
Καρτέλα εύρους κύκλου			
• Πρώτος - Τελευταίος κύκλος	1–40	1–40	6–40
• Υπόβαθρο	5/10	5/10	6/11
Καρτέλα ζώνης θορύβου			
• Μέθοδος	Πολλαπλασιαστικής STD	Πολλαπλασιαστικής STD	Πολλαπλασιαστικής STD
• Τιμή πολλαπλασιαστική STD	50	40	25
Καρτέλα ανάλυσης	2	2	2
• Προσαρμογή σημείων			
• Μέθοδος κατωφλίου	Αυτόματα	Αυτόματα	Αυτόματα
Κύκλος αποκοπής	Τιμή Ct >39,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00	Τιμή Ct >35,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00	Όχι

Στο LightCycler 480 SW UDF, έκδοση 2.0.0 (ή νεότερη), οι τιμές Ct (ονομάζονται **Cp** στο λογισμικό) μίας επιλεγμένης ομάδας βυθισμάτων ή ολόκληρης της πλάκας είναι διαθέσιμες στην ενότητα **analysis** (ανάλυση) (Εικόνα 10). Τα δεδομένα μπορούν να εξαχθούν σε μορφή αρχείου κειμένου (**.txt**) ανά κανάλι κάνοντας δεξί κλικ στον πίνακα αποτελεσμάτων και επιλέγοντας **Export table** (Εξαγωγή πίνακα).



Εικόνα 10. Στιγμιότυπο οθόνης από εξαγόμενα δεδομένα στο LightCycler 480 SW UDF, έκδοση 2.0.0 (ή νεότερη).

Ανάλυση στο QuantStudio 5 Dx

Στο QuantStudio 5 Dx τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό QuantStudio 5 Dx IVD, έκδοση 1.0.1 (ή νεότερη) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στο παράθυρο **Assign Targets and Samples** (Εκχώρηση στόχων και δειγμάτων), τα 3 φθορισμοφόρα (FAM, VIC και Cy5) πρέπει να είναι επιλεγμένα για όλα τα βυθίσματα που χρησιμοποιούνται στο πείραμα και το **ROX** πρέπει να είναι επιλεγμένο ως **Passive reference** (Αναφορά παθητικού). Απαιτούνται οι παρακάτω παράμετροι για τη διατήρηση της συνέπειας μεταξύ των διαφορετικών αναλύσεων (Πίνακας 21).

Πίνακας 21. Παράμετροι ανάλυσης για το QuantStudio 5 Dx

Κανάλια	FAM	VIC	Cy5
Παθητική χρωστική	ROX	ROX	ROX
Τιμή κατωφλίου φθορισμού	0,21	0,062	0,04
Ρύθμιση γραμμής βάσης	Αυτόματα	Αυτόματα	Αυτόματα
Κύκλοι αποκοπής	Τιμή Ct >39,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00	Τιμή Ct >35,00 εκλαμβανόμενη ως 40,00	Όχι

Τα δεδομένα μπορούν να εξαχθούν σε μορφή λογιστικού φύλλου ή κειμένου (.xls, .xlsx, .txt). Στην καρτέλα **Export** (Εξαγωγή) του παραθύρου λογισμικού QuantStudio 5 Dx IVD, επιλέξτε όλες τις επιλογές στην ενότητα **content** (περιεχόμενο) και επιλέξτε την επιλογή **unify the above content into one file** (ενοποίηση του παραπάνω περιεχομένου σε ένα αρχείο).

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Ο θετικός μάρτυρας (Positive Control, PC) και τα γονίδια N1 και N2 ανιχνεύονται στο κανάλι φθορισμού Green στο όργανο RGQ MDx 5plex HRM ή στο κανάλι φθορισμού FAM στο όργανο ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 και QuantStudio 5 Dx.

Ο μάρτυρας δειγματοληψίας, αποτελούμενος από RNase P, ανιχνεύεται στο κανάλι φθορισμού Yellow στο όργανο RGQ MDx 5plex HRM ή στο κανάλι φθορισμού VIC/HEX στο όργανο ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 και QuantStudio 5 Dx. Κάθε κλινικό δείγμα θα πρέπει να εμφανίζει ενίσχυση μάρτυρα δειγματοληψίας. Στον PC μπορεί είναι ορατή μια κίτρινη ενίσχυση παρά την απουσία ανθρωπίνων αλληλουχιών. Σε αυτήν την περίπτωση, το σήμα στο κανάλι Yellow του PC μπορεί να αγνοηθεί επειδή ενδέχεται το ισχυρό σήμα φθορισμού του καναλιού Green να διαρρέει στο κανάλι Yellow. Ο εσωτερικός μάρτυρας (Internal Control, IC) περιλαμβάνεται στους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers. Ανιχνεύεται στον μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC), στον μάρτυρα χωρίς εκχύλιση (No Extraction Control, NEC), στον θετικό μάρτυρα (Positive Control, PC) και στα κλινικά δείγματα του καναλιού φθορισμού Red στο όργανο RGQ MDx 5plex HRM ή στο κανάλι φθορισμού Cy5/ ATTO647N στο όργανο ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 και QuantStudio 5 Dx. Για να θεωρηθεί έγκυρη μία εκτέλεση real-time RT-PCR, οι μάρτυρες PC, NTC και NEC πρέπει να αποδίδουν όπως φαίνεται στους (Πίνακας 22, Πίνακας 23).

Πίνακας 22. Κριτήρια επικύρωσης εκτελέσεων και ερμηνεία αποτελεσμάτων στο RGQ MDx 5plex HRM

Μάρτυρας	Ανίχνευση στο κανάλι Green	Ανίχνευση στο κανάλι Yellow	Ανίχνευση στο κανάλι Red	Ερμηνεία
Θετικός μάρτυρας (Positive control, PC)	Ct ≤38,00	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Ο PC είναι έγκυρος.
	Ct >38,00 ή χωρίς Ct	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Ο PC δεν είναι έγκυρος.
Μάρτυρας χωρίς μήτρα (No template control, NTC) ή	Ct >38,00 ή χωρίς Ct	Ct >35,00 ή χωρίς Ct	Ναι	Ο NTC/NEC είναι έγκυρος.
Μάρτυρας χωρίς εκχύλιση (No extraction control, NEC)	Οποιοδήποτε άλλοι συνδυασμοί με ενίσχυση στο Green ή το Yellow		Αδιαφοροποίητη	Ο NTC/NEC δεν είναι έγκυρος.

Πίνακας 23. Κριτήρια επικύρωσης εκτελέσεων και ερμηνεία αποτελεσμάτων για τα όργανα ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 και QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR

Μάρτυρας	Ανίχνευση σε χρωστική FAM*	Ανίχνευση σε χρωστική VIC/HEX*	Ανίχνευση σε χρωστική Cy5/ATTO647N*	Ερμηνεία
Θετικός μάρτυρας (Positive control, PC)	Ct ≤39,00	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Ο PC είναι έγκυρος.
	Ct >39,00 ή χωρίς Ct	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Ο PC δεν είναι έγκυρος.
Μάρτυρας χωρίς μήτρα (No template control, NTC) ή	Ct >39,00 ή χωρίς Ct	Ct >35,00 ή χωρίς Ct	Ναι	Ο NTC/NEC είναι έγκυρος.
Μάρτυρας χωρίς εκχύλιση (No extraction control, NEC)	Τυχόν άλλοι συνδυασμοί με ενίσχυση στο FAM ή το VIC/HEX		Αδιαφοροποίητη	Ο NTC/NEC δεν είναι έγκυρος.

Για την επικύρωση των ξεταζόμενων δειγμάτων, τα δείγματα πρέπει να έχουν ενισχυθεί και ανιχνευθεί σύμφωνα με τα προβλεπόμενα.

Πίνακας 24. Κριτήρια επικύρωσης δειγμάτων και ερμηνεία αποτελεσμάτων στο RGQ MDx 5plex HRM

Ανίχνευση στο κανάλι Green	Ανίχνευση στο κανάλι Yellow	Ανίχνευση στο κανάλι Red	Ερμηνεία
Ct ≤38,00	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Το δείγμα είναι θετικό ως προς το RNA του SARS-CoV-2.
Ct >38,00 ή χωρίς Ct	Ct ≤35,00	Αδιαφοροποίητη	Το δείγμα είναι αρνητικό, δεν ανιχνεύεται RNA του SARS-CoV-2.
Ct >38,00 ή χωρίς Ct	Ct >35,00 ή χωρίς Ct	Ναι	Μη έγκυρο δείγμα. Δεν ανιχνεύεται ανθρώπινο υλικό ή είναι ανεπαρκές. Συνιστάται επανάληψη της δειγματοληψίας.
Ct >38,00 ή χωρίς Ct	Ct >35,00 ή χωρίς Ct	Όχι	Μη έγκυρο δείγμα. Παρουσιάζεται αναστολή της αντίδρασης real-time RT-PCR. Απαιτείται επανεξέταση.

Πίνακας 25. Κριτήρια επικύρωσης δειγμάτων και ερμηνεία αποτελεσμάτων για τα όργανα ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 και QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR.

Ανίχνευση σε χρωστική FAM*	Ανίχνευση σε χρωστική VIC/HEX*	Ανίχνευση σε χρωστική Cy5/ATTO647N*	Ερμηνεία
Ct ≤39,00	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Το δείγμα είναι θετικό.
Ct >39,00 ή χωρίς Ct	Ct ≤35,00	Αδιαφοροποίητη	Το δείγμα είναι αρνητικό, δεν ανιχνεύεται SARS-CoV-2.
Ct >39,00 ή χωρίς Ct	Ct >35,00 ή χωρίς Ct	Ναι	Μη έγκυρο δείγμα. Δεν ανιχνεύεται ανθρώπινο υλικό. Συνιστάται επανάληψη της δειγματοληψίας.
Ct >39,00 ή χωρίς Ct	Ct >35,00 ή χωρίς Ct	Όχι	Μη έγκυρο δείγμα. Παρουσιάζεται αναστολή της αντίδρασης real-time RT-PCR. Απαιτείται επανεξέταση.

Περιορισμοί

- Αποκλειστικά για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Τα αποτελέσματα από το κιτ *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit δεν προορίζονται για χρήση ως αποκλειστική βάση για διάγνωση, θεραπεία ή άλλες αποφάσεις διαχείρισης ασθενών. Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν λοίμωξη με SARS-CoV-2 και δεν θα πρέπει να αποτελούν την αποκλειστική βάση για τη λήψη αποφάσεων για τη θεραπεία ασθενών.
- Το προϊόν πρέπει να χρησιμοποιείται από ειδικά καταρτισμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό σε *in vitro* διαγνωστικές διαδικασίες.
- Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο χρήστη της πλατφόρμας real-time RT-PCR (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ή QuantStudio 5 Dx) είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων PCR.
- Πρέπει να δίδεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μην χρησιμοποιείτε ληγμένα συστατικά.
- Η απόδοση της δοκιμασίας δεν έχει προσδιοριστεί για δείγματα σάλιου από ασθενείς χωρίς σημεία και συμπτώματα λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος.
- Για την αποφυγή του κινδύνου για ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε περίπτωση εξέτασης ασθενώς θετικού κλινικού δείγματος όταν παρατηρούνται ίχνη αίματος στο σωληνάριο, αυτό θα πρέπει να καταγραφεί και, εάν το δείγμα δώσει ένα αρνητικό αποτέλεσμα κατά τη χρήση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, θα πρέπει να επαναληφθεί η συλλογή του δείγματος από τον ασθενή και το δείγμα θα πρέπει να εξεταστεί και πάλι με το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Αναλυτική ευαισθησία (Όριο ανίχνευσης)

Ως αναλυτική ευαισθησία ή όριο ανίχνευσης ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία $\geq 95\%$ των δειγμάτων που υποβάλλονται σε δοκιμασία παράγουν θετικό σήμα. Το όριο ανίχνευσης (LoD) αξιολογήθηκε αναλύοντας διαδοχικές αραιώσεις αρνητικών ρινοφαρυγγικών δειγμάτων και υγροποιημένων δειγμάτων καθαρού σάλιου, παρασκευασμένων με αποθέματα υψηλού τίτλου αδραντοποιημένων σωματιδίων του ιού που είχαν ληφθεί από προμηθευτές του εμπορίου (ZeptoMetrix®). Χρησιμοποιήθηκαν δύο δεξαμενές δειγμάτων για κάθε δείγμα για τα πειράματα LoD. Για την επιβεβαίωση της προσδιορισμένης συγκέντρωσης LoD η αναλογία ανίχνευσης όλων των αντιγράφων πρέπει να είναι $\geq 95\%$ (τουλάχιστον 19/20 αντίγραφα πρέπει να παράγουν θετικό σήμα).

Η συγκέντρωση LoD επαληθεύτηκε στα ρινοφαρυγγικά δείγματα και στα δείγματα καθαρού σάλιου στις αναφερόμενες πλατφόρμες real-time RT-PCR (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx και cobas z 480).

Ρινικά, στοματοφαρυγγικά και ρινοφαρυγγικά δείγματα

Η τιμή LoD αναφέρεται στα 950 cp/ml για τα RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx και QuantStudio 5 Dx και στα 475 cp/ml για το cobas z 480 (βλ. Πίνακα 26)

Δείγματα καθαρού σάλιου

Η τιμή LoD αναφέρεται στα 950 cp/ml για το RGQ MDx και στα 1200 cp/ml για τα ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx και CFX96 Dx (βλ. Πίνακα 26).

Πίνακας 26. Περίληψη αποτελεσμάτων LoD για κάθε πλατφόρμα real time RT-PCR

Πλατφόρμα	Τύπος δείγματος	Επαληθευμένη LoD (cp/ml)
RGQ MDx	NPS	950
	Καθαρό σάλιο	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Καθαρό σάλιο	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Καθαρό σάλιο	1200
cobas z 480	NPS	475
	Καθαρό σάλιο	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Καθαρό σάλιο	1200

Μελέτες ειδικότητας ανάλυσης (Συμπεριληψιμότητα και αποκλειστικότητα/διασταυρούμενη αντιδραστικότητα)

Συμπεριληψιμότητα

Η συμπεριληψιμότητα του *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes έχει αξιολογηθεί με *in silico* ανάλυση αλληλουχιών που διατίθενται στη βάση δεδομένων GISAID (www.gisaid.org). Αναλύθηκαν συνολικά 722.488 αλληλουχίες (διαθέσιμες στις 23/03/2021) στον ιστότοπο COVID CG (<https://covidcg.org>), τροφοδοτούμενες με μεταδεδομένα GISAID. Οι αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν με την αλληλουχία αναφοράς WIV04 (100% πανομοιότυπη με την Wuhan-Hu-1/NC_045512.2, εκτός από το μήκος της πολυ(A) ουράς) και οι παραλλαγές μονού νουκλεοτιδίου (SNV) αναλύθηκαν στη γονιδιωματική περιοχή που στοχεύει το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Primers and Probes. Ο επιπολασμός των ταυτοποιημένων SNV παρέμεινε κάτω από 1%, όπως και η συχνότητα των συνεμφανιζόμενων μεταλλάξεων. Δεν εντοπίστηκε SNV στα τελευταία 1 έως 3 νουκλεοτίδια από το 3' άκρο στα αντίστοιχα ολιγονουκλεοτίδια, γεγονός που αναμενόταν να επηρεάσει την απόδοση. Το kit *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit θεωρείται ικανό να ανιχνεύει κατά 100% τις δημοσιευμένες αλληλουχίες.

Αποκλειστικότητα/Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Ανάλυση *in silico*

Η αποκλειστικότητα του *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes έχει αξιολογηθεί με *in silico* ανάλυση αλληλουχιών που υπάρχουν αποθηκευμένες στη βάση δεδομένων NCBI. Η *in silico* κατέδειξε ότι κάποια από τα εξεταζόμενα παθογόνα έχουν ομολογία άνω του 80% με έναν από τους εκκινητές ή τους ανιχνευτές του *artus* SARS-CoV-2. Μεταξύ αυτών είναι τα *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* και *Streptococcus salivarius*. Το *Pseudomonas aeruginosa* είχε ομολογία κάτω του 80% με έναν από τους εκκινητές/ανιχνευτές του προσδιορισμού SARS-CoV-2. Ωστόσο, το *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes κατέδειξε μη εφικτή ενίσχυση με τις διαφορετικές αλληλουχίες που είναι αποθηκευμένες στη βάση δεδομένων NCBI μη πλεονάζουσας συλλογής νουκλεοτιδίων (nr/nt).

Αναλύθηκαν συνολικά 36 στελέχη βακτηρίων, ιών και μυκήτων (Πίνακας 27) με *in silico* PCR, με περιορισμένο πιθανό μέγεθος αμπλικονίου 500 bp. Συλλέχθηκαν αλληλουχίες παθογόνων από τη βάση δεδομένων NCBI, ωστόσο, κανένα από αυτά τα παθογόνα δεν κατέδειξε ενίσχυση *in silico*. Στον Πίνακα 27 εμφανίζεται η λίστα με τα παθογόνα που εξετάστηκαν *in silico*.

Πίνακας 27. Κατάλογος των *in silico* εξεταζόμενων παθογόνων.

Παθογόνα	Στέλεχος/Τύπος	Αναγνωριστικό ταξινόμιας	Αποτελέσματα της <i>in silico</i> PCR
Αδενοϊός τύπου 3	Τύπος 3	45659	Δεν αντιστοιχίζεται
Αδενοϊός τύπου 4	Τύπος 4	28280	Δεν αντιστοιχίζεται
Αδενοϊός τύπου 5	Τύπος 5	28285	Δεν αντιστοιχίζεται
Αδενοϊός τύπου 7A	Τύπος 7A	85755	Δεν αντιστοιχίζεται
Αδενοϊός τύπου 14	Τύπος 14	10521	Δεν αντιστοιχίζεται
Αδενοϊός τύπου 31	Τύπος 31	10529	Δεν αντιστοιχίζεται
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Δεν αντιστοιχίζεται
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Μη εφικτή ενίσχυση*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Δεν αντιστοιχίζεται
Εντεροϊός	Τύπος 68	42789	Δεν αντιστοιχίζεται

* Η αντιστοίχιση της αλληλουχίας με έναν από τους εκκινητές/ανιχνευτές κατέδειξε ομολογία <80%.

† Η αντιστοίχιση της αλληλουχίας με έναν από τους εκκινητές/ανιχνευτές κατέδειξε ομολογία ≥80%.

(Συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

Πίνακας 27. (Συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

Παθογόνα	Στέλεχος/Τύπος	Αναγνωριστικό ταξινόμιας	Αποτελέσματα της <i>in silico</i> PCR
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Δεν αντιστοιχίζεται
Ανθρώπινος κοροναϊός	229E	11137	Δεν αντιστοιχίζεται
Ανθρώπινος κοροναϊός	NL63	277944	Δεν αντιστοιχίζεται
Ανθρώπινος κοροναϊός	HKU-1	290028	Δεν αντιστοιχίζεται
Ανθρώπινος κοροναϊός OC43	OC43	31631	Δεν αντιστοιχίζεται
Ανθρώπινος κοροναϊός	MERS-CoV	1335626	Δεν αντιστοιχίζεται
Ανθρώπινος μεταπνευμονιοϊός	δ.ε.	162145	Δεν αντιστοιχίζεται
Γρίπη A	H1N1	114727	Δεν αντιστοιχίζεται
Γρίπη A	H3N2	119210	Δεν αντιστοιχίζεται
Γρίπη B	δ.ε.	11520	Δεν αντιστοιχίζεται
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Δεν αντιστοιχίζεται
Ιός της παραγρίπης	Τύπος 1	12730	Δεν αντιστοιχίζεται
Ιός της παραγρίπης	Τύπος 2	2560525	Δεν αντιστοιχίζεται
Ιός της παραγρίπης	Τύπος 3	11216	Δεν αντιστοιχίζεται
Ιός της παραγρίπης	Τύπος 4	2560526	Δεν αντιστοιχίζεται
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Δεν αντιστοιχίζεται
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Μη εφικτή ενίσχυση*
Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός	Τύπος A (RSV-A)	208893	Δεν αντιστοιχίζεται
Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός	Τύπος B (RSV-B)	208895	Δεν αντιστοιχίζεται
ΡΙνοϊός	Τύπος A	147711	Δεν αντιστοιχίζεται
ΡΙνοϊός	Τύπος B	147712	Δεν αντιστοιχίζεται
Κοροναϊός SARS	Tor2	694009	Μη εφικτή ενίσχυση†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	δ.ε.	1282	Δεν αντιστοιχίζεται
<i>Streptococcus pyogenes</i>	δ.ε.	1314	Μη εφικτή ενίσχυση†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Μη εφικτή ενίσχυση†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Δεν αντιστοιχίζεται

* Η αντιστοίχιση της αλληλουχίας με έναν από τους εκκινητές/ανιχνευτές κατέδειξε ομολογία <80%.

† Η αντιστοίχιση της αλληλουχίας με έναν από τους εκκινητές/ανιχνευτές κατέδειξε ομολογία ≥80%.

Ανάλυση *in vitro*

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα επαληθεύτηκε *in vitro* με παθογόνα που κατέδειξαν ομολογία $\geq 80\%$ με τους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers στην ανάλυση *in silico*. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν με ενοφθαλμισμό μικροοργανισμών με πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση σε μήτρα επιχρίσματος ρινοφαρυγγικού σπειλεού σε 10^6 cp/ml, εκτός από τον SARS-CoV-1 ο οποίος εξετάστηκε μη αραιωμένος σύμφωνα με σύσταση του κατασκευαστή. Κανένα από αυτά τα παθογόνα δεν κατέδειξε *in vitro* διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.

Η μικροβιακή παρεμβολή του προσδιορισμού με το kit *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit έχει αξιολογηθεί *in vitro* σε ένα πάνελ συνιστώμενων παθογόνων (Πίνακας 28). Τα δείγματα παρασκευάστηκαν με ενοφθαλμισμό 5 παθογόνων κατά μέγιστο —σε 105 TCID₅₀/ml για ιικούς στόχους, 10^6 cp/ml για ιούς βακτηρίων και μυκήτων ή στην υψηλότερη δυνατή συγκέντρωση βάσει της πρωτογενούς συγκέντρωσης— σε αρνητικά επιχρίσματα ρινοφαρυγγικού σπειλεού ενοφθαλμισμένα σε $2,87 \times \text{LoD}$ με αδραντοποιημένα σωματίδια SARS-CoV-2 (ZepetoMetrix). Τα NATtrol™ Panels και το παθογόνο SARS-CoV-1 ενοφθαλμίστηκαν απευθείας με αδραντοποιημένα σωματίδια του ιού SARS-CoV-2 (ZepetoMetrix) σε $2,87 \times \text{LoD}$. Παρακάτω συνοψίζονται τα αποτελέσματα για κάθε δεξαμενή εξεταζόμενου μικροοργανισμού με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Στον Πίνακα 28 εμφανίζεται η λίστα με τα παθογόνα που εξετάστηκαν στην εν λόγω μελέτη.

Πίνακας 28. Κατάλογος των *in vitro* εξεταζόμενων παθογόνων σε μικροβιακή παρεμβολή.

Αναγνωριστικό δεξαμενής/ Αναγνωριστικό δείγματος	Μικροοργανισμός	Προέλευση	Τελική συγκέντρωση	Μονάδα	Αποτέλεσμα
Δεξαμενή 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	Ανθρώπινος κοροναϊός 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ανθρώπινος κοροναϊός OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/ml	
	Ανθρώπινος κοροναϊός NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID50/ml	
	Αδενοϊός T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ιός της παραγρίπης 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID50/ml	
Δεξαμενή 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	Αδενοϊός T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/ml	
	Ιός της παραγρίπης 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/ml	
	Παραγρίπη Β Φλόριντα/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ρινοϊός T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/ml	

(Συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

Πίνακας 28 (Συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

Αναγνωριστικό ό δεξαμενής/ Αναγνωριστικό ό δείγματος	Μικροοργανισμός	Προέλευση	Τελική συγκέντρωση	Μονάδα	Αποτέλεσμα
Δεξαμενή 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	Ιός της παραγρίπης T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3,30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4,60E+06	CFU/ml	
Δεξαμενή 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	Αδενοϊός T7A	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1,02E+06	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1,00E+08	CFU/ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
Δεξαμενή 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Γρίπη A H1N1 Καλιφόρνια	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Εντεροϊός Τύπου 68 Κύρια ομάδα	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Αδενοϊός T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Δεξαμενή 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	Κοροναϊός MERS	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Αδενοϊός T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ανθρώπινος μεταπνευμονιός (hMPV) τύπου B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός τύπου B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(Συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

Πίνακας 28 (Συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

Αναγνωριστικό δεξαμενής/ Αναγνωριστικό δείγματος	Μικροοργανισμός	Προέλευση	Τελική συγκέντρωση	Μονάδα	Αποτέλεσμα
Δεξαμενή 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	Αδενοϊός T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Ιός της παραγρίπης 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Γρίπη A H3N2 Ελβετία/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Δεξαμενή 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	NATtrol Panel RP1 γρίπη A H3N2 (Μπρίσμπειν/10/07), γρίπη A H1N1 (NY/02/2009), ρινοϊός (τύπου 1A), αδενοϊός T3, παραγρίπη T1, ιός της παραγρίπης T4, μεταπνευμονιϊός (Περού 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), ιός Coxsackie (τύπου A1)	Zeptomatrix (MDZ001)	Άγνωστη*	Δ/Ε	
Δεξαμενή 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	NATtrol Panel RP2 γρίπη A H1 (Νέα Καληδονία/20/99), γρίπη B (Φλόριντα/02/06), RSV-A, παραγρίπη T2, παραγρίπη T3, κοροναϊός HKU ανασυνδυσασμένος, κοροναϊοί (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639)	Zeptomatrix (MDZ001)	Άγνωστη*	Δ/Ε	
Δεξαμενή 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Καμία παρεμβολή
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Άγνωστη*	Δ/Ε	

* Η συγκέντρωση δεν έχει ανακοινωθεί από τον προμηθευτή.

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Δείγματα σε ρινικό, στοματοφαρυγγικό και ρινοφαρυγγικό στείλειό

Η επίδραση των θεωρούμενων παρεμβαλλόμενων ουσιών (ουσίες που περιλαμβάνονται στον Πίνακα 29) έχει αξιολογηθεί στην απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Διενεργήθηκαν δοκιμασίες σε 3 δεξαμενές αρνητικών επιχρισμάτων ρινοφαρυγγικού στείλειού και 3 δεξαμενές θετικών επιχρισμάτων ρινοφαρυγγικού στείλειού ενοφθαλμισμένων σε 4 x LoD με αδρανοποιημένα σωματίδια του ιού SARS-CoV-2 (ZepetoMetrix). Τα πειράματα εκτελέστηκαν στην πλατφόρμα RGQ MDx 5plex HRM (σε 4 όργανα) από 1 χειριστή με ένα 1 πρότυπο kit.

Κάθε δεξαμενή χωρίστηκε σε 2 για να εξεταστεί η παρεμβαλλόμενη ουσία διαλυμένη σε διαλύτη (εξεταζόμενο δείγμα) ή ο διαλύτης μόνος του (δείγμα μάρτυρας). Τα ποσοστά επιτυχίας στα κανάλια φθορισμού Green και Red υποβλήθηκαν σε σύγκριση όσον αφορά τα εξεταζόμενα δείγματα και τα δείγματα μάρτυρα. Σε περίπτωση απουσίας παρεμβολής, τα εξεταζόμενα δείγματα και τα δείγματα μάρτυρα έχουν το ίδιο ποσοστό επιτυχίας.

Ο Πίνακας 29 δείχνει ότι καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες δεν παρεμβάλλεται στην απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit στο κανάλι φθορισμού Green.

Πίνακας 29. Κατάλογος παρεμβαλλόμενων ουσιών και ποσοστά επιτυχίας που λαμβάνονται στο κανάλι Green.

Παρεμβαλλόμενες ουσίες	Λειτουργία	Συγκέντρωση δοκιμασίας	Αποτελέσματα ποσοστών επιτυχίας σε αρνητικά επιχρίσματα ρινοφαρυγγικού στείλειού	Αποτελέσματα ποσοστών επιτυχίας σε θετικά (4x LoD) επιχρίσματα ρινοφαρυγγικού στείλειού
Τομπραμυκίνη	Συστηματικά χορηγούμενο αντιβιοτικό	1 mg/ml	Καμία παρεμβολή 0/15	Καμία παρεμβολή 15/15
Μουπιροσίνη	Ρινική αντιβιοτική αλοιφή	6,6 mg/ml	Καμία παρεμβολή 0/15	Καμία παρεμβολή 15/15
Φλουτικαζόνη	Ρινικό κορτικοστεροειδές	5% (v/v)	Καμία παρεμβολή 0/15	Καμία παρεμβολή 15/15
Μενθόλη (Παστίλιες για τον λαιμό)	Από του στόματος αναισθητικό και αναλγητικό	0,5 mg/ml	Καμία παρεμβολή 0/15	Καμία παρεμβολή 15/15
Οξιμεταζολίνη	Ρινικό εκνέφωμα	10% (v/v)	Καμία παρεμβολή 0/15	Καμία παρεμβολή 15/15

Συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Πίνακας 29 (συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

Παρεμβαλλόμενες ουσίες	Λειτουργία	Συγκέντρωση η δοκιμασίας	Αποτελέσματα ποσοστών επιτυχίας σε αρνητικά επιχρίσματα ρινοφαρυγγικού στείλεου	Αποτελέσματα ποσοστών επιτυχίας σε θετικά (4x LoD) επιχρίσματα ρινοφαρυγγικού στείλεου
Οσελαμιβίρη	Αντιικό φάρμακο	3,3 mg/ml	Καμία παρεμβολή 0/15	Καμία παρεμβολή 15/15
Βλεννίνη Βόεια υπογονάθιου αδένα τύπου I-S)		2,5 mg/ml	Καμία παρεμβολή 0/15	Καμία παρεμβολή 15/15
Ολικό αίμα		4% (v/v)	Καμία παρεμβολή 1/15*	Καμία παρεμβολή 15/15

* Ανιχνεύτηκε ενίσχυση που αντιστοιχεί σε πλασματικό εύρημα.

Δείγματα καθαρού σάλιου

Η επίδραση οκτώ θεωρούμενων παρεμβαλλόμενων ουσιών (ουσίες που περιλαμβάνονται στον Πίνακα 30) έχει αξιολογηθεί στην απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Οι δοκιμασίες διενεργήθηκαν σε 1 δεξαμενή αρνητικών δειγμάτων καθαρού σάλιου, η οποία είχε χωριστεί σε δύο μέρη για την χρήση δύο επιπέδων αραίωσης: (1) αρνητικά δείγματα καθαρού σάλιου και (2) προσχεδιασμένα θετικά δείγματα καθαρού σάλιου [που ελήφθησαν με ενοφθαλμισμό σε 3x LoD (3600 cp/ml) με αδραντοποιημένα σωματίδια του ιού SARS-CoV-2 (ZertoMetrix) στην αρνητική δεξαμενή]. Τα δείγματα καθαρού σάλιου εξετάστηκαν με χρήση της πλατφόρμας cobas z 480 από 3 χειριστές με ένα εμπορικής διαθέσιμο kit.

Για κάθε παρεμβαλλόμενη ουσία, τα αντίγραφα δειγμάτων χωρίστηκαν σε 2 για να εξεταστεί η παρεμβαλλόμενη ουσία διαλυμένη σε διαλύτη (εξεταζόμενο δείγμα) ή ο διαλύτης μόνος του (δείγμα μάρτυρας). Τα ποσοστά επιτυχίας στα κανάλια φθορισμού Green, Red και Yellow υποβλήθηκαν σε σύγκριση όσον αφορά τα εξεταζόμενα δείγματα και τα δείγματα μάρτυρα. Σε περίπτωση απουσίας παρεμβολής, τα εξεταζόμενα δείγματα και τα δείγματα μάρτυρα έχουν το ίδιο ποσοστό επιτυχίας.

Σε επίπεδο ποιοτικής (κατάσταση δείγματος) ανάλυσης, οι οκτώ παρεμβαλλόμενες ουσίες που εξετάστηκαν (βλ. Πίνακα 30) δεν επηρεάζουν τα αποτελέσματα του *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* στα θετικά και τα αρνητικά δείγματα σάλιου.

Ο Πίνακας 30 δείχνει ότι καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες δεν παρεμβαλλεται στην απόδοση του *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* στο κανάλι φθορισμού Green.

Πίνακας 30. Κατάλογος παρεμβαλλόμενων ουσιών και ποσοστά επιτυχίας που λαμβάνονται στο κανάλι Green.

Παρεμβαλλόμενες ουσίες*	Λειτουργία	Συγκέντρωση δοκιμασίας	Αποτελέσματα ποσοστών επιτυχίας σε αρνητικά δείγματα καθαρού σάλιου	Αποτελέσματα ποσοστών επιτυχίας σε θετικά (3 έως 5x LoD) δείγματα καθαρού σάλιου
Ολικό αίμα	Ενδογενείς ουσίες: Ανθρώπινο gDNA, λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα	1% v/v	Καμία παρεμβολή* 0/8	Καμία παρεμβολή* 8/8
Altoids®	Καραμέλα	2% w/v	Καμία παρεμβολή 0/8	Καμία παρεμβολή 8/8
Ασπιρίνη	Αντιφλεγμονώδες φάρμακο	1% w/v	Καμία παρεμβολή 0/8	Καμία παρεμβολή 8/8
Listerine®	Αντισηπτικό στοματικό διάλυμα	1% v/v	Καμία παρεμβολή 0/8	Καμία παρεμβολή 8/8
Ricola®	Καραμέλα	1% w/v	Καμία παρεμβολή 0/8	Καμία παρεμβολή 8/8
Οδοντόκρεμα Colgate® Total SF Whitening™	Οδοντόκρεμα για λεύκανση των δοντιών	0,1% w/v	Καμία παρεμβολή 0/8	Καμία παρεμβολή 8/8
Σιρόπι Tussidane®	Φάρμακο για τον ξηρό βήχα	1% v/v	Καμία παρεμβολή 0/8	Καμία παρεμβολή 8/8
Pulmofluide®	Φάρμακο για τον υγρό βήχα	1% v/v	Καμία παρεμβολή 0/8	Καμία παρεμβολή 8/8

* Για το ολικό αίμα, παρατηρήθηκε μία επίδραση παρεμβολής για την ανίχνευση IC στο κανάλι Red (10–40% αναστολή) χωρίς να επηρεάζεται η εγκυρότητα του δείγματος. Στο κανάλι Green, η κατάσταση δείγματος δεν επηρεάστηκε από το ολικό αίμα, ωστόσο παρατηρήθηκε μία ελαφριά μετατόπιση Ct (μέσος όρος 1,35 Ct αργότερα με το ολικό αίμα συγκριτικά με το δείγμα μάρτυρα).

Για την αποφυγή του κινδύνου για ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε περίπτωση εξέτασης ασθενώς θετικού κλινικού δείγματος εάν παρατηρούνται ίχνη αίματος στο σωληνάριο, αυτό θα πρέπει να καταγραφεί και, εάν το δείγμα δώσει ένα αρνητικό αποτέλεσμα κατά τη χρήση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, θα πρέπει να επαναληφθεί η συλλογή του δείγματος καθαρού σάλιου από τον ασθενή και το δείγμα θα πρέπει να εξεταστεί και πάλι με το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Μελέτη σταθερότητας δείγματος

Η μελέτη σταθερότητας δείγματος πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφόρων συνθηκών φύλαξης δειγμάτων στα ποιοτικά (ανάλυση ποσοστού επιτυχίας) και στα ποσοτικά (ανάλυση μετατόπισης Ct) αποτελέσματα των κιτ *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την ανάλυση δύο επιπέδων αραιώσης: (1) αρνητικά δείγματα και (2) προσχεδιασμένα θετικά δείγματα που ελήφθησαν με ενοφθαλμισμό αδραντοποιημένων σωματιδίων του ιού SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix). Για την επιβεβαίωση της σταθερότητας των δειγμάτων (σάλιο και NPS), απαραίτητη προϋπόθεση ήταν το $\geq 95\%$ των αντιγράφων να αποδίδουν το ίδιο ποσοστό επιτυχίας και μία μετατόπιση Ct $\leq 10\%$ σε σχέση με το χρονικό σημείο 0 για κάθε συνθήκη σταθερότητας.

Ρινικά, στοματοφαρυγγικά και ρινοφαρυγγικά δείγματα:

Οι διαφορετικές συνθήκες σταθερότητας που εξετάστηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 31. Οι δοκιμασίες διενεργήθηκαν με τη χρήση 3 δεξαμενών δειγμάτων. Εξετάστηκαν αρνητικά δείγματα NPS, 5x LoD (4750 cp/ml) προσχεδιασμένων θετικών δειγμάτων NPS και τρεις παρτίδες δειγμάτων αποδέσμευσης παρτίδας BRS1 (σειρά N2, 1000 cp/10μL), BRS2 (RNAse P gblock, 1000 cp/10μL) και BRS3 (σειρά N1, 1000 cp/10μL) με την πλατφόρμα ABI 7500 Fast Dx.

Από τα αποτελέσματα της ποιοτικής και της ποσοτικής ανάλυσης προκύπτει ότι οι συνθήκες φύλαξης των δειγμάτων NPS που εξετάστηκαν δεν επηρέασαν το ποσοστό επιτυχίας (ανιχνεύτηκε η ίδια κατάσταση με την αναμενόμενη) και δεν οδήγησαν σε σημαντικές μετατοπίσεις Ct των αποτελεσμάτων του κιτ *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM. Κατά συνέπεια, η απόδοση του κιτ ήταν σταθερή παρ' όλες τις διαφορετικές συνθήκες φύλαξης των δειγμάτων NPS που εξετάστηκαν (βλ. Πίνακα 31).

Ο Πίνακας 31 δείχνει τις συνθήκες σταθερότητας ρινοφαρυγγικών δειγμάτων

Πίνακας 31. Συνθήκες σταθερότητας ρινοφαρυγγικού δείγματος.

Συνθήκες	Αξίωση σταθερότητας δείγματος
F/T	3 F/T
4 °C (2 °C έως 8 °C)	72 ώρες
-70 °C	2 εβδομάδες

Δείγματα καθαρού σάλιου

Οι διαφορετικές συνθήκες σταθερότητας που εξετάστηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 32. Οι δοκιμασίες διενεργήθηκαν με τη χρήση 2 δεξαμενών δειγμάτων. Εξετάστηκαν αρνητικά δείγματα καθαρού σάλιου και 3xLoD (3600 cp/ml) προσχεδιασμένα θετικά δείγματα καθαρού σάλιου με την πλατφόρμα ABI 7500 Fast Dx.

Από τα αποτελέσματα της ποιοτικής και της ποσοτικής ανάλυσης προκύπτει ότι οι συνθήκες φύλαξης που εξετάστηκαν δεν επηρέασαν το ποσοστό επιτυχίας (ανιχνεύθηκε η ίδια κατάσταση με την αναμενόμενη) και δεν οδήγησαν σε σημαντικές μετατοπίσεις Ct των αποτελεσμάτων του κιτ *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM*. Κατά συνέπεια, η απόδοση του κιτ ήταν σταθερή παρά τις διαφορετικές συνθήκες φύλαξης των δειγμάτων καθαρού σάλιου που εξετάστηκαν.

Ο Πίνακας 32 δείχνει τις συνθήκες σταθερότητας καθαρού σάλιου.

Πίνακας 32. Συνθήκες σταθερότητας δείγματος καθαρού σάλιου

Συνθήκες	Αξίωση σταθερότητας δείγματος
F/T	3 F/T
RT (18 °C έως 26 °C)	72 ώρες
4 °C (2 °C έως 8 °C)	72 ώρες
Συνδυασμός συνθηκών: 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε συνδυασμό με 72 ώρες στους 4 °C (2 έως 8 °C) σε συνδυασμό με 8 ημέρες στους -20 °C (-30 °C έως -15 °C)	6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου στη συνέχεια 72 ώρες στους 4 °C (2 έως 8 °C) στη συνέχεια 7 ημέρες στους -20 °C (-30 °C έως -15 °C)
-20 °C (-30 °C έως -15 °C)	1 μήνας (30,5 ημέρες)

Ακρίβεια

Η μελέτη ακρίβειας αξιολόγησε την αναπαραγωγιμότητα (το ίδιο δείγμα επαναλαμβάνεται σε διαφορετικές εκτελέσεις και συνθήκες: 5 ημέρες, 3 παρτίδες κιτ, 3 χειριστές και 2 όργανα) και την επαναληψιμότητα (το ίδιο δείγμα επαναλαμβάνεται στην ίδια εκτέλεση και τις ίδιες συνθήκες). Διενεργήθηκαν εξετάσεις σε αρνητικά ρινοφαρυγγικά δείγματα και αρνητικά ρινοφαρυγγικά δείγματα ενοφθαλισμένα σε 5 x LoD στο RGQ MDx.

Για κάθε επίπεδο αραίωσης συλλέχθηκαν 204 σημεία δεδομένων. Τα δεδομένα επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τυπικής απόκλισης (Standard Deviation, SD) και του συντελεστή μεταβλητότητας (%CV) για τους στόχους SARS-CoV-2 στα κανάλια Green, Yellow και Red. Ο Πίνακας 33 καταδεικνύει ότι το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit έχει συνολική ακρίβεια 0,63 SD (2,03% CV) στο κανάλι Green, 0,54 SD (2,22% CV) στο κανάλι Yellow και 1,28 SD (4,10% CV) στο κανάλι Red.

Πίνακας 33. Τυπική απόκλιση και συντελεστής μεταβλητότητας του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Δείγματα και κανάλι ανίχνευσης	Σύνολο	Από ημέρα σε ημέρα	Από παρτίδα σε παρτίδα	Από χειριστή σε χειριστή	Από όργανο σε όργανο	Από εκτέλεση σε εκτέλεση	Εντός εκτέλεσης
Αρνητικά NPS Κανάλι Yellow	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
Αρνητικά NPS Κανάλι Red	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)0	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
Ενοφθαλισμένα NPS Κανάλι Green	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
Ενοφθαλισμένα NPS Κανάλι Yellow	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
Ενοφθαλισμένα NPS Κανάλι Red	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

Κλινική απόδοση

Επιχρίσματα ρινοφαρυγγικού σπειλεού

Η κλινική απόδοση του προσδιορισμού *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας αναδρομικά δοκίμια σε ρινοφαρυγγικό σπειλεό σε μέσο μεταφοράς, που περιλάμβαναν 150 κλινικά δείγματα.

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν από ασθενείς με σημεία και συμπτώματα λοίμωξης COVID-19 και φυλάχτηκαν κατεψυγμένα μέχρι τη χρήση.

Η κλινική επικύρωση διενεργήθηκε σε ABI 7500 Fast Dx. Ο Πίνακας 34 παρουσιάζει την απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ως προς μια μέθοδο αναφοράς.

Πίνακας 34. Κλινική απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ως προς μια μέθοδο αναφοράς.

Κατάσταση δείγματος	N	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Αρνητικό	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7–97,8

Τα ασύμφωνα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με μια τρίτη μέθοδο και αναλύθηκαν εκ νέου με έναν πίνακα συνάφειας. Τα συνολικά αποτελέσματα κλινικής απόδοσης εκφράζονται ως θετική ποσοστιαία συμφωνία (Positive Percent Agreement, PPA) και αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (Negative Percent Agreement, NPA) και περιλαμβάνονται στον Πίνακα 35.

Πίνακας 35. Κλινική απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit μετά από ανάλυση ασύμφωνων αποτελεσμάτων.

Κατάσταση Δείγματος	N	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	–
Αρνητικό	98	5,1 (5/98)	–	94,9 (93/98)	88,7–97,8

Στη συνέχεια παρατίθεται το κλάσμα των δειγμάτων σε συμφωνία, καθώς και η θετική και η αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (PPA και NPA, αντίστοιχα) με τις αναμενόμενες καταστάσεις δειγμάτων:

Θετική ποσοστιαία συμφωνία

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

Αρνητική ποσοστιαία συμφωνία

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

Επιχρίσματα ρινοφαρυγγικού σπειλεού, συμπεριλαμβανομένων ασυμπτωματικών ατόμων

Η κλινική απόδοση του προσδιορισμού *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας αναδρομικά δοκίμια σε ρινοφαρυγγικό σπειλεό σε μέσο μεταφοράς, που περιλάμβαναν 153 κλινικά δείγματα. Όλα τα δοκίμια συλλέχθηκαν από ασθενείς χωρίς συμπτώματα και χωρίς άλλη αιτία που οδηγεί σε υποψία λοίμωξης με την νόσο COVID-19.

Η κλινική επικύρωση διενεργήθηκε σε ABI 7500 Fast Dx. Δεκαέξι δείγματα αποκλείστηκαν από την ανάλυση ύστερα από εξέταση με το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ως μη έγκυρα σύμφωνα με τα κριτήρια επικύρωσης δειγμάτων (Πίνακας 23).

Ο Πίνακας 36 παρουσιάζει την απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ως προς μια μέθοδο αναφοράς, η οποία εκφράζεται ως θετική ποσοστιαία συμφωνία (Positive Percent Agreement, PPA) και αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (Negative Percent Agreement, NPA).

Πίνακας 36. Κλινική απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ως προς μια μέθοδο αναφοράς

Κατάσταση δείγματος	N	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	36,0 (18/50)	–
Αρνητικό	87	1,15 (1/87)	–	98,85 (86/87)	93,8–99,8

Δεκαεννέα ασύμφωνα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με μια τρίτη μέθοδο και αναλύθηκαν εκ νέου με έναν πίνακα συνάφειας. Τα συνολικά αποτελέσματα κλινικής απόδοσης εκφράζονται ως θετική ποσοστιαία συμφωνία (Positive Percent Agreement, PPA) και αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (Negative Percent Agreement, NPA) και περιλαμβάνονται στον Πίνακα 37.

Πίνακας 37. Κλινική απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit μετά από ανάλυση ασύμφωνων αποτελεσμάτων

Κατάσταση δείγματος	N	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0 (0/32)	–
Αρνητικό	105	0,95 (1/105)	–	99,05 (104/105)	94,8–99,8

Δεκαοχτώ ψευδώς αρνητικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν εκ νέου ως αληθώς αρνητικά, ενώ το ένα ψευδώς θετικό παρέμεινε ψευδώς θετικό.

Στη συνέχεια παρατίθεται το κλάσμα των δειγμάτων σε συμφωνία, καθώς και η θετική και η αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (PPA και NPA, αντίστοιχα) με τις αναμενόμενες καταστάσεις δειγμάτων:

Θετική ποσοστιαία συμφωνία

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

Αρνητική ποσοστιαία συμφωνία

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

Δείγματα καθαρού σάλιου

Η κλινική απόδοση του προσδιορισμού *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας δείγματα καθαρού σάλιου, που περιλάμβαναν 142 δείγματα σάλιου.

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν από ασθενείς με σημεία και συμπτώματα λοίμωξης COVID-19. Η κλινική επικύρωση διενεργήθηκε σε ABI 7500 Fast Dx. Δώδεκα δείγματα αποκλείστηκαν από την ανάλυση ύστερα από εξέταση με το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, καθώς και η μέθοδος αναφοράς, εφόσον και οι δύο δοκιμές οδήγησαν σε μη έγκυρη κατάσταση σύμφωνα με τα κριτήρια επικύρωσης δειγμάτων.

Ο Πίνακας 38 παρουσιάζει την απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ως προς μια μέθοδο αναφοράς.

Πίνακας 38. Κλινική απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ως προς μια μέθοδο αναφοράς.

Κατάσταση δείγματος	N	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	45	93,33 (42/45)	82,14–97,71	6,67 (3/45)	--
Αρνητικό	85	0 (0/85)	-	100 (85/85)	95,68–100,00

Τρία ασύμφωνα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με μία τρίτη μέθοδο και αναλύθηκαν εκ νέου με έναν πίνακα συνάφειας. Τα συνολικά αποτελέσματα κλινικής απόδοσης εκφράζονται ως θετική ποσοστιαία συμφωνία (Positive Percent Agreement, PPA) και αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (Negative Percent Agreement, NPA) και περιλαμβάνονται στον Πίνακα 39.

Πίνακας 39. Κλινική απόδοση του *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* μετά από ανάλυση ασύμφωνων αποτελεσμάτων.

Κατάσταση δείγματος	N	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	43	97,67 (42/43)	87,94–99,59	2,32 (1/43)	--
Αρνητικό	87	0 (0/87)	-	100 (87/87)	95,77–100,00

Δύο ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα κατηγοριοποιήθηκαν εκ νέου ως αληθώς αρνητικά, ενώ το ένα ψευδώς αρνητικό παρέμεινε ψευδώς αρνητικό.

Στη συνέχεια παρατίθεται το κλάσμα των δειγμάτων σε συμφωνία, καθώς και η θετική και η αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (PPA και NPA, αντίστοιχα) με τις αναμενόμενες καταστάσεις δειγμάτων:

Θετική ποσοστιαία συμφωνία

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

Αρνητική ποσοστιαία συμφωνία

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

Βιβλιογραφία

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

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες ανατρέξτε στη σελίδα «Frequently Asked Questions» (Συχνές ερωτήσεις) του κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος καναλιού Green (FAM) στον θετικό μάρτυρα (Positive Control, PC)

- | | |
|---|---|
| a) Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για την ανάλυση των δεδομένων της RT-PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο. | Για ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού FAM (Green) για την ανάλυση RT-PCR των στόχων SARS-CoV-2, το κανάλι φθορισμού HEX/VIC/JOE (Yellow) για τον μάρτυρα δειγματοληψίας και το Cy5/Atto (Red) για τον εσωτερικό μάρτυρα. |
| b) Εσφαλμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας. | Συγκρίνετε το πρόγραμμα της RT-PCR με το πρωτόκολλο. |
| c) Εσφαλμένη διαμόρφωση της αντίδρασης της PCR. | Επαληθεύστε τα βήματά εργασίας σας με το πλάνο διοχέτευσης με πιπέτα και, εάν χρειάζεται, επαναλάβετε την PCR. |
| d) Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες ή το kit <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR έχει λήξει. | Τηρήστε τις συνθήκες αποθήκευσης, επαληθεύστε την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούριο kit, εάν χρειάζεται. |
| e) Εσφαλμένη διαμόρφωση της πλατφόρμας real-time RT-PCR κατά τη διαμόρφωση δεδομένων. | Εφαρμόστε τις συνιστώμενες διαμορφώσεις που αφορούν την πλατφόρμα real time RT-PCR που χρησιμοποιείτε και που περιγράφονται στο παρόν εγχειρίδιο. |
| f) Παρουσιάστηκε αναστολή της PCR. | Ακολουθείτε τις ορθές πρακτικές του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας για να αποφύγετε την εισαγωγή επιμολυντών. Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολουθήστε το πρωτόκολλο που αναφέρει το εγχειρίδιο. Ελέγξτε την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο kit, αν χρειαστεί. Επαναλάβετε τον προσδιορισμό με άλλο δείγμα. |

Σήμα Green (FAM) στον μάρτυρα χωρίς μήτρα ή τον μάρτυρα χωρίς εκχύλιση

Πρόκειψε μόλυνση με αλληλουχίες SARS-CoV-2 κατά την προετοιμασία της πλάκας RT-PCR.

Επαναλάβετε την RT-PCR με νέα αντιδραστήρια. Ακολουθείτε τις ορθές πρακτικές του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας για να αποφύγετε την εισαγωγή επιμολυντών. Ακολουθήστε το πρωτόκολλο που αναφέρει το εγχειρίδιο. Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος καναλιού Red (Cy5/Atto) από τον εσωτερικό μάρτυρα











- a) Υπήρξε παρεμβολή στην αντίδραση της RT-PCR. Πραγματοποιείται αναστολή της PCR. Ακολουθείτε τις ορθές πρακτικές του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας για να αποφύγετε την εισαγωγή επιμολυντών. Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμνούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολουθήστε το πρωτόκολλο που αναφέρει το εγχειρίδιο. Επαναλάβετε το πείραμα συλλέγοντας νέο δείγμα.
- b) Ο εσωτερικός μάρτυρας έχει υποβαθμιστεί. Ακολουθείτε τις ορθές πρακτικές του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας για να αποφύγετε την εισαγωγή RNAσών. Ακολουθήστε τις συστάσεις που αναφέρει το εγχειρίδιο. Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμνούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Τηρήστε τις συνθήκες αποθήκευσης, ελέγξτε την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούριο kit, εάν χρειάζεται.
- c) Εσφαλμένη διαμόρφωση της πλατφόρμας real-time RT-PCR κατά τη διαμόρφωση δεδομένων. Εφαρμόστε τις συνιστώμενες διαμορφώσεις που αφορούν την πλατφόρμα real time RT-PCR που χρησιμοποιείτε και που περιγράφονται στο παρόν εγχειρίδιο.

Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος καναλιού Yellow (VIC/HEX) του μάρτυρα δειγματοληψίας

- a) Το κλινικό δείγμα έχει υποβαθμιστεί. Ακολουθήστε τις συστάσεις που προτείνει ο προμηθευτής του προϊόντος συλλογής όσον αφορά τη φύλαξη, τον χειρισμό και τη μεταφορά. Ακολουθήστε το πρωτόκολλο που αναφέρει το εγχειρίδιο, συμπεριλαμβανομένων των βημάτων παρασκευής δειγμάτων με το SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Τηρήστε τις συνθήκες φύλαξης, ελέγξτε την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων, όπως του SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, και χρησιμοποιήστε ένα καινούριο kit, εάν χρειάζεται.
- b) Το δοκίμιο δεν έχει συλλεχθεί σωστά. Δεν έχουν συλλεχθεί αρκετά ανθρώπινα κύτταρα στον στελεό ή δεν έχουν μεταφερθεί στο μέσο μεταφοράς. Ακολουθήστε τις συστάσεις που προτείνει ο προμηθευτής του προϊόντος συλλογής όσον αφορά τη συλλογή του δοκιμίου και τον χειρισμό του.
- c) Εσφαλμένη διαμόρφωση της πλατφόρμας real-time RT-PCR κατά τη διαμόρφωση δεδομένων. Εφαρμόστε τις διαμορφώσεις που αφορούν την πλατφόρμα real time RT-PCR που χρησιμοποιείτε και που περιγράφονται στο παρόν εγχειρίδιο.

Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στις οδηγίες χρήσης ή στη συσκευασία και την επισήμανση:

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για 768 ή 3.072 αντιδράσεις
	Ημερομηνία λήξης
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Συστατικά
	Περιεχόμενα
	Αριθμός
	Διεθνής κωδικός μονάδων εμπορίας
R _n	Η ένδειξη R αφορά την αναθεώρηση των οδηγιών χρήσης και n είναι ο αριθμός αναθεώρησης
	Περιορισμός θερμοκρασίας

Σύμβολο

Ορισμός συμβόλου



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης



Διατηρήστε το προϊόν μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία



Προειδοποίηση/προσοχή

Στοιχεία επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, απευθυνθείτε στο τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN στον ιστότοπο **support.qiagen.com**.

Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Για 768 αντιδράσεις: Διάλυμα προετοιμασίας, Χρωστική ROX, Κύριο μείγμα, Εκκινητές και ανιχνευτές, Εσωτερικός μάρτυρας, Νερό (NTC) και Θετικός μάρτυρας	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Για 3072 αντιδράσεις: Διάλυμα προετοιμασίας, Χρωστική ROX, Κύριο μείγμα, Εκκινητές και ανιχνευτές, Εσωτερικός μάρτυρας, Νερό (NTC) και Θετικός μάρτυρας	4511469
Όργανο και παρελκόμενα		
PCR tubes, 0.1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Για χρήση με 72-well rotor, Strip tubes, and caps	981103
Rotor-Gene Q software	Λογισμικό Rotor-Gene Q έκδοσης 2.3.1 (ή νεότερης)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Κυκλοποιητής real-time PCR με 5 κανάλια, αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης, λογισμικό, φορητός υπολογιστής και παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση	9002032
72-Well Rotor	Για την υποδοχή Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, με όγκους αντίδρασης 10–50 μl	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Για την ασφάλιση Strip Tubes and Caps, 0.1 ml στον 72-Well Rotor	9018904

Για ενημερωμένες πληροφορίες σχετικά με τις άδειες χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, βλ. εγχειρίδιο του αντίστοιχου kit της QIAGEN ή το κατάλληλο εγχειρίδιο χρήσης. Οι οδηγίες και τα εγχειρίδια χρήστη των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο **www.qiagen.com**. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN ή τον αντιπρόσωπο της περιοχής σας.

Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Αναθεώρηση

Περιγραφή

R3, Σεπτέμβριος
2021

Επέκταση αξίωσης:

1. Προσθήκη δοκιμασίας με τη χρήση δειγμάτων σάλιου.
2. Τροποποίηση της ροής εργασίας.
3. Για τη χρήση 3 επιπρόσθετων πλατφορμών και του αντίστοιχου λογισμικού τους: CFX96 Dx με λογισμικό CFX Manager Dx, έκδοση 3.1.3090.1022 (ή νεότερη), cobas z 480 με LightCycler 480 SW UDF, έκδοση 2.0.0 (ή νεότερη) και QuantStudio 5 Dx με λογισμικό QuantStudio 5 Dx IVD, έκδοση 1.0.1 (ή νεότερη).
4. Τα όρια ανίχνευσης των 3 επιπρόσθετων πλατφορμών (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) προστέθηκαν στην ενότητα αναφορικά με την απόδοση για τα δείγματα σε ρινοφαρυγγικό, ρινικό και στοματοφαρυγγικό στείλειό.
5. Η ενότητα αναφορικά με τα χαρακτηριστικά απόδοσης επικαιροποιήθηκε.
6. Μόνο τα κανάλια φθορισμού (Green, Red και Yellow) διατηρήθηκαν για το όργανο RGQ (οι ονομασίες των χρωστικών σε αγκύλες διαγράφηκαν).
7. Μόνο οι ονομασίες των χρωστικών διατηρήθηκαν για τα CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 και QuantStudio 5 Dx.
8. Για το ABI7500 Fast Dx, τα φίλτρα φθορισμού A/1, B/2 και E/5 διαγράφηκαν. Μόνο οι ονομασίες των χρωστικών διατηρήθηκαν (Fam, Vic και Cy5).
9. Αλλαγές στους Πίνακες 34–37 στην ενότητα αναφορικά με την κλινική απόδοση για τη διευκρίνιση της παρουσίας.

R4, Ιανουάριος 2022

Διόρθωση τυπογραφικού σφάλματος στον Πίνακα 39.

R5, Σεπτέμβριος
2022

Ενημέρωση στην ενότητα «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων»

Ενημέρωση στον Πίνακα 17.

Άδεια περιορισμένης χρήσης για το artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος των παρακάτω όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό και μόνο με τα συστατικά στοιχεία που περιλαμβάνονται στο σετ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του σετ σε οποιαδήποτε στοιχεία που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το σετ, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα πρωτόκολλα έχουν παροσχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το σετ ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το σετ και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η επαντεξεργασία, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του σετ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τυχόν ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιώνεται για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Συμφωνίας άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής της ιδιοκτησίας σχετικά με το σετ ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Prep&Amp™, Rotor-Gene® (QIAGEN Group), ATCC® (American Type Culture Collection), CFX96™, Hard-Shell® (Bio-Rad Laboratories, Inc.), Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc), ZeptoMetrix®, NATtrol™ (Cole-Parmer), Colgate®, Total SF Whitening™ (Colgate-Palmolive Company), Listerine® (Johnson & Johnson), Tussidane® (Laboratoires Des Realisations Therapeutiques Elerte), PulmoFluide® (Laboratoires Gerda), Excel® (Microsoft Corporation), Ricola® (Ricola Group), cobas®, LightCycler® (Roche Group), ABI®, MicroAmp™, EnduraPlate™, QuantStudio®, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific or its Subsidiaries), Altoids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Οι καταχωρισμένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα, κ.λπ., που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα και αν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.

09/2022 R5 HB-2850-005 © 2021 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Παραγγελίες www.qiagen.com/shop | Τεχνική υποστήριξη support.qiagen.com |
Ιστότοπος www.qiagen.com