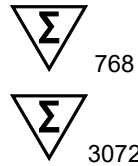


Ιούλιος 2021

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



Έκδοση 1

IVD

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Για χρήση στα όργανα Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM και ABI[®]
7500 Fast Dx



REF

4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R2

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Περιγραφή και αρχή λειτουργίας.....	5
Πληροφορίες για τους παθογόνους μικροοργανισμούς.....	5
Σύνοψη και επεξήγηση.....	6
Υλικά που παρέχονται	9
Περιεχόμενα του κιτ.....	9
Συστατικά του κιτ.....	10
Πλατφόρμες και λογισμικό.....	11
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	12
Αναλώσιμα	12
Εξοπλισμός.....	12
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	13
Πληροφορίες ασφάλειας.....	13
Προφυλάξεις.....	14
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	15
Μεταφορά, φύλαξη και χειρισμός δοκιμίων.....	15
Συλλογή, μεταφορά και φύλαξη δοκιμίων.....	15
Πρωτόκολλο: παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο RGQ MDx 5plex HRM.....	16
Πρωτόκολλο: παρασκευή δείγματος και ανίχνευση SARS-CoV-2 στο ABI 7500 Fast Dx.....	22
Αποτελέσματα	27

Ερμηνεία αποτελεσμάτων	29
Περιορισμοί	31
Απόδοση	32
Αναλυτική ευαισθησία (Όριο ανίχνευσης).....	32
Μελέτες ειδικότητας ανάλυσης (Συμπεριληψιμότητα και αποκλειστικότητα/διασταυρούμενη αντιδραστικότητα)	32
Παρεμβαλλόμενες ουσίες	38
Ακρίβεια.....	39
Κλινική απόδοση	40
Βιβλιογραφία	44
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	45
Σύμβολα	47
Στοιχεία επικοινωνίας	48
Πληροφορίες παραγγελιών.....	49
Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου	50

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *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 με την 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 PCR και των διαγνωστικών διαδικασιών *in vitro*.

Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν λοίμωξη με 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 (RGQ) MDx System ή ABI 7500 Fast Dx μεθόδου 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 στείλειου) (3).

Σε συνδυασμό με το ιστορικό του ασθενούς και τα επιδημιολογικά στοιχεία για τον SARS-CoV-2, οι προσδιορισμοί 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 την 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).

Ο προσδιορισμός SARS-CoV-2 Prep&Amp UM στοχεύει 2 γονίδια του ιού (τα γονίδια N1 και N2) που ανιχνεύονται στο ίδιο κανάλι φθορισμού. Οι δύο γονιδιακοί στόχοι δεν διαφοροποιούνται και η ενίσχυση του ενός ή και των δύο γονιδιακών στόχων οδηγεί σε σήμα φθορισμού. Τα θετικά αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της παρουσίας του ιού SARS-CoV-2 αλλά δεν αποκλείουν συλλοίμωξη με άλλα παθογόνα. Από την άλλη πλευρά, τα αρνητικά αποτελέσματα RT-PCR δεν αποκλείουν το ενδεχόμενο λοίμωξης.

Σύνοψη και επεξήγηση

Το *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 RT-PCR είτε σε σύστημα RGQ MDx είτε σε πλατφόρμες ABI 7500 Fast Dx (Εικόνα 1). Το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την ενίσχυση μιας περιοχής 72 ζευγών βάσεων και μιας περιοχής 67 ζευγών βάσεων του γονιδιώματος RNA του SARS-CoV-2 και για την άμεση ανίχνευσή τους στο κανάλι φθορισμού «Green» των οργάνων RGQ MDx και για το φίλτρο φθορισμού A/1 του οργάνου ABI 7500 Fast Dx.

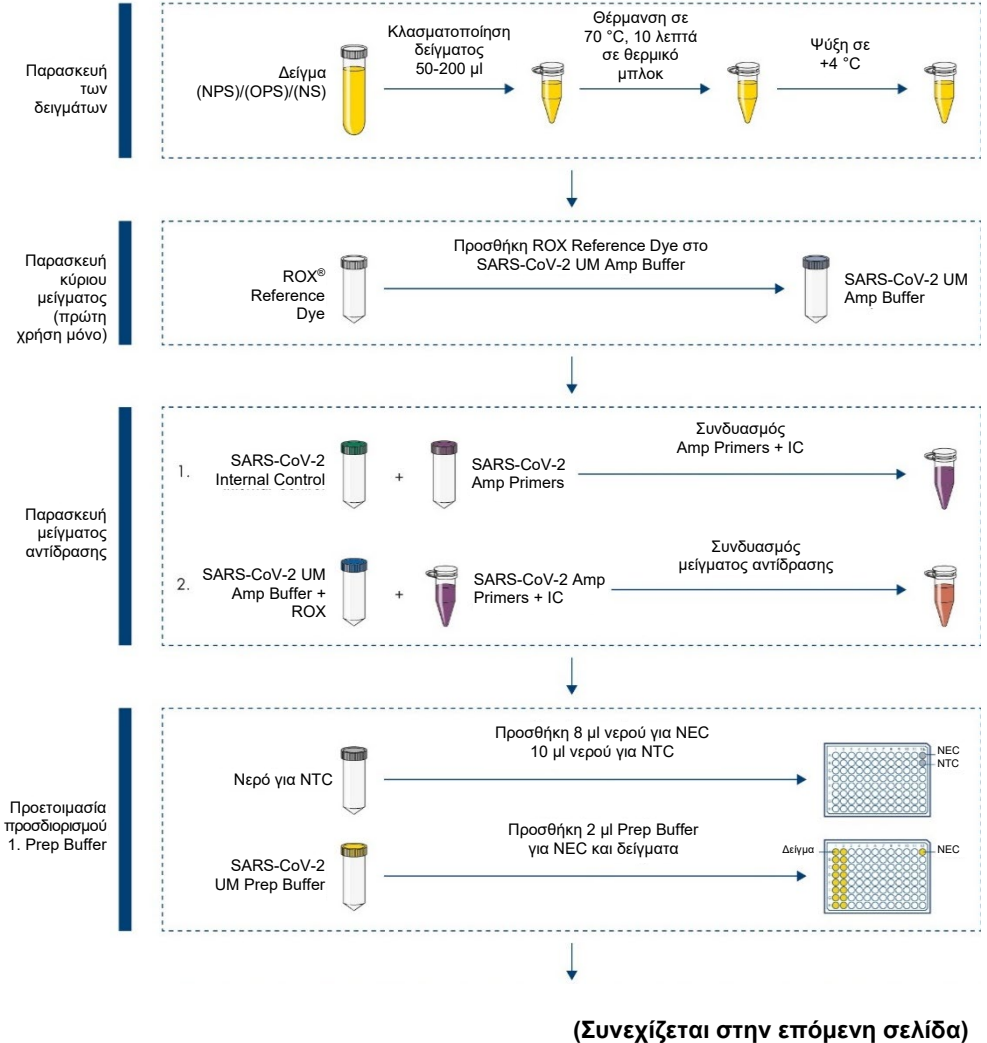
Το μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit περιέχει επίσης τα ολιγονουκλεοτίδια που απαιτούνται για τις ενισχύσεις RNase P. Όταν ανιχνεύονται στο κανάλι φθορισμού «Yellow» του οργάνου RGQ MDx ή με το φίλτρο φθορισμού B/2 του ABI 7500 Fast Dx, τα αμπλικόνια αυτά διασφαλίζουν ότι έχει συλλεχθεί επαρκές βιολογικό δείγμα στον στείλειό. Ο έλεγχος είναι ουσιώδης για 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 RT-PCR. Ανιχνεύεται ως εσωτερικός μάρτυρας RNA (Internal Control, IC) στο κανάλι φθορισμού «Red» των οργάνων RGQ MDx και με το φίλτρο φθορισμού E/5 του ABI 7500 Fast Dx. Καθώς ο εσωτερικός μάρτυρας (Internal Control, IC) περιλαμβάνεται στο SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, η ενίσχυσή του θα πρέπει να είναι συνεχής εκτός αν υπάρχει παρουσία αναστολέα της RT-PCR μέσα στο δείγμα ή στην αντίδραση της RT-PCR, ο οποίος καθυστερεί ή αποτρέπει την ενίσχυση.

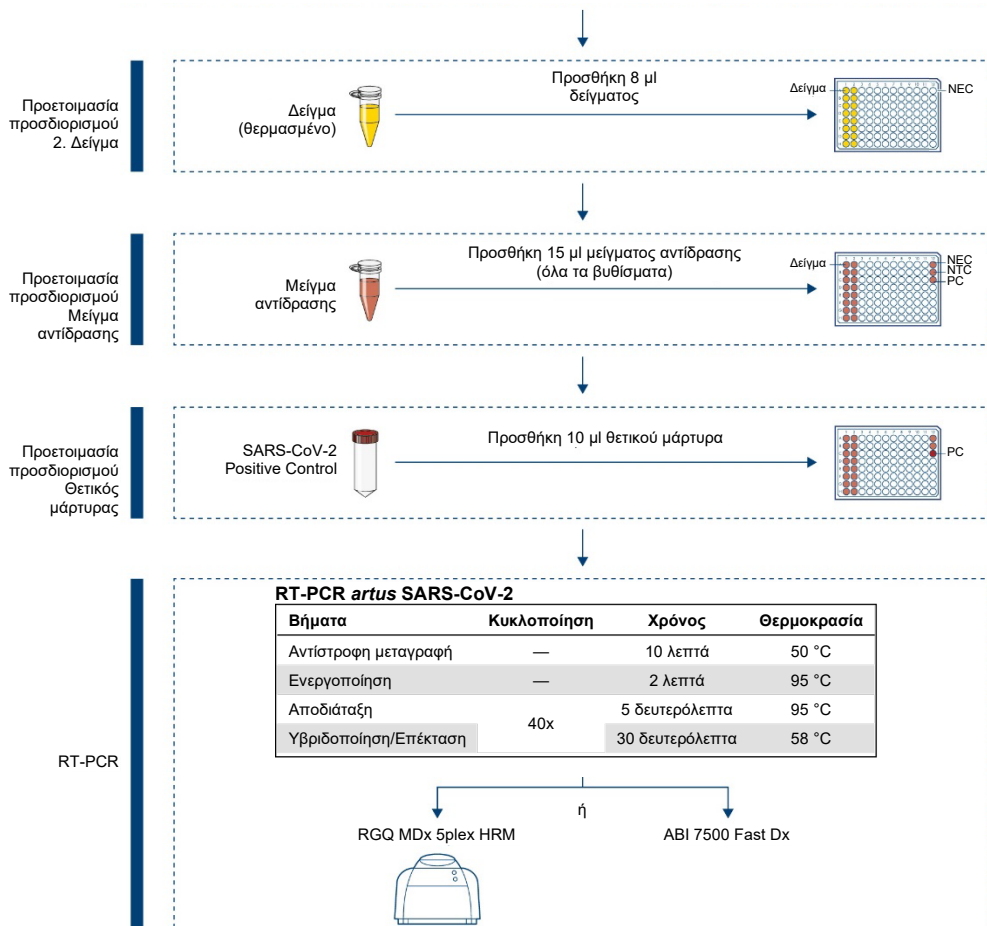
Εξωτερικοί θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (SARS-CoV-2 Positive Control και νερό χωρίς νουκλεάση για χρήση ως NTC, αντίστοιχα) παρέχονται στο kit *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit για να βεβαιώσουν την απόδοση του βήματος της PCR. Συνιστάται ιδιαίτερα ένας μάρτυρας χωρίς εκχύλιση (SARS-CoV-2 UM Prep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

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

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



(Συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)



Εικόνα 1 Ροή 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				4511460	4511469
Αριθμός αντιδράσεων				768	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 (IC)]	1 x 1390	4 x 1390
Διαυγές	Κόκκινο	SARS-CoV-2 Positive Control	Positive Control (Θετικό υλικό ελέγχου)	1 x 220	4 x 220
Διαυγές	Διαυγές	Water for NTC (Νερό για NTC)	Water (NTC) [Νερό (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

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΙΤ

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.

Μάρτυρες και βαθμονομητές

Ο προσδιορισμός περιέχει 5 μάρτυρες για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της 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.

Βήμα 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. Το kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δύο ροές εργασίας που απαιτούν τη χρήση του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή του ABI 7500 Fast Dx και του κατάλληλου λογισμικού που χρησιμοποιούν:

- 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

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Αναλώσιμα

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας χωρίς νουκλεάση με φίλτρα
- Σωληνάρια 1,5 ml ή 2 ml χωρίς PCR
- Σωληνάρια PCR 0,1 ml για χρήση με Rotor-Gene® Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, αρ. κατ. 981103)
- 96-Well MicroAmp™ για χρήση με την πλατφόρμα ABI 7500 Fast Dx qPCR (Applied Biosystems 96-well plate, αρ. κατ. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive film για χρήση με την πλατφόρμα ABI 7500 Fast Dx qPCR (Applied Biosystems, αρ. κατ. 4360954)

Εξοπλισμός*

- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης 2 ml
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Αναδευτήρας Vortex
- Θερμικό μπλοκ
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (αρ. κατ. 9002032) με λογισμικό Rotor-Gene Q έκδοσης 2.3.1 ή νεότερης
- Rotor-Disc 72 Rotor (αρ. κατ. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (αρ. κατ. 9018900)
- Μπλοκ φόρτωσης 72 βυθισμάτων (QIAGEN loading block 72 x 0.1 ml tubes, αρ. κατ. 9018901)
- Εναλλακτικά: Πλατφόρμα ABI 7500 Fast Dx qPCR (Thermo Fisher Scientific®, αρ. κατ. 4406985) με έκδοση λογισμικού 1.4.1 ή νεότερη και φυγόκεντρος με πλάκα 96 βυθισμάτων

* Πριν από τη χρήση και κατά περίπτωση, βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

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 την εργασία με χημικές ουσίες, 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 κιτ 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 RNάσες κατά το πείραμα και χρησιμοποιείτε πλαστικά υλικά χωρίς RNάσες.
- 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. Μη 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 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 6 μήνες ή μέχρι την ημερομηνία έναρξης.

Μεταφορά, φύλαξη και χειρισμός δοκιμών

Το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit προορίζεται για χρήση με επιχρίσματα από ρινοφαρυγγικό στείλειό, ρινικό στείλειό και στοματοφαρυγγικό στείλειό. Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα.

Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων 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 δοκιμών

Για τη συλλογή, τη φύλαξη και τη μεταφορά δοκιμών από στείλειό, ανατρέξτε στις συστάσεις του προμηθευτή. Ο στείλειός πρέπει να είναι πλήρως εμβυθισμένος στο μέσο μεταφοράς για να διατηρείται η ακεραιότητα του δοκιμίου.

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

Το πρωτόκολλο περιγράφει την παρασκευή δείγματος και την προετοιμασία της RT-PCR για την ανίχνευση των στόχων SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα επιχρίσματα από ρινικό, ρινοφαρυγγικό ή στοματοφαρυγγικό στείλειό αποθηκευμένα σε μέσο μεταφοράς στο RGQ MDx 5plex HRM.

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Επαληθεύστε ότι τηρούνται οι ημερομηνίες λήξης και οι συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη 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 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.
- 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, Νερό για 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 στροβιλίζετε) και στη συνέχεια εκτελέστε σύντομη φυγοκέντριση. Μπορείτε να ομογενοποιήσετε όλα τα άλλα επιμέρους αντιδραστήρια με παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex 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 qPCR 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

1. Παρασκευή των δειγμάτων

- 1α. Στροβιλίστε έντονα σε αναδευτήρα τύπου vortex τον στείλειό που περιέχει το δείγμα.
- 1β. 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. Κατά την πρώτη χρήση, συμπληρώστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer με τη χρωστική ROX Reference Dye.

- 2α. Προσθέστε 32,8 μl της χρωστικής ROX σε 1 σωληνάριο με SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 2β. Κλείστε το καπάκι που περιέχει το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και τη χρωστική ROX και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές.
- 2c. Φυγοκεντρίστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer που περιέχει χρωστική ROX ώστε να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

3. Για μια πλήρη πλάκα RGQ MDx (72 βυθισμάτων), παρασκευάστε ένα μείγμα κλασμάτων από εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers με SARS-CoV-2 Internal Control.

- 3α. 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.
- 3β. Κλείστε το καπάκι και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές ή εκτελέστε παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3-5 δευτερόλεπτα.
- 3γ. Φυγοκεντρίστε τους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers που περιέχουν τον εσωτερικό μάρτυρα (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 αντίδρ. (+22% επιπλέον όγκος*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	638
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/μl	10 cp/μl	1,5	132
Συνολικό μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	770

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

4. Παρασκευάστε ένα μείγμα αντίδρασης σύμφωνα με τον Πίνακα 2 και αναμείξτε σχολαστικά.

Πίνακας 2. Προετοιμασία μείγματος αντίδρασης

Μείγμα αντίδρασης RT-PCR				Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)
Αντιδραστήρια	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντίδρ.	72 αντίδρ. (+20% επιπλέον όγκος*)
SARS-CoV-2 UM Amp buffer [†]	4x	1x	6,25	540
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	2,9x	1x	8,75	756
Συνολικός όγκος αντίδρασης		–	15,00	1.296

* **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.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer συμπληρωμένο με τη χρωστική ROX Reference Dye.

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers συμπληρωμένοι με SARS-CoV-2 Internal Control.

5. Διανείμετε 8 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο σωληνάριο PCR που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NEC.
6. Χορηγήστε 10 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο σωληνάριο PCR που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NTC.
7. Διανείμετε 2 μl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer σε κάθε σωληνάριο PCR που αντιστοιχίζεται στον μάρτυρα NEC και τα παρασκευασμένα δείγματα.
8. Προσθέστε 8 μl του παρασκευασμένου δείγματος σε σωληνάριο PCR που περιέχει SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Αναμείξτε αναρροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
9. Προσθέστε 15 μl από το μείγμα αντίδρασης που παρασκευάσατε στο βήμα 4 στα σωληνάρια που αντιστοιχούν στα δείγματα και τους μάρτυρες (δείτε ένα παράδειγμα στην Εικόνα 2). Αναμείξτε αναρροφώντας 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: Επιληθεύστε ότι τα σωληνάρια έχουν κλείσει καλά προς αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης.

10. Χορηγήστε 10 μl SARS-CoV-2 Positive Control στο κατάλληλο σωληνάριο PCR. Αναμείξτε αναρροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
11. Ρυθμίστε το πρόγραμμα της RT-PCR στο όργανο RGQ MDx 5plex HRM σύμφωνα με τις προδιαγραφές που ορίζει ο Πίνακας 3.

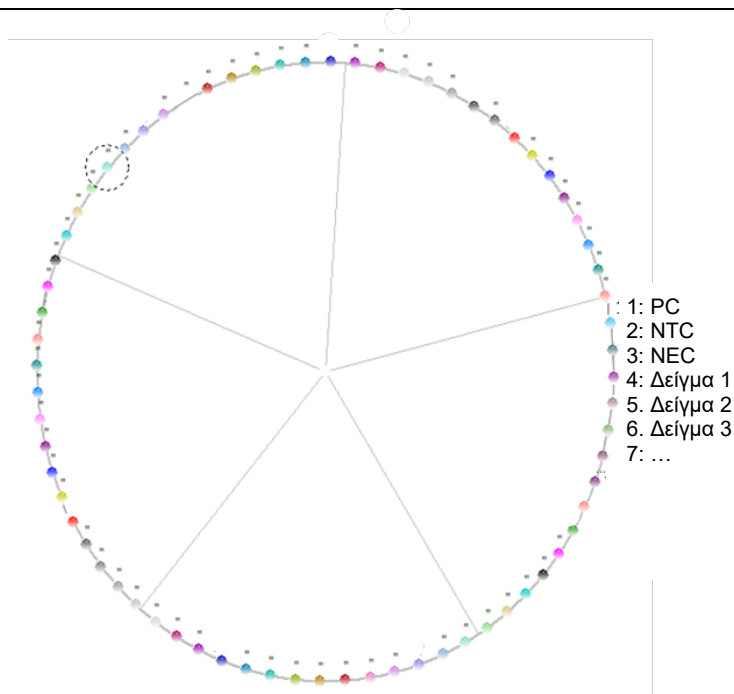
Σημείωση: Η λήψη δεδομένων θα πρέπει να πραγματοποιείται στη διάρκεια του βήματος υβριδοποίησης/επέκτασης.

12. 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		
				Green (FAM), Yellow (HEX) και Red (Atto)



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

13. 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).

14. 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.

15. Επιλέξτε **Perform optimization before the first acquisition** (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν από την 1η λήψη).

16. Ξεκινήστε την εκτέλεση.

17. 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 στο όργανο ABI 7500 Fast Dx qPCR.

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Επαληθεύστε ότι τηρούνται οι ημερομηνίες λήξης και οι συνθήκες φύλαξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη 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 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.
- 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, Νερό για 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 αναστρέφοντας 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 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 qPCR 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

1. Παρασκευή των δειγμάτων

- 1α. Στροβιλίστε έντονα σε αναδευτήρα τύπου vortex τον στείλειό που περιέχει το δείγμα.
- 1β. Διαμοιράστε κλάσματα 50-200 μl του δείγματος σε σωληνάρια 1,5 ml χωρίς PCR.
- 1γ. 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. Κατά την πρώτη χρήση, συμπληρώστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer με τη χρωστική ROX Reference Dye.

- 2α. Προσθέστε 32,8 μl της χρωστικής ROX σε σωληνάριο με SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 2β. Κλείστε το καπάκι που περιέχει το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer και τη χρωστική ROX και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές.
- 2γ. Φυγοκεντρίστε το SARS-CoV-2 UM Amp Buffer που περιέχει χρωστική ROX ώστε να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

3. Για μια πλήρη πλάκα ABI 7500 Fast Dx plate (96 βυθισμάτων), παρασκευάστε ένα μείγμα κλασμάτων από εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers με SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 3a. Μεταφέρετε τον απαιτούμενο όγκο 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.
 - 3b. Κλείστε το καπάκι και αναστρέψτε το σωληνάριο 3 φορές ή εκτελέστε παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex για 3-5 δευτερόλεπτα.
 - 3c. Φυγοκεντρίστε τους εκκινητές SARS-CoV-2 Amp Primers που περιέχουν τον εσωτερικό μάρτυρα (IC) ώστε το διάλυμα να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

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

Αντιδραστήρια	Μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)	
	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντιδρ.	96 αντιδρ. (+21% επιπλέον όγκος*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	841	
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/μl	10 cp/μl	1,5	174	
Συνολικό μείγμα SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1.015	

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

4. Παρασκευάστε ένα μείγμα αντίδρασης σύμφωνα με τον Πίνακα 6 και αναμειξτε σχολαστικά.

Πίνακας 6. Προετοιμασία μείγματος αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Μείγμα αντίδρασης RT-PCR			Αριθμός αντιδράσεων Όγκος (μl)	
	Πρωτογενής συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	1 αντιδρ.	96 αντιδρ. (+20% επιπλέον όγκος*)	
SARS-CoV-2 UM Amp buffer [†]	4x	1x	6,25	720	
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	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.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer συμπληρωμένο με τη χρωστική ROX Reference Dye

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers συμπληρωμένοι με SARS-CoV-2 Internal Control

5. Διανείμετε 8 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NEC.
6. Χορηγήστε 10 μl νερό χωρίς νουκλεάση στο βύθισμα που έχει αντιστοιχιστεί στον μάρτυρα NTC.
7. Διανείμετε 2 μl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer σε κάθε βύθισμα που αντιστοιχίζεται στον μάρτυρα NEC και τα παρασκευασμένα δείγματα.
8. Προσθέστε 8 μl του παρασκευασμένου δείγματος σε βύθισμα που περιέχει SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
9. Προσθέστε 15 μl από το μείγμα αντίδρασης που παρασκευάσατε στο βήμα 4 στα βύθισμα που αντιστοιχούν στα δείγματα και τους μάρτυρες (δείτε ένα παράδειγμα στην Εικόνα 3). Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
10. Χορηγήστε 10 μl SARS-CoV-2 Positive Control στο κατάλληλο βύθισμα. Αναμείξτε αναροφώντας και διοχετεύοντας με πιπέτα 5 φορές.
11. 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.
12. Φυγοκεντρίστε για σύντομο διάστημα την πλάκα PCR ώστε το υγρό να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του βυθίσματος.
13. Ρυθμίστε το πρόγραμμα της RT-PCR στη λειτουργία εκτέλεσης «Standard 7500» του ABI 7500 Fast Dx όπως ορίζει ο Πίνακας 7.
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*.
14. 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.
15. Επιλέξτε τα βύθισμα που χρησιμοποιούνται και εφαρμόστε τους ανταποκριτές FAM, VIC και Cy5. Η λήψη δεδομένων πρέπει να πραγματοποιείται με την παθητική χρωστική ROX στην επιλογή **ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ**.

16.Επαληθεύστε ότι η πρότυπη καμπύλη του ABI 7500 Fast Dx είναι ρυθμισμένη στην επιλογή Absolute Quantitation (Απόλυτη ποσοτικοποίηση).

17.Ξεκινήστε την εκτέλεση.

18.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 Green (FAM), Yellow (VIC) και Red (Cy5)
Υβριδοποίηση/Επέκταση	30 s	58		

	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 3. Παράδειγμα διάταξης πλάκας σε ABI 7500 Fast Dx

Αποτελέσματα

Στο RGQ MDx 5plex HRM τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό Rotor-Gene Q έκδοση 2.3.1 (ή νεότερης) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (εγχειρίδιο χρήση του Rotor-Gene Q MDx, αναθεώρηση 7, Σεπτέμβριος 2018). Απαιτούνται οι παρακάτω παράμετροι ανάλυσης για τη διατήρηση της συνέπειας ανάμεσα στις διαφορετικές αναλύσεις (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. 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 έκποπων πιμών: Όριο απόδοσης αντίδρασης	Ναι Ενεργοποίηση 0%	Όχι	Όχι
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 επιλεγμένων δειγμάτων συνοψίζονται σε πίνακα και μπορούν να εξαχθούν σε αρχείο Excel[®] κάνοντας δεξί κλικ στο κουμπί του ποντικιού μέσα στο πλέγμα και επιλέγοντας Export to Excel (Εξαγωγή σε Excel). Διασφαλίστε ότι έχουν επιλεγεί όλα τα δείγματα πριν από την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Στο ABI τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό 7500 Fast System Software έκδοσης 1.4.1 (ή νεότερης) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Απαιτούνται οι παρακάτω παράμετροι για τη διατήρηση της συνέπειας ανάμεσα στις διαφορετικές αναλύσεις (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Παράμετροι ανάλυσης του ABI 7500 Fast Dx

Κανάλια	FAM*	VIC/HEX*	Cy5/Atto*
Παθητική χρωστική	ROX	ROX	ROX
Τιμή κατωφλίου φθορισμού	0,13	0,05	0,025
Ρύθμιση γραμμής βάσης	Αυτόματα	Αυτόματα	Αυτόματα
Κύκλοι αποκοπής	Τιμή Ct >39,00 εκλαμβάνομενη ως 40,00	Όχι	Τιμή Ct >35,00 εκλαμβάνομενη ως 40,00

* FAM = φίλτρο A/1 στην πλατφόρμα ABI, VIC/HEX = φίλτρο B/2 στην πλατφόρμα ABI, Cy5/Atto = φίλτρο E/5 στην πλατφόρμα ABI

Στο λογισμικό SDS του ABI οι τιμές Ct μιας επιλεγμένης ομάδας βυθισμάτων ή ολόκληρης της πλάκας διατίθενται στο φύλλο **Report** (Αναφορά) της κύριας ενότητας **Results** (Αποτελέσματα). Τα δεδομένα μπορούν να εξαχθούν σε αρχείο τιμών διαχωρισμένων με κόμματα (μορφής .csv) (συνιστάται): 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.

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).

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). Κάθε κλινικό δείγμα θα πρέπει να εμφανίζει ενίσχυση μάρτυρα δειγματοληψίας. Στο PC μπορεί είναι ορατή μια κίτρινη ενίσχυση παρά την απουσία ανθρώπινων αλληλουχιών. Σε αυτήν την περίπτωση, το σήμα στο κίτρινο κανάλι του PC μπορεί να αγνοηθεί επειδή ενδέχεται το ισχυρό σήμα φθορισμού του πράσινου καναλιού να διαρρέει στο κίτρινο κανάλι.

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/Atto στο όργανο ABI).

Για την επικύρωση των εκτελέσεων RT-PCR οι μάρτυρες PC, NTC και NEC πρέπει να έχουν ενισχυθεί και ανιχνευθεί σύμφωνα με τα προβλεπόμενα.

Πίνακας 10. 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 (PC)	Ct ≤ 38,00	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Η εκτέλεση επικυρώνεται.
	Ct >38,00 ή χωρίς Ct	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Η εκτέλεση δεν επικυρώνεται.
Μάρτυρας χωρίς μήτρα (NTC) ή Μάρτυρας χωρίς εκχύλιση (NEC)	Ct >38,00 ή χωρίς Ct	Ct >35,00 ή χωρίς Ct	Ναι	Η εκτέλεση επικυρώνεται.
	Τυχόν άλλοι συνδυασμοί με ενίσχυση στο Green ή το Yellow		Αδιαφοροποίητη	Η εκτέλεση δεν επικυρώνεται.

Πίνακας 11. Κριτήρια επικύρωσης εκτελέσεων και ερμηνεία αποτελεσμάτων στο ABI 7500 Fast Dx

Μάρτυρας	Ανίχνευση σε χρωστική FAM*	Ανίχνευση σε χρωστική VIC/HEX*	Ανίχνευση σε χρωστική Cy5/Atto*	Ερμηνεία
Θετικός μάρτυρας (PC)	Ct ≤39,00	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Η εκτέλεση επικυρώνεται.
	Ct >39,00 ή χωρίς Ct	Αδιαφοροποίητη	Αδιαφοροποίητη	Η εκτέλεση δεν επικυρώνεται.
Μάρτυρας χωρίς μήτρα (NTC) ή	Ct >39,00 ή χωρίς Ct	Ct >35,00 ή χωρίς Ct	Ναι	Η εκτέλεση επικυρώνεται.
Μάρτυρας χωρίς εκχύλιση (NEC)	Τυχόν άλλοι συνδυασμοί με ενίσχυση στο FAM ή το VIC/HEX		Αδιαφοροποίητη	Η εκτέλεση δεν επικυρώνεται.

* FAM = φίλτρο A/1 στην πλατφόρμα ABI, VIC/HEX = φίλτρο B/2 στην πλατφόρμα ABI, Cy5/Atto = φίλτρο E/5 στην πλατφόρμα ABI

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

Πίνακας 12. 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 RT-qPCR. Απαιτείται επανεξέταση.

Πίνακας 13. Κριτήρια επικύρωσης δειγμάτων και ερμηνεία αποτελεσμάτων στο ABI 7500 Fast Dx

Ανίχνευση σε χρωστική FAM*	Ανίχνευση σε χρωστική VIC/HEX*	Ανίχνευση σε χρωστική Cy5/Atto*	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 RT-qPCR. Απαιτείται επανεξέταση.

* FAM = φίλτρο A/1 στην πλατφόρμα ABI, VIC/HEX = φίλτρο B/2 στην πλατφόρμα ABI, Cy5/Atto = φίλτρο E/5 στην πλατφόρμα ABI

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 qPCR (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx ή ABI 7500 Fast Dx) είναι απολύτως απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων PCR.
- Πρέπει να δίδεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε ληγμένα συστατικά.

Απόδοση

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 παρασκευασμένων με αποθέματα υψηλού τίτλου αδραντοποιημένων σωματιδίων του ιού που είχαν ληφθεί από προμηθευτές του εμπορίου (ZepetoMetrix®). 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 επιβεβαιώθηκε και στις δύο αναφερόμενες πλατφόρμες real-time PCR με χρήση δύο διαφορετικών παρτίδων αντιδραστηρίων.

Το αναφερόμενο όριο ανίχνευσης και για τις δύο πλατφόρμες real-time PCR για το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit είναι 950 cp/ml.

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 (Single Nucleotide Variations, 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 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*.

Πίνακας 14. Κατάλογος των *in silico* εξεταζόμενων παθογόνων.

Παθογόνα	Στέλεχος/Τύπος	Αναγνωριστικό ταξινομίας	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 14 (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 μεταπνευμονοϊός	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 στείλεου 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. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν με ενοφθαλμισμό το ανώτατο 5 παθογόνων - σε 10^5 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 στείλεου ενοφθαλμισμένα σε $2,87 \times \text{LoD}$ με αδρανοποιημένα σωματίδια SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix). Τα NATrol™ Panels και το παθογόνο SARS-CoV-1 ενοφθαλμίστηκαν απευθείας με αδρανοποιημένα σωματίδια του ιού SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) σε $2,87 \times \text{LoD}$. Παρακάτω συνοψίζονται τα αποτελέσματα για κάθε δεξαμενή εξεταζόμενου μικροοργανισμού με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 15. Κατάλογος των *in vitro* εξεταζόμενων παθογόνων σε μικροβιακή παρεμβολή.

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

(Συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

Πίνακας 15 (Συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

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

(Συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

Πίνακας 15 (Συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

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

* Η συγκέντρωση δεν έχει ανακοινωθεί από τον προμηθευτή.

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Η επίδραση των θεωρούμενων παρεμβαλλόμενων ουσιών (ουσίες που περιλαμβάνονται στον Πίνακα 16) έχει αξιολογηθεί στην απόδοση του *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*. Διενεργήθηκαν δοκιμασίες σε 3 δεξαμενές αρνητικών επιχρισμάτων ρινοφαρυγγικού σπειλεού και 3 δεξαμενές θετικών επιχρισμάτων ρινοφαρυγγικού σπειλεού ενοφθαλμισμένων σε 4 x LoD με αδραντοποιημένα 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 στο πράσινο και το κόκκινο κανάλι φθορισμού 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 16 δείχνει ότι καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες δεν παρεμβάλλεται στην απόδοση του *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* στο πράσινο κανάλι φθορισμού.

Πίνακας 16. Κατάλογος παρεμβαλλόμενων ουσιών.

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

(Συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα)

Πίνακας 16. (Συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα)

Παρεμβαλλόμενες ουσίες	Λειτουργία	Συγκέντρωση δοκιμασίας	Αποτελέσματα σε αρνητικά ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα	Αποτελέσματα σε θετικά ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα (4x LoD)
Οξυμεταζολίνη	Ρινικό εκνέφωμα	10% (v/v)	Καμία παρεμβολή (0/15)	Καμία παρεμβολή (0/15)
Οσελταμιβίρη	Αντιικό φάρμακο	3,3 mg/ml	Καμία παρεμβολή (0/15)	Καμία παρεμβολή (0/15)
Βλεννίνη (βόεια υπογνάθιου αδένου τύπου I-S)		2,5 mg/ml	Καμία παρεμβολή (0/15)	Καμία παρεμβολή (0/15)
Ολικό αίμα		4% (v/v)	Καμία παρεμβολή (1/15*)	Καμία παρεμβολή (0/15)

* Ανιχνεύτηκε ενίσχυση που αντιστοιχεί σε πλασματικό εύρημα.

Ακρίβεια

Η μελέτη ακρίβειας αξιολόγησε την αναπαραγωγιμότητα (το ίδιο δείγμα επαναλαμβάνεται σε διαφορετικές εκτελέσεις και συνθήκες: 5 ημέρες, 3 παρτίδες kit, 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 αραιώσης 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 στο πράσινο, κίτρινο και κόκκινο κανάλι. Ο Πίνακας 17 καταδεικνύει ότι το *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit έχει συνολική ακρίβεια 0,63 SD (2,03% CV) στο πράσινο κανάλι, 0,54 SD (2,22% CV) στο κίτρινο κανάλι και 1,28 SD (4,10% CV) στο κόκκινο κανάλι.

Πίνακας 17. 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
Τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) (Συντελεστής μεταβλητότητας (% Coefficient of Variation, CV))							
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)	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
Ενοφθαλμισμένα 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)
Ενοφθαλμισμένα 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)
Ενοφθαλμισμένα 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

Η κλινική απόδοση του προσδιορισμού *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας αναδρομικά δοκίμια σε ρινοφαρυγγικό στείλειο σε μέσο μεταφοράς αποτελούμενα από:

- 98 αρνητικά δοκίμια ως προς το RNA του SARS-CoV-2
- 52 θετικά δοκίμια ως προς το RNA του SARS-CoV-2

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

Η κλινική επικύρωση διενεργήθηκε σε ABI 7500 Fast Dx. Ο Πίνακας 18 περιλαμβάνει 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 18. Κλινική απόδοση του *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* ως προς μια μέθοδο αναφοράς

Τύπος δείγματος	Αριθ.	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	52	98,1 (51/52)	89,9 – 99,7	5,1 (5/98)	
Αρνητικό	98	1,9 (1/52)		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 τα παρουσιάζει ο Πίνακας 19.

Πίνακας 19. Κλινική απόδοση του *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Τύπος δείγματος	Αριθ.	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	52	98,1 (51/52)	89,9 – 99,7	5,1 (5/98)	
Αρνητικό	98	1,9 (1/52)		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 %): $51/52 = 98,1\%$ (95% ΔΕ: 89,9% - 99,7%)

Αρνητική ποσοστιαία συμφωνία

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

Κλινική απόδοση συμπεριλαμβανομένων ασυμπτωματικών ατόμων

Η κλινική απόδοση του προσδιορισμού *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας αναδρομικά δοκίμια σε ρινοφαρυγγικό στείλειό σε μέσο μεταφοράς αποτελούμενα από:

- 100 αρνητικά δοκίμια ως προς το RNA του SARS-CoV-2
- 53 θετικά δοκίμια ως προς το RNA του SARS-CoV-2

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 13).

Ο Πίνακας 20 περιλαμβάνει 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 20. Κλινική απόδοση του *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ως προς μια μέθοδο αναφοράς

Τύπος δείγματος	Αριθ.	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	50	64,0 (32/50)	50,1 – 75,9	1,15 (1/87)	–
Αρνητικό	87	36,0 (18/50)	–	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 τα παρουσιάζει ο Πίνακας 21.

Πίνακας 21. Κλινική απόδοση του *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Τύπος δείγματος	Αριθ.	% θετικών	ΔΕ 95%	% αρνητικών	ΔΕ 95%
Θετικό	32	100,0 (32/32)	89,3 – 100,0	0,95 (1/105)	–
Αρνητικό	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%)

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 προκύπτουν. 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 πράσινου καναλιού (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 (πράσινο) για την ανάλυση RT-PCR των στόχων SARS-CoV-2, το κανάλι φθορισμού HEX/VIC/JOE (κίτρινο) για τον μάρτυρα δειγματοληψίας και το Cy5/Atto (κόκκινο) 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 qPCR κατά τη διαμόρφωση δεδομένων. | Εφαρμόστε τις συνιστώμενες ρυθμίσεις που αφορούν την πλατφόρμα qPCR 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

Πρόκειτο μόνωση 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 κόκκινου καναλιού (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 απολυμάνονται 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 απολυμάνονται 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 qPCR κατά τη διαμόρφωση δεδομένων.
- Εφαρμόστε τις συνιστώμενες ρυθμίσεις που αφορούν την πλατφόρμα qPCR που χρησιμοποιείτε και που περιγράφονται στο παρόν εγχειρίδιο.

Ασθενές σήμα ή απουσία σήματος κίτρινου καναλιού (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 αποθήκευσης, 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 στείλο 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 qPCR κατά τη διαμόρφωση δεδομένων.
- Εφαρμόστε τις ρυθμίσεις που αφορούν την πλατφόρμα qPCR 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
	Η ένδειξη R αφορά την αναθεώρηση των οδηγιών χρήσης και η είναι ο αριθμός αναθεώρησης
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	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
Loading Block	Σωληνάρια 72 x 0,1 ml	9018901

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, βλ. το αντίστοιχο εγχειρίδιο kit ή εγχειρίδιο χρήστη της QIAGEN. Οι οδηγίες και τα εγχειρίδια χρήστη των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον αντιπρόσωπο της περιοχής σας.

Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Αναθεώρηση	Περιγραφή
R1, Απρίλιος 2021	Αρχική κυκλοφορία.
R2, Ιούλιος 2021	<p>Επέκταση αξίωσης: Η δοκιμασία έχει προσδιοριστεί για ασυμπτωματικά άτομα. Η ενότητα «Προβλεπόμενη χρήση» επικαιροποιήθηκε ώστε να περιλαμβάνει άτομα χωρίς συμπτώματα και χωρίς άλλη αιτία που οδηγεί σε υποψία λοίμωξης με την νόσο COVID-19. Η ενότητα «Κλινική απόδοση συμπεριλαμβανομένων ασυμπτωματικών ατόμων» προστέθηκε στα δεδομένα της ενότητας «Απόδοση».</p> <p>Αφαιρέθηκε η πρόταση «Η απόδοση της δοκιμασίας δεν έχει προσδιοριστεί για ασθενείς χωρίς σημεία και συμπτώματα λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος» από την ενότητα «Περιορισμοί».</p> <p>Μικρές αλλαγές στο συντακτικό και τη μορφοποίηση.</p>

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:

- 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 παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από τη QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
- 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.
- Αυτό το σετ και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η επανεπεξεργασία, η ανακτασκειμή ή η μεταπώλησή τους.
- Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
- 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*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group), ATCC® (American Type Culture Collection), Clinical and Laboratory Standards Institute®, QLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc), ZepToMetrix®, NATrol™ (Cole-Parmer), Excel® (Microsoft Corporation), ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific ή οι θυγατρικές της). Οι κατατεθείσες 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.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

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