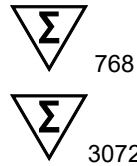


Lipiec 2021 r.

# artus<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)



Wersja 1



Do diagnostyki in vitro

Do użytku z aparatami Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM i ABI<sup>®</sup> 7500  
Fast Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R2

# Spis treści

Przeznaczenie.....	4
Opis i zasada procedury.....	5
Informacje o patogenie.....	5
Podsumowanie i objaśnienie.....	6
Dostarczone materiały.....	9
Zawartość zestawu .....	9
Składniki zestawu.....	10
Platformy i oprogramowanie.....	11
Materiały wymagane, ale niedostarczone.....	12
Materiały eksploatacyjne.....	12
Wyposażenie.....	12
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	13
Informacje dotyczące bezpieczeństwa.....	13
Środki ostrożności.....	14
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami.....	15
Przechowywanie, transport i sposób postępowania z próbkami.....	15
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek.....	15
Protokół: przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie RGQ MDx 5plex HRM.....	16
Protokół: przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie ABI 7500 Fast Dx.....	22
Wyniki.....	27

---

Interpretacja wyników .....	29
Ograniczenia .....	32
Skuteczność .....	33
Czułość analityczna (granica wykrywalności).....	33
Badania swoistości analitycznej (testy różnicowania i wykluczenia/reaktywność krzyżowa) .....	33
Substancje zakłócające.....	40
Precyzja .....	41
Skuteczność kliniczna .....	42
Literatura .....	46
Rozwiązywanie problemów .....	47
Symbole .....	49
Informacje kontaktowe.....	50
Dane do zamówień.....	51
Historia zmian dokumentu .....	52

---

# Przeznaczenie

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit to test real-time RT-PCR przeznaczony do jakościowej detekcji kwasów nukleinowych wirusa SARS-CoV-2 w wymazach z nosogardzieli (Nasopharyngeal Swab, NPS), wymazach z nosa i wymazach z ustnej części gardła pobranych od osób z przedmiotowymi i podmiotowymi objawami zakażenia, osób bezobjawowych lub osób z podejrzeniem zakażenia wirusem wywołującym chorobę COVID-19.

Zestaw jest przeznaczony do stosowania pomocniczo podczas ustalania rozpoznania choroby COVID-19 w ostrej fazie zakażenia. Wyniki uzyskane za pomocą zestawu należy analizować w kontekście obserwacji klinicznych, historii choroby pacjenta oraz danych epidemiologicznych.

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest przeznaczony do użycia w laboratoriach biologii molekularnej przez wykwalifikowanych pracowników, takich jak członkowie personelu laboratorium klinicznego przeszkoleni w zakresie techniki real-time PCR i procedur diagnostyki *in vitro*.

Wyniki negatywne nie wykluczają zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie mogą być traktowane jako wyłączna podstawa do podejmowania decyzji dotyczących leczenia pacjenta.

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest przeznaczony do użytku z systemami Rotor-Gene Q (RGQ) MDx System i ABI 7500 Fast Dx umożliwiającymi wykonanie reakcji real-time PCR.

# Opis i zasada procedury

## Informacje o patogenie

Koronawirusy, rodzaj wirusów z rodziny *Coronaviridae*, to duże, otoczkowe wirusy o genomie w postaci RNA o polarności dodatniej, które wywołują wysoce zjadliwe choroby u ludzi i zwierząt domowych (1). Koronawirusy zakażające ludzi odpowiadają za jedną trzecią przeziębień. Są również znanym czynnikiem wywołującym szpitalne zakażenia górnych dróg oddechowych u wcześniaków (2).

Nowy członek rodziny koronawirusów był przyczyną wybuchu epidemii choroby układu oddechowego w mieście Wuhan w Chinach (1, 3). Nazwany początkowo nowym koronawirusem (2019-nCoV), wirus SARS-CoV-2 różni się od wirusa SARS-CoV (1, 3) odpowiedzialnego za epidemię w 2003 r. oraz od wirusa MERS-CoV, który rozprzestrzenił się na Bliskim Wschodzie od roku 2012. Wirus SARS-CoV-2 jest czynnikiem chorobotwórczym wywołującym chorobę COVID-19. RNA wirusa SARS-CoV-2 jest wykrywalny w różnych próbkach pobranych z górnych dróg oddechowych (wymazach z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli) we wczesnych i ostrych fazach zakażenia (3).

Wyniki oznaczeń opartych na reakcji RT-PCR, w połączeniu z historią choroby pacjenta oraz danymi epidemiologicznymi dotyczącymi wirusa SARS-CoV-2, stały się złotym standardem w diagnostyce zakażeń wirusem SARS-CoV-2. Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) zaproponowało połączenie oznaczeń opartych na reakcji RT-PCR z oznaczeniami immunologicznymi w celu monitorowania statusu zakażenia oraz oceny skuteczności środków ograniczających podjętych w celu opanowania ogniska choroby (4, 5).

Oznaczenie SARS-CoV-2 Prep&Amp UM jest ukierunkowane na 2 geny wirusowe (geny N1 i N2). Oba geny są wykrywane w tym samym kanale fluorescencyjnym. Te dwa docelowe geny nie są rozróżniane, a amplifikacja jednego lub obu genów prowadzi do wygenerowania sygnału fluorescencyjnego. Wyniki pozytywne wskazują na obecność wirusa SARS-CoV-2, ale nie wykluczają koinfekcji innymi patogenami. Negatywne wyniki reakcji RT-PCR nie wykluczają jednak zakażenia.

## Podsumowanie i objaśnienie

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest gotowym do użycia systemem umożliwiającym proste przygotowanie próbki, a następnie detekcję RNA wirusa SARS-CoV-2 w reakcji RT-PCR w systemie RGQ MDx lub na platformie ABI 7500 Fast Dx (Ryc. 1). Bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer zawiera odczynniki i enzymy przeznaczone do swoistej amplifikacji regionów w genomie RNA wirusa SARS-CoV-2 o długości 72 par zasad (pz) i 67 pz i bezpośredniej detekcji tych regionów w kanale fluorescencyjnym „Green” aparatu RGQ MDx oraz przy użyciu filtra fluorescencyjnego A/1 aparatu ABI 7500 Fast Dx.

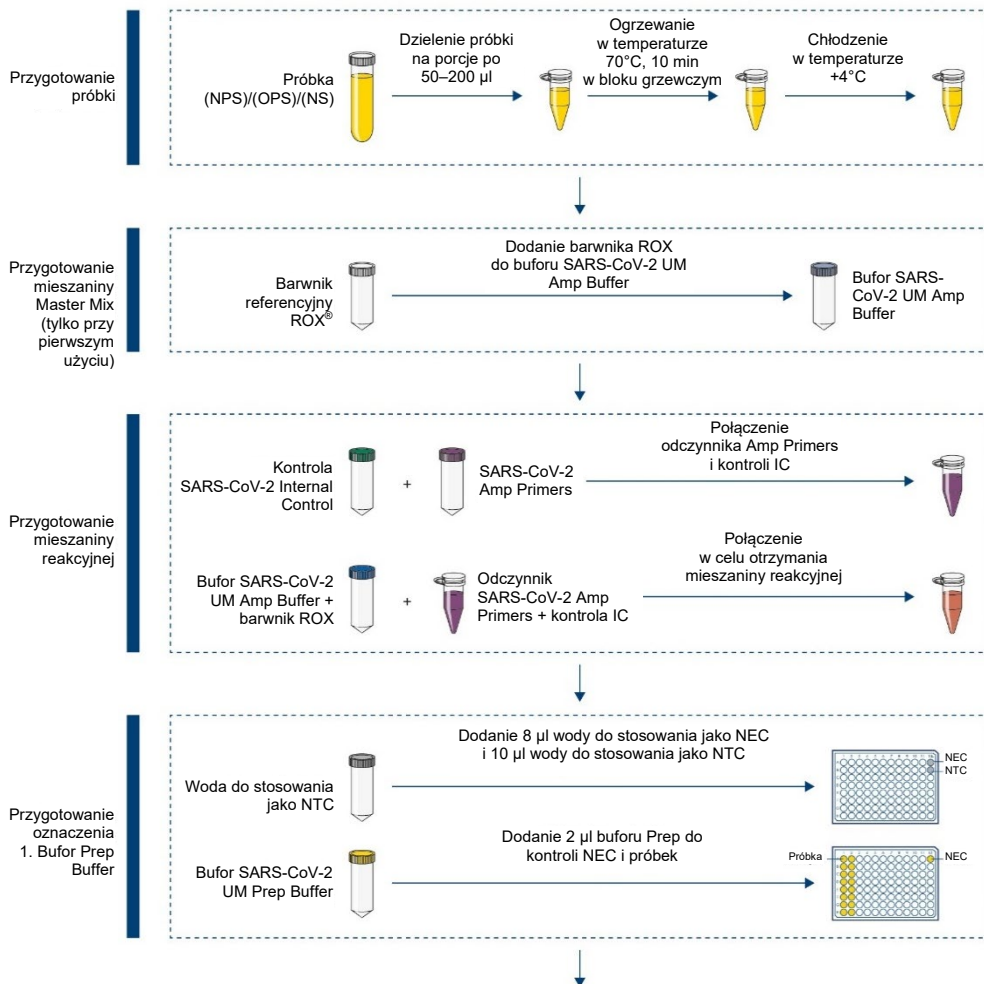
Mieszanina starterów i sond dostarczana w zestawie *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zawiera oligonukleotydy wymagane do amplifikacji genu RNazy P. Detekcja tych ampikonów w kanale fluorescencyjnym „Yellow” aparatu RGQ MDx lub przy użyciu filtra fluorescencyjnego B/2 w aparacie ABI 7500 Fast Dx potwierdza, że na wymazówce zebrano wystarczającą ilość próbki biologicznej. Kontrola ta ma kluczowe znaczenie, gdyż umożliwia potwierdzenie, że w próbkach negatywnych względem wirusa SARS-CoV-2 obecny był materiał biologiczny. Amplifikacja powinna być zawsze wykrywalna; w przeciwnym razie jakość próbki jest wątpliwa.

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zawiera również trzeci, heterologiczny system amplifikacji służący do detekcji potencjalnej inhibicji reakcji RT-PCR. Do tego celu przeznaczona jest kontrola wewnętrzna (Internal Control, IC) RNA wykrywana w kanale fluorescencyjnym „Red” aparatu RGQ MDx lub przy użyciu filtra fluorescencyjnego E/5 aparatu ABI 7500 Fast Dx. Ze względu na to, że kontrola IC jest zawarta w mieszaninie SARS-CoV-2 Amp Primers, amplifikacja tej kontroli powinna zachodzić ze stałą wydajnością, o ile w próbce lub podczas reakcji RT-PCR nie jest obecny inhibitor reakcji RT-PCR, który opóźnia lub uniemożliwia zajście amplifikacji.

Zewnętrzna kontrola pozytywna i negatywna (odpowiednio kontrola SARS-CoV-2 Positive Control i woda niezawierająca nukleaz używana jako NTC) są dostarczane w zestawie *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w celu potwierdzenia skuteczności etapu reakcji PCR. Zdecydowanie zalecane jest wykonywanie kontroli bez izolacji (bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer używany jako NEC) w celu zweryfikowania braku obecności inhibitorów reakcji RT-PCR w buforze do przygotowania.

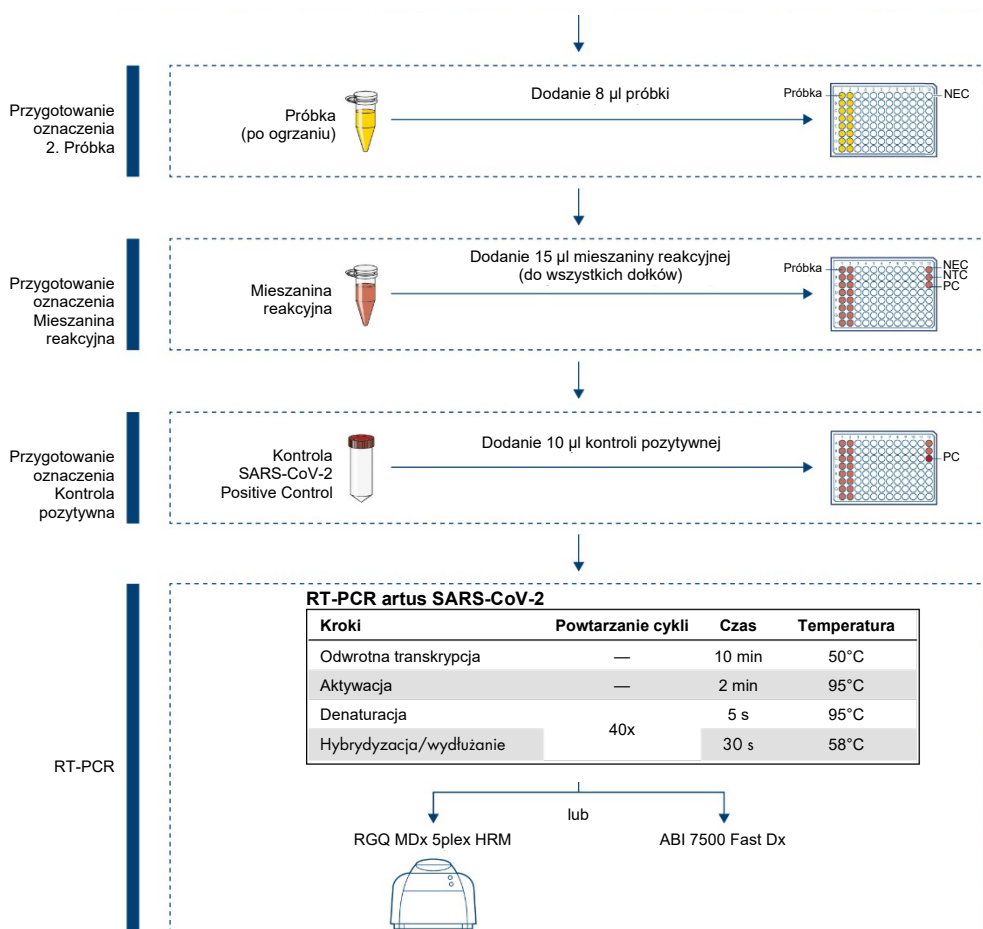
Wydajność etapów odwrotnej transkrypcji i reakcji PCR jest monitorowana przez te kontrole.

## Przebieg oznaczenia wykonywanego za pomocą zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



**(ciąg dalszy na następnej stronie)**

(ciąg dalszy z poprzedniej strony)



Ryc. 1 Przebieg oznaczenia wykonywanego za pomocą zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*



# Dostarczone materiały

## Zawartość zestawu

<b>artus SARS-CoV-2 Prep&amp;Amp UM Kit</b>					
<b>Nr katalogowy</b>			<b>4511460</b>	<b>4511469</b>	
<b>Liczba reakcji</b>			<b>768</b>	<b>3072</b>	
<b>Kolor próbki</b>	<b>Kolor wieczka</b>	<b>Oznaczenie</b>	<b>Id. próbki</b>	<b>Objętość (µl)</b>	<b>Objętość (µl)</b>
Przezroczysty	<b>Żółty</b>	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	<b>Preparation Buffer (Bufor do przygotowania)</b>	2 x 930	8 x 930
Przezroczysty	<b>Niebieski</b>	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	<b>Master Mix (Mieszanina Master Mix)</b>	4 x 1440	16 x 1440
Przezroczysty	<b>Fioletowy</b>	SARS-CoV-2 Amp Primers	<b>Primers and Probes (Startery i sondy)</b>	4 x 1680	16 x 1680
Przezroczysty	<b>Zielony</b>	SARS-CoV-2 Internal Control	<b>Internal Control (Kontrola wewnętrzna) (IC)</b>	1 x 1390	4 x 1390
Przezroczysty	<b>Czerwony</b>	SARS-CoV-2 Positive Control	<b>Positive Control (Kontrola pozytywna)</b>	1 x 220	4 x 220
Przezroczysty	<b>Przezroczysty</b>	Water for NTC (Woda do stosowania jako NTC)	<b>Water (Woda, NTC)</b>	1 x 1900	4 x 1900
Przezroczysty	<b>Przezroczysty</b>	ROX Reference Dye (Barwnik referencyjny ROX)	<b>ROX Dye (Barwnik ROX)</b>	1 x 210	4 x 210

---

## Składniki zestawu

### Odczynniki

Objętości odczynników w każdej próbówce zoptymalizowano dla 8 partii zawierających po 96 próbek (w przypadku zestawu na 768 reakcji) lub dla 32 partii po 96 reakcji (w przypadku zestawu na 3072 reakcje), w tym kontrolę pozytywną (Positive Control, PC), kontrolę bez matrycy (No Template Control, NTC) i kontrolę bez izolacji (No Extraction Control, NEC).

Można przeprowadzić analizę większej lub mniejszej liczby próbek, jednak w takim przypadku zużycie odczynników nie będzie optymalne. Zalecane jest unikanie wielu cykli zamrażania–rozmarzania. W celu uniknięcia wielu cykli zamrażania–rozmarzania można podzielić odczynniki na porcje.

### Startery i sondy

Startery i sondy ukierunkowane na sekwencje wirusa SARS-CoV-2 opracowano na podstawie starterów i sond zaprojektowanych przez amerykańskie Centra Kontroli i Prewencji Chorób (Centers for Disease Control and Prevention, CDC).

### Kontrole i kalibratory

Oznaczenie zawiera 5 kontrolei przeznaczonych do monitorowania wydajności reakcji RT-PCR.

Kontrola wewnętrzna (Internal Control, IC): Kontrola wewnętrzna to jednoniciowy RNA otrzymany w wyniku transkrypcji *in vitro* (IVT), który służy do wykrycia obecności zanieczyszczeń, które mogą prowadzić do inhibicji odwrotnej transkrypcji. Kontrola wewnętrzna monitoruje również wydajność odwrotnej transkrypcji w kontroli bez matrycy (No Template Control, NTC) i kontroli bez izolacji (No Extraction Control, NEC).

Kontrola bez matrycy (No Template Control, NTC): Kontrola bez matrycy zawiera wodę wolną od nukleaz. Kontrolę tę dodaje się na płytkę PCR w celu wykrycia zanieczyszczeń, które mogły zostać wprowadzone podczas przygotowywania płytki i mogą doprowadzić do błędnej interpretacji wyników otrzymanych dla sekwencji docelowych wirusa SARS-CoV-2.

---

Kontrola pozytywna (Positive Control, PC): Kontrola pozytywna to dwuniciowy DNA, który ulega amplifikacji pod wpływem mieszaniny SARS-CoV-2 Primers and Probes (mieszanina P&P). Wykrycie tej kontroli potwierdza prawidłowe działanie odczynnika używanego na etapie amplifikacji w reakcji PCR.

Kontrola bez izolacji (No Extraction Control, NEC): Kontrola bez izolacji zawiera bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Kontrola ta jest przetwarzana równolegle z próbkami klinicznymi w celu wykrycia zanieczyszczeń, które mogły zostać wprowadzone podczas przygotowywania próbki i mogą doprowadzić do błędnej interpretacji wyników otrzymanych dla sekwencji docelowych wirusa SARS-CoV-2.

Kontrola przygotowania próbki: Kontrola przygotowania próbki wykrywa gen RNazy P i ma kluczowe znaczenie, gdyż umożliwia potwierdzenie, że w próbkach negatywnych względem wirusa SARS-CoV-2 obecny był materiał biologiczny. Amplifikacja kontroli przygotowania próbki powinna być zawsze wykrywalna; w przeciwnym razie jakość próbki jest wątpliwa.

## Platformy i oprogramowanie

Przed użyciem upewnić się, że aparaty zostały poddane konserwacji i kalibracji zgodnie z zaleceniami producenta. Tego zestawu można używać w dwóch procedurach — w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM lub w aparacie ABI 7500 Fast Dx, w połączeniu z odpowiednim oprogramowaniem:

- aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: oprogramowanie Rotor-Gene Q w wersji 2.3.1 lub wyższej;
- aparat ABI 7500 Fast Dx: oprogramowanie SDS w wersji 1.4.1 lub wyższej.

# Materiały wymagane, ale niedostarczone

## Materiały eksploatacyjne

- Rękawiczki jednorazowe bezpudrowe
- Jałowe końcówki do pipet, wolne od nukleaz, z filtrami
- Probówki wolne od produktów PCR, pojemność 1,5 ml lub 2 ml
- Probówki PCR o pojemności 0,1 ml do użytku z aparatem Rotor-Gene® Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, nr kat. 981103)
- 96-dołkowa płytka MicroAmp™ przeznaczona do użytku z platformą ABI 7500 Fast Dx qPCR (Applied Biosystems 96-well plate, nr kat. N8010560)
- Folia MicroAmp Optical Adhesive Film przeznaczona do użytku z platformą ABI 7500 Fast Dx qPCR (Applied Biosystems, nr kat. 4360954)

## Wyposażenie\*

- Wirówka laboratoryjna z rotorem dla probówek reakcyjnych o pojemności 2 ml
- Pipety (z regulacją)
- Wyrząsarka
- Blok grzewczy
- Aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (nr kat. 9002032) z oprogramowaniem Rotor-Gene Q w wersji 2.3.1 lub wyższej
- Rotor-Disc 72 Rotor (nr kat. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (nr kat. 9018900)
- 72-dołkowy blok ładowania (QIAGEN Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, nr kat. 9018901)
- Zamiennie: Platforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (Thermo Fisher Scientific®, nr kat. 4406985) z oprogramowaniem w wersji 1.4.1 lub wyższej i wirówka na 96-dołkowe płytki

\* Przed użyciem oraz w stosownych przypadkach upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.

# Ostrzeżenia i środki ostrożności

Należy pamiętać, że może być wymagane zapoznanie się z lokalnymi przepisami dotyczącymi zgłaszania poważnych incydentów, które wystąpiły w związku z wyrobem, producentowi oraz właściwemu organowi państwa, w którym przebywa użytkownik i/lub pacjent.

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

Zawsze należy stosować odpowiednie środki ochrony indywidualnej, obejmujące między innymi bezpudrowe rękawiczki jednorazowego użytku, fartuch laboratoryjny oraz okulary ochronne. Chronić skórę, oczy i błony śluzowe. Podczas pracy z próbkami należy często zmieniać rękawiczki.

Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny. Zawsze należy przestrzegać środków ostrożności opisanych w odpowiednich wytycznych, na przykład w wytycznych *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guideline M29* wydanych przez instytut Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) lub w innych odpowiednich dokumentach.

Próbki są potencjalnie zakaźne. Pozostałości próbek i odczynników używanych do oznaczenia należy utylizować zgodnie z lokalnymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

---

## Środki ostrożności

- Przestrzegać standardowych procedur laboratoryjnych w zakresie utrzymania czystości i zapobiegania skażeniom obszaru roboczego. Wyznaczyć obszar ze sprzętem przeznaczonym wyłącznie do pracy z RNA.
- Przestrzegać dobrych praktyk laboratoryjnych, aby zminimalizować zanieczyszczenie krzyżowe.
- Zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia próbek RNazą podczas eksperymentu. Używać sprzętów z tworzywa sztucznego wolnych od RNaz.
- Zapewnić dobrą identyfikowalność z zapisami; dotyczy to zwłaszcza identyfikacji próbek.

---

# Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Należy zwrócić uwagę na terminy ważności oraz informacje o warunkach przechowywania wydrukowane na opakowaniach i etykietach wszystkich składników. Nie należy używać składników z przekroczonym terminem ważności ani niewłaściwie przechowywanych.

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit może być przechowywany w temperaturze od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  przez 6 miesięcy lub do podanej daty ważności.

## Przechowywanie, transport i sposób postępowania z próbkami

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest przeznaczony do użytku z wymazami z nosogardzieli, nosa i ustnej części gardła. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.

Centra Kontroli i Prewencji Chorób (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) oraz agencja Public Health England opracowały wytyczne dotyczące pobierania próbek, postępowania z próbkami oraz wykonywania testów na próbkach klinicznych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z tymi wytycznymi lub innymi stosownymi protokołami opracowanymi przez krajowe laboratorium referencyjne.

### Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

W celu uzyskania informacji na temat pobierania, przechowywania i transportu wymazów należy zapoznać się z zaleceniami producenta wyrobu do pobierania próbki. Wymazówki muszą być całkowicie zanurzone w podłożu transportowym, aby zachować integralność próbki.

# Protokół: przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie RGQ MDx 5plex HRM

Ten protokół określa sposób przygotowania próbki i reakcji RT-PCR w celu detekcji docelowych sekwencji wirusa SARS-CoV-2 w ludzkich wymazach z nosa, nosogardzieli lub ustnej części gardła przechowywanych w podłożu transportowym przy użyciu aparatu RGQ MDx 5plex HRM.

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że nie upłynęły terminy ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu, oraz że przestrzegane są warunki przechowywania. Nie należy używać składników z przekroczonym terminem ważności ani niewłaściwie przechowywanych.
- Używać skalibrowanego sprzętu konserwowanego zgodnie z harmonogramem.
- Zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia próbek RNazami podczas eksperymentu. Używać sprzętów z tworzywa sztucznego wolnych od nukleaz.

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Podczas kroków przygotowania próbek i reakcji próbki można przechowywać w temperaturze pokojowej; zalecane jest jednak trzymanie próbek na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym.
- Przed użyciem pozostawić odczynniki SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, SARS-CoV-2 Positive Control i wodę do stosowania jako NTC do całkowitego rozmrożenia w temperaturze pokojowej (15–25°C). Przed użyciem przechowywać próbki w temperaturze pokojowej i chronić je przed światłem.
- Przed użyciem buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer oraz buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer należy każdy z nich wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy (nie wytrząsać), a następnie krótko je odwirować. W przypadku pozostałych odczynników jednorodną mieszaninę można otrzymać poprzez ich pulsacyjne wytrząsanie przez 3–5 sekund, lub poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy, a następnie ich krótkie odwirowanie.



- Bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer powoduje inhibicję RNaz obecnych w próbkach klinicznych na czas etapu detekcji; nie jest to jednak roztwór inaktywujący wirusa. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.
- Upewnić się, że w platformie do reakcji qPCR określono takie warunki wykonywania cykli, jak podane w tym protokole.
- W celu uniknięcia wielu cykli zamrażania–rozmrężania można podzielić odczynniki na porcje.
- Przygotować świeżą mieszaninę reakcyjną (<2 godz. przed rozpoczęciem reakcji RT-PCR na płytce).
- W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia próbkę i reakcję RT-PCR należy przygotowywać w odrębnych strefach.

## Procedura

### 1. Przygotowanie próbki

- 1a. Energicznie wytrząsać wymazówkę zawierającą próbkę.
- 1b. Podzielić próbkę na porcje o objętości 50–200 µl do probówek wolnych od produktów PCR o pojemności 1,5 ml.
- 1c. Przeprowadzić etap podgrzewania w bloku grzewczym w temperaturze 70°C przez 10 min. Chłodzić próbki na lodzie przez co najmniej 5 min, po czym trzymać próbki na lodzie lub w temperaturze 4°C.

### 2. Podczas pierwszego użycia zestawu uzupełnić bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer roztworem barwnika ROX Reference Dye.

- 2a. Dodać 32,8 µl barwnika ROX do 1 probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 2b. Zamknąć wieczko probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX i odwrócić probówkę 3 razy.
- 2c. Odwirować probówkę z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX, aby zebrać roztwór na dnie probówki.

### 3. W przypadku analizy pełnej płytki RGQ MDx (72 dołki) przygotować mieszaninę porcji odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control.

- 3a. Przenieść wymagane objętości odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control zgodnie z Tabelą 1 do nowej probówki wolnej od produktów PCR o pojemności 1,5 ml.

- 3b. Zamknąć wieczko i odwrócić probówkę 3 razy lub wytrząsać probówkę pulsacyjnie przez 3–5 s.
- 3c. Odwirować probówkę z odczynnikami SARS-CoV-2 Amp Primers i kontrolą IC, aby zebrać roztwór na dnie próbówki.

**Tabela 1. Przygotowanie mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli IC**

Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli IC				Liczba reakcji	Objętość (μl)
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	72 reakcje (+ nadwyżka 22%*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25		638
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopii/μl	10 kopii/μl	1,5		132
Łączna objętość mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli IC			8,75		770

\* **Uwaga:** Dobrać objętości odczynnika SARS-CoV-2 UM Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control odpowiednio do liczby badanych próbek. Uwzględnić dodatkową objętość, aby skompensować objętość martwą.

4. Przygotować mieszaninę reakcyjną zgodnie z Tabelą 2 i dokładnie ją wymieszać.

**Tabela 2. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

Mieszanina reakcyjna do reakcji RT-PCR				Liczba reakcji	Objętość (μl)
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	72 reakcje (+ nadwyżka 20%*)	
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer <sup>†</sup>	4x	1x	6,25		540
SARS-CoV-2 Amp Primers <sup>‡</sup>	2,9x	1x	8,75		756
Łączna objętość mieszaniny reakcyjnej			15,00		1296

\* **Uwaga:** Dobrać objętości buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers odpowiednio do liczby badanych próbek. Uwzględnić dodatkową objętość, aby skompensować objętość martwą.

<sup>†</sup> Bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer uzupełniony roztworem barwnika ROX Reference Dye.

<sup>‡</sup> Odczynnik SARS-CoV-2 Amp Primers uzupełniony kontrolą SARS-CoV-2 Internal Control.

5. Dodać 8 μl wody niezawierającej nukleaz do próbówki PCR przypisanej dla kontroli NEC.
6. Dodać 10 μl wody niezawierającej nukleaz do próbówki PCR przypisanej dla kontroli NTC.
7. Dodać 2 μl buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer do każdej próbówki PCR przypisanej dla kontroli NEC i przygotowanych próbek.

8. Dodać 8 µl przygotowanej próbki do próbki PCR z buforem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
9. Dodać 15 µl mieszaniny reakcyjnej przygotowanej w kroku 4 do próbek przeznaczonych na próbki i kontrole (patrz przykład na Ryc. 2). Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy, a następnie zamknąć wieczka wszystkich próbek PCR, z wyjątkiem próbki przeznaczonej na kontrolę SARS-CoV-2 Positive Control.

**Uwaga:** Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, upewnić się, że próbki są dobrze zamknięte.

10. Dodać 10 µl kontroli SARS-CoV-2 Positive Control do odpowiedniej próbki PCR. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
11. Ustawić program reakcji RT-PCR w aparacie RGQ MDx 5plex HRM zgodnie z danymi podanymi w Tabeli 3.

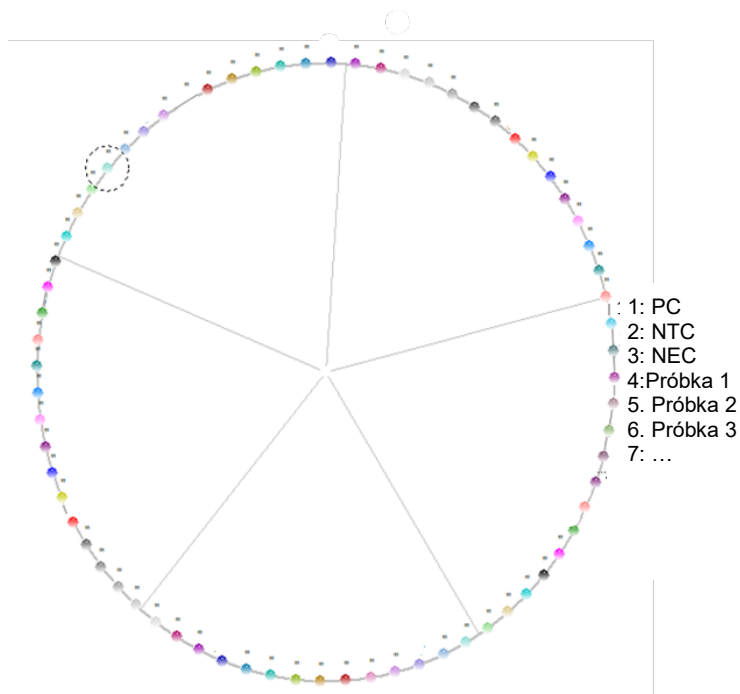
**Uwaga:** Dane powinny być rejestrowane podczas etapu hybrydyzacji/wydłużania.

12. Umieścić próbki w cyklerze do reakcji real-time (przykładowy układ próbek przedstawiono na Ryc. 2) i uruchomić program wykonywania cykli o parametrach zgodnych z opisem w Tabeli 3.

**Uwaga:** Podczas przygotowywania oznaczenia i etapów wykonywanych w cyklerze do reakcji real-time należy używać tych samych pozycji próbek oraz zwrócić uwagę na przestrzeganie kolejności próbek.

**Tabela 3. Program reakcji SARS-CoV-2 Prep&Amp UM**

Kroki	Czas	Temperatura (°C)	Liczba cykli	Rejestracja
Odwrotna transkrypcja	10 min	50	1	Nie
Początkowa aktywacja cieplna reakcji PCR	2 min	95	1	Nie
Cykl 2-etapowy				
Denaturacja	5 s	95	40	Nie Green (FAM), Yellow (HEX) i Red (Atto)
Hybrydyzacja/wydłużanie	30 s	58		



Ryc. 2. Przykładowy układ próbek w platformie RGQ MDx 5plex HRM

13. Kliknąć przycisk „**Gain optimization** (Optymalizacja wzmocnienia) w oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu), aby otworzyć okno dialogowe **Auto-gain Optimization Setup** (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego).
14. Upewnić się, że ustawiono kanały rejestracji, takie jak kanały opisane w Tabeli 4.

Tabela 4. Konfiguracja aparatu RGQ MDx 5plex HRM

Nazwa	Pozycja próbówki z kontrolą PC	Min. odczyt (FI)	Maks. odczyt (FI)	Min. wzmacnienie	Maks. wzmacnienie
Green	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

\* **Uwaga:** Tę pozycję należy zastąpić odpowiednią pozycją, na której znajduje się próbówka z kontrolą SARS-CoV-2 Positive Control.

15. Wybrać opcję **Perform optimization before the first acquisition** (Wykonaj optymalizację przed pierwszą rejestracją).
16. Rozpocząć reakcję.
17. Po zakończeniu reakcji przeanalizować wyniki (patrz sekcja Wyniki).

# Protokół: przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie ABI 7500 Fast Dx

Ten protokół określa sposób przygotowania próbki i detekcji docelowych sekwencji wirusa SARS-CoV-2 w ludzkich wymazach z nosa, nosogardzieli lub ustnej części gardła przechowywanych w podłożu transportowym przy użyciu aparatu ABI 7500 Fast Dx qPCR.

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Upewnić się, że nie upłynęły terminy ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu, oraz że przestrzegane są warunki przechowywania. Nie należy używać składników z przekroczonym terminem ważności ani niewłaściwie przechowywanych.
- Używać skalibrowanego sprzętu konserwowanego zgodnie z harmonogramem.
- Zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia próbek RNazami podczas eksperymentu. Używać sprzętów z tworzywa sztucznego wolnych od nukleaz.
- W przypadku korzystania z aparatu ABI 7500 Fast Dx przed pierwszym użyciem barwnika ROX należy go dodać do próbki z mieszaniną Master Mix.

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Podczas kroków przygotowania próbek i reakcji próbki można przechowywać w temperaturze pokojowej; zalecane jest jednak trzymanie próbek na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym.
- W przypadku korzystania z aparatu ABI 7500 Fast Dx należy używać barwnika ROX.
- **Dane należy rejestrować przy ustawieniu pasywnego barwnika (ROX).**
- Przed użyciem pozostawić odczynniki SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, SARS-CoV-2 Positive Control i wodę do stosowania jako NTC do całkowitego rozmrożenia w temperaturze pokojowej (15–25°C). Przed użyciem przechowywać próbki w temperaturze pokojowej i chronić je przed światłem.

- Przed użyciem buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer oraz buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, należy każdy z nich wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy (nie wytrząsać), a następnie krótko je odwirować. W przypadku pozostałych odczynników jednorodną mieszaninę można otrzymać poprzez ich pulsacyjne wytrząsanie przez 3–5 sekund, lub poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy, a następnie ich krótkie odwirowanie.
- Bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer powoduje inhibicję RNaz obecnych w próbkach klinicznych na czas etapu detekcji; nie jest to jednak roztwór inaktywujący wirusa. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.
- Upewnić się, że w platformie do reakcji qPCR określono takie warunki wykonywania cykli, jak podane w tym protokole.
- W celu uniknięcia wielu cykli zamrażania–rozmrzania można podzielić odczynniki na porcje.
- Przygotować świeżą mieszaninę reakcyjną (<2 godz. przed rozpoczęciem reakcji RT-PCR na płytce).
- W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia próbkę i reakcję RT-PCR należy przygotowywać w odrębnych strefach.

## Procedura

1. Przygotowanie próbki
  - 1a. Energicznie wytrząsać wymazówkę zawierającą próbkę.
  - 1b. Podzielić próbkę na porcje o objętości 50–200  $\mu$ l do probówek wolnych od produktów PCR o pojemności 1,5 ml.
  - 1c. Przeprowadzić etap podgrzewania w bloku grzewczym w temperaturze 70°C przez 10 min. Chłodzić próbki na lodzie przez co najmniej 5 min po czym trzymać próbki na lodzie lub w temperaturze 4°C.
2. Podczas pierwszego użycia zestawu uzupełnić bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer roztworem barwnika ROX Reference Dye.
  - 2a. Dodać 32,8  $\mu$ l barwnika ROX do probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 2b. Zamknąć wieczko probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX i odwrócić probówkę 3 razy.
  - 2c. Odwirować probówkę z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX, aby zebrać roztwór na dnie probówki.

3. W przypadku analizy pełnej płytki ABI 7500 Fast Dx (96 dołków) przygotować mieszaninę porcji odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control.
  - 3a. Przenieść wymaganą objętość odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control zgodnie z Tabelą 5 do nowej probówki wolnej od produktów PCR o pojemności 1,5 ml.
  - 3b. Zamknąć wieczko i odwrócić probówkę 3 razy lub wytrząsać probówkę pulsacyjnie przez 3–5 s.
  - 3c. Odwirować probówkę z odczynnikami SARS-CoV-2 Amp Primers i kontrolą IC, aby zebrać roztwór na dnie probówki.

**Tabela 5. Przygotowanie mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli IC**

Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli IC			Liczba reakcji Objętość (µl)	
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	96 reakcji (+ nadwyżka 21%*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	841
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopii/µl	10 kopii/µl	1,5	174
Łączna objętość mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli IC			8,75	1015

\* **Uwaga:** Dobrać objętości odczynnika SARS-CoV-2 UM Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control odpowiednio do liczby badanych próbek. Uwzględnić dodatkową objętość, aby skompensować objętość martwą.

4. Przygotować mieszaninę reakcyjną zgodnie z Tabelą 6 i dokładnie ją wymieszać.

**Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

Mieszanina reakcyjna do reakcji RT-PCR			Liczba reakcji Objętość (µl)	
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	96 reakcji (+ nadwyżka 20%*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer <sup>†</sup>	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers <sup>‡</sup>	2,9x	1x	8,75	1008
Łączna objętość mieszaniny reakcyjnej			15,00	1728

\* **Uwaga:** Dobrać objętość odczynnika SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers odpowiednio do liczby badanych próbek. Uwzględnić dodatkową objętość, aby skompensować objętość martwą.

<sup>†</sup> Bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer uzupełniony roztworem barwnika ROX Reference Dye.

<sup>‡</sup> Odczynnik SARS-CoV-2 Amp Primers uzupełniony kontrolą SARS-CoV-2 Internal Control.



5. Dodać 8 µl wody niezawierającej nukleaz do dołka przypisanego dla kontroli NEC.
6. Dodać 10 µl wody niezawierającej nukleaz do dołka przypisanego dla kontroli NTC.
7. Dodać 2 µl buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer do każdego dołka przypisanego dla kontroli NEC i przygotowanych próbek.
8. Dodać 8 µl przygotowanej próbki do dołka z buforem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
9. Dodać 15 µl mieszaniny reakcyjnej przygotowanej w kroku 4 do dołków przeznaczonych na próbki i kontrole (patrz przykład na Ryc. 3). Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
10. Dodać 10 µl kontroli SARS-CoV-2 Positive Control do odpowiedniego dołka. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
11. Dobrze zakleić płytkę do reakcji PCR folią, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu. Przyłożyć równomierny nacisk na całą płytkę, aby dobrze uszczelnić wszystkie pojedyncze dołki.
12. Krótко odwirować płytkę do reakcji PCR, aby zebrać płyn na dnie dołków.
13. Ustawić program reakcji RT-PCR na tryb reakcji „Standard 7500” w aparacie ABI 7500 Fast Dx zgodnie z danymi podanymi w Tabeli 7.  
**Uwaga:** Dane powinny być rejestrowane podczas etapu hybrydyzacji/wydłużania.  
**Uwaga:** Szczegółowe informacje przedstawiono w dokumencie *ABI 7500 Fast Dx — Instrukcja użycia*.
14. Umieścić płytkę w cyklerze do reakcji real-time (przykładowy układ płytki do reakcji PCR przedstawiono na Ryc. 3) i uruchomić program wykonywania cykli o parametrach zgodnych z opisem w Tabeli 7.
15. Wybrać używane dołki i zastosować barwniki reporterowe FAM, VIC i Cy5. Dane należy rejestrować przy ustawieniu **ON** (WŁ.) dla pasywnego barwnika ROX.
16. Upewnić się, że dla opcji Standard Curve (Krzywa wzorcowa) aparatu ABI 7500 Fast Dx skonfigurowano ustawienie Absolute Quantitation (Bezwzględne oznaczenie ilościowe).
17. Rozpocząć reakcję.

18. Po zakończeniu reakcji przeanalizować wyniki (patrz sekcja Wyniki).

**Tabela 7. Program reakcji SARS-CoV-2 Prep&Amp UM**

Kroki	Czas	Temperatura (°C)	Liczba cykli	Rejestracja
Odwrotna transkrypcja	10 min	50	1	Nie
Początkowa aktywacja cieplna reakcji PCR	2 min	95	1	Nie
Cykl 2-etapowy				
Denaturacja	5 s	95	40	Nie Green (FAM), Yellow (VIC) i Red (Cy5)
Hybrydyzacja/wydłużanie	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												

**Ryc. 3. Przykładowy układ płytki w aparacie ABI 7500 Fast Dx**

# Wyniki

W przypadku aparatu RGQ MDx 5plex HRM dane są analizowane przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene Q w wersji 2.3.1 (lub wyższej) zgodnie z instrukcjami producenta (Podręcznik użytkownika aparatu Rotor-Gene Q MDx, wersja 7, wrzesień 2018 r.). W celu zapewnienia spójności między różnymi analizami należy uwzględnić określone poniżej parametry analizy (Tabela 8).

**Tabela 8. Parametry analizy w przypadku aparatu RGQ MDx 5plex HRM**

Kanały	Green	Red	Yellow
Wartość progowa fluorescencji	0,03	0,03	0,03
Korekcja nachylenia	Tak	Tak	Tak
Probówka dynamiczna	Tak	Tak	Tak
Punkt wejścia w fazę wzrostu logarytmicznego	Nie	10–20	10–20
Usuwanie wartości odstających: Próg wydajności reakcji	Tak Wł. 0%	Nie	Nie
Usuwanie cykli początkowych	5	5	5
Cykle graniczne	Wartość Ct >38,00 jest uznawana za równą 40,00	Nie	Wartość Ct >35,00 jest uznawana za równą 40,00

W oprogramowaniu RGQ wyniki reakcji są dostępne w siatce wyników ilościowych otwartej podczas analizy. Dane dla wybranych próbek są zestawiane w tabeli i można je wyeksportować jako plik programu Excel®, klikając siatkę prawym przyciskiem myszy i wybierając opcję Export to Excel (Eksportuj do programu Excel). Przed wyeksportowaniem wyników upewnić się, że wybrano wszystkie próbki.

W przypadku aparatu ABI dane są analizowane przy użyciu oprogramowania 7500 Fast System Software w wersji 1.4.1 (lub wyższej) zgodnie z instrukcjami producenta. W celu zapewnienia spójności między różnymi analizami należy uwzględnić określone poniżej parametry (Tabela 9).

**Tabela 9. Parametry analizy w przypadku aparatu ABI 7500 Fast Dx**

<b>Kanały</b>	<b>FAM*</b>	<b>VIC/HEX*</b>	<b>Cy5/Atto*</b>
Barwnik pasywny	ROX	ROX	ROX
Wartość progowa fluorescencji	0,13	0,05	0,025
Ustawienie wartości początkowej	Auto	Auto	Auto
Cykle graniczne	Wartość Ct >39,00 jest uznawana za równą 40,00	Nie	Wartość Ct >35,00 jest uznawana za równą 40,00

\* FAM = filtr A/1 w platformie ABI, VIC/HEX = filtr B/2 w platformie ABI, Cy5/Atto = filtr E/5 w platformie ABI

W oprogramowaniu ABI SDS wartości Ct dla wybranej grupy dołków lub całej płytki są dostępne w arkuszu **Report** (Raport) w głównej części obszaru **Results** (Wyniki). Dane można wyeksportować w formacie .csv (wartości rozdzielane przecinkami; format zalecany): W oknie oprogramowania SDS wybrać opcje **File** (Plik) > **Export** (Eksportuj) > **Results** (Wyniki) (można również wybrać pozycję menu **Ct**). Wybrać format eksportowanego pliku jako .csv.

# Interpretacja wyników

Kontrola pozytywna (Positive Control, PC), gen N1 i gen N2 są wykrywane w kanale fluorescencyjnym Green aparatu RGQ MDx 5plex HRM (lub przy użyciu kanału fluorescencyjnego FAM w platformie ABI).

Kontrola przygotowania próbki w postaci RNazy P jest wykrywana w kanale fluorescencyjnym Yellow aparatu RGQ MDx 5plex HRM (lub przy użyciu kanału fluorescencyjnego VIC/ HEX w platformie ABI). W każdej klinicznej próbce powinien być obecny sygnał wskazujący na amplifikację kontroli przygotowania próbki. W przypadku kontroli PC amplifikacja w kanale żółtym może być obserwowana pomimo braku sekwencji ludzkich. W takim przypadku można pominąć sygnał PC w kanale żółtym ponieważ silny sygnał fluorescencyjny w kanale zielonym może „wyciekać” do kanału żółtego.

Kontrola wewnętrzna (Internal Control, IC) jest zawarta w odczynniku SARS-CoV-2 Amp Primers. Jest ona wykrywana w kontroli bez matrycy (No Template Control, NTC), kontroli bez izolacji (No Extraction Control, NEC), kontroli pozytywnej (Positive Control, PC) oraz w próbkach klinicznych w kanale fluorescencyjnym Red aparatu RGQ MDx 5plex HRM (lub przy użyciu kanału fluorescencyjnego Cy5/Atto w platformie ABI).

Aby możliwe było uznanie reakcji RT-PCR za ważną, detekcja i amplifikacja kontroli PC, NTC i NEC musi być zgodna z oczekiwaniami.

Tabela 10. Kryteria ważności reakcji i interpretacja wyników w przypadku aparatu RGQ MDx 5plex HRM

Kontrola	Detekcja w kanale Green	Detekcja w kanale Yellow	Detekcja w kanale Red	Interpretacja
<b>Kontrola pozytywna (PC)</b>	Ct ≤38,00	Obojętna	Obojętna	Reakcja jest ważna.
	Ct >38,00 lub brak wartości Ct	Obojętna	Obojętna	Reakcja jest nieważna.
<b>Kontrola bez matrycy (NTC) lub kontrola bez izolacji (NEC)</b>	Ct >38,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Tak	Reakcja jest ważna.
	Wszystkie pozostałe kombinacje z amplifikacją w kanale zielonym lub żółtym		Obojętna	Reakcja jest nieważna.

Tabela 11. Kryteria ważności reakcji i interpretacja wyników w przypadku aparatu ABI 7500 Fast Dx

Kontrola	Detekcja — barwnik FAM*	Detekcja — barwnik VIC/HEX*	Detekcja — barwnik Cy5/Atto*	Interpretacja
<b>Kontrola pozytywna (PC)</b>	Ct ≤39,00	Obojętna	Obojętna	Reakcja jest ważna.
	Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Obojętna	Obojętna	Reakcja jest nieważna.
<b>Kontrola bez matrycy (NTC) lub</b>	Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Tak	Reakcja jest ważna.
<b>Kontrola bez izolacji (NEC)</b>	Wszystkie pozostałe kombinacje z amplifikacją w kanale FAM lub VIC/HEX		Obojętna	Reakcja jest nieważna.

\* FAM = filtr A/1 w platformie ABI, VIC/HEX = filtr B/2 w platformie ABI, Cy5/Atto = filtr E/5 w platformie ABI

Aby możliwe było uznanie badanych próbek za ważne, detekcja i amplifikacja próbek musi być zgodna z oczekiwaniami.

Tabela 12. Kryteria ważności próbki i interpretacja wyników w przypadku aparatu RGQ MDx 5plex HRM

Detekcja w kanale Green	Detekcja w kanale Yellow	Detekcja w kanale Red	Interpretacja
Ct ≤38,00	Obojętna	Obojętna	Próbka jest pozytywna względem RNA wirusa SARS-CoV-2.
Ct >38,00 lub brak wartości Ct	Ct ≤35,00	Obojętna	Próbka jest negatywna, nie wykryto RNA wirusa SARS-CoV-2.
Ct >38,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Tak	Nieważna próbka. Nie wykryto materiału ludzkiego lub niedostateczna ilość materiału ludzkiego. Wymagane ponowne pobranie próbki.
Ct >38,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Nie	Nieważna próbka. Inhibicja reakcji RT-qPCR. Wymagane powtórzenie testu.

**Tabela 13. Kryteria ważności próbki i interpretacja wyników w przypadku aparatu ABI 7500 Fast Dx**

<b>Detekcja — barwnik FAM*</b>	<b>Detekcja — barwnik VIC/HEX*</b>	<b>Detekcja — barwnik Cy5/Atto*</b>	<b>Interpretacja</b>
Ct ≤39,00	Obojętna	Obojętna	Próbka jest pozytywna.
Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Ct ≤35,00	Obojętna	Próbka jest negatywna, nie wykryto wirusa SARS-CoV-2.
Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Tak	Nieważna próbka. Nie wykryto materiału ludzkiego. Wymagane ponowne pobranie próbki.
Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Nie	Nieważna próbka. Inhibicja reakcji RT-qPCR. Wymagane powtórzenie testu.

\* FAM = filtr A/1 w platformie ABI, VIC/HEX = filtr B/2 w platformie ABI, Cy5/Atto = filtr E/5 w platformie ABI

---

## Ograniczenia

- Wyłącznie do celów diagnostyki *in vitro*.
- Wyniki uzyskane za pomocą zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nie mogą być traktowane jako wyłączna podstawa do postawienia diagnozy, wyboru leczenia ani podejmowania innych decyzji dotyczących terapii pacjenta. Wyniki negatywne nie wykluczają zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie mogą być traktowane jako wyłączna podstawa do podejmowania decyzji dotyczących leczenia pacjenta.
- Z produktu może korzystać jedynie personel odpowiednio poinstruowany i przeszkolony w zakresie procedur diagnostycznych *in vitro*.
- W celu uzyskania optymalnych wyników reakcji PCR wymagane jest ściśle przestrzeganie instrukcji podanych w podręczniku użytkownika platformy qPCR (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx lub ABI 7500 Fast Dx).
- Należy zwracać uwagę na daty ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.



# Skuteczność

## Czułość analityczna (granica wykrywalności)

Czułość analityczna lub granica wykrywalności jest definiowana jako najniższe stężenie, przy którym  $\geq 95\%$  badanych próbek daje pozytywny wynik.

Granice LoD wyznaczono, analizując szereg rozcieńczeń negatywnych próbek wymazów z nosogardzieli, do których dodano roztwory podstawowe zawierające wysokie miano cząstek inaktywowanego wirusa, uzyskane od dostawców komercyjnych (ZeptoMetrix®). W celu potwierdzenia stężenia odpowiadającego granicy LoD współczynnik detekcji wszystkich powtórzeń dla danego stężenia musiał wynosić  $\geq 95\%$  (sygnał pozytywny wygenerowany dla co najmniej 19 z 20 powtórzeń). Stężenie odpowiadające granicy LoD potwierdzono na obu platformach do reakcji real-time PCR przeznaczonych do użytku z tym testem, korzystając z dwóch różnych serii odczynników.

Granica wykrywalności zgłoszona dla obu platform do reakcji real-time PCR dla zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wynosi 950 kopii/ml.

## Badania swoistości analitycznej (testy zróżnicowania i wykluczenia/reaktywność krzyżowa)

### Test zróżnicowania

Test zróżnicowania (zakres wykrywanych wirusów) odczynnika *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes oceniono w ramach analizy *in silico* na sekwencjach dostępnych w bazie danych GISAID ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)). Łącznie 722 488 sekwencji (dostępnych na dzień 23.03.2021 r.) przeanalizowano za pomocą narzędzia COVID CG (<https://covidcg.org>), a informacje uzupełniono o metadane z bazy danych GISAID. Sekwencje przyrównywano do sekwencji referencyjnej WIV04 (identyczność na poziomie 100% z sekwencją Wuhan-Hu-1/NC\_045512.2, z wyjątkiem długości ogona poli-A) i przeanalizowano wariacje pojedynczego nukleotydu (Single Nucleotide Variation, SNV) w regionie genomu, na które

---

ukierunkowane są statery i sondy z zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Częstość występowania zidentyfikowanych wariacji SNV utrzymywała się na poziomie poniżej 1%, podobnie jak częstość współwystępujących mutacji. Nie stwierdzono obecności żadnej wariacji SNV w ostatnich nukleotydach od końca 3' (nukleotydy od 1 do 3) w odpowiednich oligonukleotydach; wariacje tego typu z dużym prawdopodobieństwem miałyby wpływ na skuteczność testu. Uważa się, że zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit umożliwia wykrycie wszystkich (100%) opublikowanych sekwencji.

## Test wykluczenia/reaktywność krzyżowa

### Analiza *in silico*

Test wykluczenia odczynnika *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes oceniono w ramach analizy *in silico* na sekwencjach dostępnych w bazie danych NCBI. Analiza *in silico* wykazała, że niektóre z przetestowanych patogenów wykazywały homologię ze starterami lub sondami z odczynnika *artus* SARS-CoV-2 Primers and Probes na poziomie powyżej 80%. Do patogenów tych zaliczono grzyby *Candida albicans*, wirusa SARS-CoV-1, bakterie *Streptococcus pyogenes* i bakterie *Streptococcus salivarius*. Bakteria *Pseudomonas aeruginosa* wykazywała homologię do jednego ze starterów/sond oznaczenia SARS-CoV-2 na poziomie poniżej 80%. Jednakże nie udowodniono możliwości amplifikacji innych sekwencji przechowywanych w bazie danych NCBI nr/nt podczas korzystania z odczynnika *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes.

Podczas analizy PCR *in silico* przeanalizowano łącznie 36 szczepów bakterii, wirusów i grzybów; rozmiar potencjalnego amplikonu był ograniczony do 500 pz. Sekwencje patogenów uzyskano z bazy danych NCBI; dla żadnego z tych patogenów nie zaobserwowano jednak amplifikacji *in silico*.

Tabela 14. Lista patogenów przetestowanych *in silico*

Patogeny	Szczep/typ	Id. taksonomiczny	Wyniki reakcji PCR <i>in silico</i>
<i>Adenowirus typu 3</i>	Typ 3	45659	Brak dopasowania
<i>Adenowirus typu 4</i>	Typ 4	28280	Brak dopasowania
<i>Adenowirus typu 5</i>	Typ 5	28285	Brak dopasowania
<i>Adenowirus typu 7A</i>	Typ 7A	85755	Brak dopasowania
<i>Adenowirus typu 14</i>	Typ 14	10521	Brak dopasowania
<i>Adenowirus typu 31</i>	Typ 31	10529	Brak dopasowania
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Brak dopasowania
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Brak możliwości zajęcia amplifikacji**†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Brak dopasowania
Enterowirus	Typ 68	42789	Brak dopasowania
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus	229E	11137	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus	NL63	277944	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus	HKU-1	290028	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus OC43	OC43	31631	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus	MERS-CoV	1335626	Brak dopasowania
Ludzki metapneumowirus	nd.	162145	Brak dopasowania
Wirus grypy A	H1N1	114727	Brak dopasowania
Wirus grypy A	H3N2	119210	Brak dopasowania
Wirus grypy B	nd.	11520	Brak dopasowania

\* Podczas dopasowywania sekwencji stwierdzono homologię na poziomie <80% z jednym ze starterów/sond.

† Podczas dopasowywania sekwencji stwierdzono homologię na poziomie ≥80% z jednym ze starterów/sond.

(ciąg dalszy na następnej stronie)

Tabela 14 (ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony)

Patogeny	Szczep/typ	Id. taksonomiczny	Wyniki reakcji PCR <i>in silico</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Brak dopasowania
Wirus paragrypy	Typ 1	12730	Brak dopasowania
Wirus paragrypy	Typ 2	2560525	Brak dopasowania
Wirus paragrypy	Typ 3	11216	Brak dopasowania
Wirus paragrypy	Typ 4	2560526	Brak dopasowania
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Brak dopasowania
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Brak możliwości zajęcia amplifikacji*
Syncytialny wirus oddechowy	Typ A (RSV-A)	208893	Brak dopasowania
Syncytialny wirus oddechowy	Typ B (RSV-B)	208895	Brak dopasowania
Rinowirus	Typ A	147711	Brak dopasowania
Rinowirus	Typ B	147712	Brak dopasowania
Koronawirus SARS	Tor2	694009	Brak możliwości zajęcia amplifikacji†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	nd.	1282	Brak dopasowania
<i>Streptococcus pyogenes</i>	nd.	1314	Brak możliwości zajęcia amplifikacji†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Brak możliwości zajęcia amplifikacji†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Brak dopasowania

\* Podczas dopasowywania sekwencji stwierdzono homologię na poziomie <80% z jednym ze starterów/sond.

† Podczas dopasowywania sekwencji stwierdzono homologię na poziomie ≥80% z jednym ze starterów/sond.

### Analiza *in vitro*

Reaktywność krzyżową zweryfikowano przeprowadzając analizę w warunkach *in vitro* z patogenami, dla których w analizie *in silico* wykazano homologię na poziomie ≥80% do starterów zawartych w odczynniku SARS-CoV-2 Amp Primers. Próbkę przygotowano, dodając mikroorganizmy, które potencjalnie mogły wywoływać reakcję krzyżową, do macierzy wymazu z nosogardzieli w stężeniu  $10^6$  kopii/ml, z wyjątkiem wirusa SARS-CoV-1, którego nie rozcieńczano zgodnie z zaleceniami dostawcy. Żaden z patogenów nie wykazywał reaktywności krzyżowej w warunkach *in vitro*.

Zakłócenia przebiegu oznaczenia *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wywoływane przez drobnoustroje oceniono w warunkach *in vitro* przy użyciu panelu zawierającego zalecane patogeny. Próbkę przygotowano, dodając po maksymalnie 5 patogenów (w stężeniu 105 TCID50/ml w przypadku cząstek wirusowych, 10<sup>6</sup> kopii/ml w przypadku cząstek bakteryjnych i grzybów lub przy maksymalnym stężeniu, które można było uzyskać z roztworu podstawowego) do negatywnych wymazów z nosogardzieli, do których dodano cząstki inaktywowanego wirusa SARS-CoV-2 w stężeniu 2,87 x LoD (Zeptomatrix). Do paneli NATrol™ i cząstek wirusa SARS-CoV-1 bezpośrednio dodano cząstki inaktywowanego wirusa SARS-CoV-2 v (Zeptomatrix) w stężeniu 2,87 x LoD. Poniżej przedstawiono podsumowanie wyników dla każdej przetestowanej puli mikroorganizmów/wirusów wraz z odpowiadającymi im stężeniami.

Tabela 15. Lista patogenów przetestowanych *in vitro* pod kątem wywoływania zakłóceń przebiegu oznaczenia.

Id. puli/id. próbki	Mikroorganizm/wirus	Źródło	Stężenie końcowe	Jednostka	Wynik
Pula 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Ludzki koronawirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ludzki koronawirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/ml	
	Ludzki koronawirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID50/ml	
	Adenowirus typu 3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Wirus paragrypy typu 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID50/ml	
Pula 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Adenowirus typu 31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/ml	
	Wirus paragrypy typu 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/ml	
	Wirus grypy B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Rinowirus typu 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/ml	

(ciąg dalszy na następnej stronie)

Tabela 15 (ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony)

<b>Id. puli/id. próbki</b>	<b>Mikroorganizm/wirus</b>	<b>Źródło</b>	<b>Stężenie końcowe</b>	<b>Jednostka</b>	<b>Wynik</b>
Pula 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Wirus paragrypy typu 3	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	
Pula 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Adenowirus typu 7A	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	
Pula 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Syncytialny wirus oddechowy RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Wirus grypy A H1N1 Kalifornia	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterowirus typu 68, grupa główna	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Adenowirus typu 14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Pula 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Koronawirus MERS	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Adenowirus typu 4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ludzki metapneumowirus (hMPV) typu B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Syncytialny wirus oddechowy typu B (RSV- B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(ciąg dalszy na następnej stronie)

Tabela 15 (ciąg dalszy tabeli z poprzedniej strony)

Id. puli/id. próbki	Mikroorganizm/wirus	Źródło	Stężenie końcowe	Jednostka	Wynik
Pula 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS (COV2)-ERC)	2,73E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Adenowirus typu 5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Wirus paragrypy 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Wirus grypy A H3N2 Switzerland/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Pula 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS (COV2)-ERC)	2,73E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Panel NATrol RP1 (wirus grypy A H3N2 (Brisbane/10/07), wirus grypy A H1N1 (NY/02/2009), rinowirus (typu 1A), adenowirus typu 3, wirus paragrypy typu 1, wirus paragrypy typu 4, metapneumowirus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), wirus Coxsackie (typu A1)	Zeptomatrix (MDZ001)	Nieznane*	nd.	
Pula 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Panel NATrol RP2 (wirus grypy A H1 (New Caledonia/20/99), wirus grypy B (Florida/02/06), wirus RSV-A, wirus paragrypy typu 2, wirus paragrypy typu 3, rekombinowany koronawirus HKU, koronawirusy (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639)	Zeptomatrix (MDZ001)	Nieznane*	nd.	
Pula 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS (COV2)-ERC)	2,73E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Nieznane*	nd.	

\*Dostawca nie podał stężenia.

## Substancje zakłócające

Oceniono wpływ substancji potencjalnie zakłócających (substancje wymienione w Tabeli 16) na skuteczność zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Testy wykonywano na 3 pulach negatywnych wymazów z nosogardzieli i na 3 pulach pozytywnych wymazów z nosogardzieli do których dodano cząstki inaktywowanego wirusa SARS-CoV-2 w stężeniu 4 x LoD (Zeptomatrix). Eksperymenty przeprowadzał 1 operator, korzystając z platformy RGQ MDx 5plex HRM (4 aparaty) i 1 zestawu badanego.

Każdą pulę podzielono na 2 części w celu przetestowania substancji zakłócającej rozpuszczonej w rozpuszczalniku (próbka badana) lub samego rozpuszczalnika (próbka kontrola). Wskaźniki udanych odczytów w zielonym i czerwonym kanale fluorescencyjnym porównano między próbkami badanymi i odpowiadającymi im próbkami kontrolnymi. W przypadku braku zakłóceń dla próbek badanych i odpowiadających im próbek kontrolnych otrzymywano taki sam wskaźnik udanych odczytów.

Z danych przedstawionych w Tabeli 16 wynika, że żadna z przetestowanych substancji nie zakłóca skuteczności zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w przypadku zielonego kanału fluorescencyjnego.

Tabela 16. Lista substancji zakłócających.

Substancje zakłócające	Przeznaczenie	Badane stężenie	Wyniki dla negatywnych wymazów z nosogardzieli	Wyniki dla pozytywnych (4x LoD) wymazów z nosogardzieli
<b>Tobramycyna</b>	Antybiotyk do stosowania ogólnego	1 mg/ml	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 0/15
<b>Mupirocyna</b>	Maść z antybiotykiem do nosa	6,6 mg/ml	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 0/15
<b>Flutykazon</b>	Kortykosteroid donosowy	5% (o/o)	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 0/15
<b>Mentol (pastylki do ssania na dolegliwości gardła)</b>	Doustny środek przeciwbólowy i znieczulający	0,5 mg/ml	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 0/15

(ciąg dalszy na następnej stronie)



Tabela 16. (ciąg dalszy z poprzedniej strony)

Substancje zakłócające	Przeznaczenie	Badane stężenie	Wyniki dla negatywnych wymazów z nosogardzieli	Wyniki dla pozytywnych (4x LoD) wymazów z nosogardzieli
Oksymetazolina	Aerozol do nosa	10% (o/o)	Brak zakłóceń (0/15)	Brak zakłóceń (0/15)
Osetamiwir	Lek przeciwwirusowy	3,3 mg/ml	Brak zakłóceń (0/15)	Brak zakłóceń (0/15)
Mucyna (bydłęce gruczoły podszczękowe typu I-S)		2,5 mg/ml	Brak zakłóceń (0/15)	Brak zakłóceń (0/15)
Krew pełna		4% (o/o)	Brak zakłóceń (1/15*)	Brak zakłóceń (0/15)

\* Wykryto amplifikację charakterystyczną dla artefaktu.

## Precyzja

W ramach badania precyzji oceniano odtwarzalność (jedna próbka badana w ramach różnych reakcji i w różnych warunkach: 5 dni, 3 serie zestawu, 3 operatorzy i 2 aparaty) i powtarzalność (jedna próbka w ramach jednej reakcji badana w stałych warunkach). Testy wykonywano na negatywnych próbkach wymazu z nosogardzieli i negatywnych próbkach wymazu z nosogardzieli z dodatkiem cząstek wirusa w stężeniu 5 x LoD przy użyciu aparatu RGQ MDx.

Dla każdego rozcieńczenia zebrano 204 punkty danych. Dane z badań powtarzalności i odtwarzalności wykorzystano do obliczenia odchylenia standardowego (Standard Deviation, SD) i współczynnika zmienności (Coefficient of Variation, %CV) dla detekcji sekwencji docelowych wirusa SARS-CoV-2 w kanale zielonym, żółtym i czerwonym. Tabela 17 zawiera dane, które wskazują, że ogólna precyzja zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest równa 0,63 SD (2,03 %CV) w kanale zielonym, 0,54 SD (2,22 %CV) w kanale żółtym i 1,28 SD (4,10 %CV) w kanale czerwonym.

**Tabela 17. Odchylenie standardowe i współczynnik zmienności zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit***

Próbki i kanał detekcji	Łącznie	Między dniami	Między partiami	Między operatorami	Między aparatami	Między reakcjami	W ramach reakcji
<b>Odchylenie standardowe (Standard Deviation, SD) (współczynnik zmienności (Coefficient of Variation, %CV))</b>							
Negatywny wymaz z nosogardzieli Kanał 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)
Negatywny wymaz z nosogardzieli Kanał 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)
Wymaz z nosogardzieli z dodatkiem cząstek Kanał 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)
Wymaz z nosogardzieli z dodatkiem cząstek Kanał 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)
Wymaz z nosogardzieli z dodatkiem cząstek Kanał 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)

## Skuteczność kliniczna

Skuteczność kliniczną oznaczenia *artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp* oceniono przy użyciu następujących zebranych retrospektywnie próbek wymazów z nosogardzieli w podłożu transportowym:

- 98 próbek negatywnych względem RNA wirusa SARS-CoV-2;
- 52 próbki pozytywne względem RNA wirusa SARS-CoV-2.

Wszystkie próbki pobrano od pacjentów z objawami przedmiotowymi i podmiotowymi zakażenia COVID-19 i przechowywano je w stanie zamrożonym do momentu wykorzystania.

Walidację kliniczną przeprowadzono w aparacie ABI 7500 Fast Dx. Tabela 18 zawiera dane dotyczące skuteczności zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w porównaniu z metodą referencyjną. Skuteczność zestawu wyrażono jako zgodność procentową wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentową wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA).

**Tabela 18. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w porównaniu z metodą referencyjną**

Typ próbki	N	Odsetek wyników dodatnich (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników ujemnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki dodatnie	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	5,1 (5/98)	
Wyniki ujemne	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7–97,8

Wyniki niezgodne oceniono trzecią metodą i przeanalizowano ponownie przy użyciu tabeli kontyngencji. Ogólne wyniki dotyczące skuteczności klinicznej wyrażono jako zgodność procentową wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentową wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA); przedstawia je w Tabeli 19.

**Tabela 19. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit**

Typ próbki	N	Odsetek wyników dodatnich (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników ujemnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki dodatnie	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	5,1 (5/98)	
Wyniki ujemne	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7–97,8

Poniżej przedstawiono odsetek próbek zgodnych oraz wartości zgodności procentowej wyników dodatnich i ujemnych (odpowiednio PPA i NPA) wraz z oczekiwanymi statusami próbek:

Zgodność procentowa wyników dodatnich

(Positive Percent Agreement, PPA%): 51/52 = 98,1% (95-procentowy CI: 89,9%–99,7%)

Zgodność procentowa wyników ujemnych

(Negative Percent Agreement, NPA%): 93/98 = 94,9% (95-procentowy CI: 88,6%–97,8%)

### Skuteczność kliniczna z uwzględnieniem próbek pobranych od osób bezobjawowych

Skuteczność kliniczną oznaczenia *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp oceniono przy użyciu następujących zebranych retrospektywnie próbek wymazów z nosogardzieli w podłożu transportowym:

- 100 próbek negatywnych względem RNA wirusa SARS-CoV-2;
- 53 próbki pozytywne względem RNA wirusa SARS-CoV-2.

Wszystkie próbki pobrano od pacjentów bezobjawowych lub osób z podejrzeniem zakażenia wirusem wywołującym chorobę COVID-19.

Walidację kliniczną przeprowadzono w aparacie ABI 7500 Fast Dx. Szesnaście próbek przetestowanych za pomocą zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wykluczono z analizy z powodu stwierdzenia statusu nieważnego na podstawie kryteriów ważności próbki (Tabela 13).

Tabela 20 zawiera dane dotyczące skuteczności zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w porównaniu z metodą referencyjną. Skuteczność zestawu wyrażono jako zgodność procentową wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentową wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA).

**Tabela 20. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* w porównaniu z metodą referencyjną**

Typ próbek	N	Odsetek wyników dodatnich (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników ujemnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki dodatnie	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	1,15 (1/87)	–
Wyniki ujemne	87	36,0 (18/50)	–	98,85 (86/87)	93,8–99,8

Dziewiętnaście wyników niezgodnych oceniono trzecią metodą i przeanalizowano ponownie przy użyciu tabeli kontyngencji. Ogólne wyniki dotyczące skuteczności klinicznej wyrażono jako zgodność procentową wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentową wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA); przedstawia je Tabela 21.

**Tabela 21. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit***

Typ próbek	N	Odsetek wyników dodatnich (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników ujemnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki dodatnie	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0,95 (1/105)	–
Wyniki ujemne	105	–	–	99,05 (104/105)	94,8–99,8

Osiemnaście próbek fałszywie negatywnych poddano ponownej klasyfikacji i stwierdzono, że są to próbki prawdziwie negatywne, natomiast jedna próbka fałszywie pozytywna pozostała próbka fałszywie pozytywną.

Poniżej przedstawiono odsetek próbek zgodnych oraz wartości zgodności procentowej wyników dodatnich i ujemnych (odpowiednio PPA i NPA) wraz z oczekiwanymi statusami próbek:

Zgodność procentowa wyników dodatnich

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

Zgodność procentowa wyników ujemnych

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

---

# Literatura

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>

# Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może ułatwić rozwiązanie ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną poświęconą często zadawanym pytaniom (Frequently Asked Questions, FAQ) w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx).

## Komentarze i wskazówki

### Brak sygnału lub słaby sygnał w kanale zielonym (FAM) dla kontroli pozytywnej (Positive Control, PC)

- |   |   |
|---|---|
| a) Wybrany do analizy danych RT-PCR kanał fluorescencyjny nie spełnia wymagań protokołu.  | Do analizy danych wybrać kanał fluorescencyjny FAM (zielony) dla analitycznej reakcji RT-PCR pod kątem sekwencji docelowych wirusa SARS-CoV-2, kanał fluorescencyjny HEX/VIC/JOE (żółty) dla kontroli przygotowania próbki oraz kanał fluorescencyjny Cy5/Atto (czerwony) dla kontroli wewnętrznej.   |
| b) Nieprawidłowe zaprogramowanie profilu temperaturowego.   | Porównać program reakcji RT-PCR z protokołem.   |
| c) Nieprawidłowa konfiguracja reakcji PCR   | Sprawdzić etapy procedury według schematu pipetowania i w razie potrzeby powtórzyć reakcję PCR.   |
| d) Warunki przechowywania co najmniej jednego ze składników zestawu nie były zgodne z zaleceniami lub upłynął termin ważności zestawu <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit. | Przestrzegać warunków przechowywania odczynników, sprawdzić datę ważności odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu.   |
| e) Nieprawidłowa konfiguracja platformy qPCR podczas konfiguracji danych.   | Użyć konfiguracji zalecanej dla używanej platformy qPCR, opisanej w tym podręczniku.  |
| f) Wystąpiła inhibicja reakcji PCR.   | Przestrzegać zasad dobrych praktyk podczas pracy w laboratorium biologii molekularnej, aby uniknąć wprowadzenia zanieczyszczeń. Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane.<br>Przestrzegać protokołu opisanego w tym podręczniku. Sprawdzić termin ważności odczynnika i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. Powtórzyć oznaczenie na innej próbce. |

### Sygnał w kanale zielonym (FAM) dla kontroli bez matrycy lub kontroli bez izolacji.

Podczas przygotowywania płytki do reakcji RT-PCR doszło do zanieczyszczenia sekwencjami wirusa SARS-CoV-2.

Powtórzyć reakcję RT-PCR z nowymi odczynnikami. Przestrzegać zasad dobrych praktyk podczas pracy w laboratorium biologii molekularnej, aby uniknąć wprowadzenia zanieczyszczeń. Przestrzegać protokołu opisanego w tej instrukcji obsługi.  
Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane.

## Komentarze i wskazówki

### Brak sygnału lub słaby sygnał w kanale czerwonym (Cy5/Atto) dla kontroli wewnętrznej

- a) Doszło do wprowadzenia substancji zakłócającej do reakcji RT-PCR. Wystąpiła inhibicja reakcji PCR.
- Przestrzegać zasad dobrych praktyk podczas pracy w laboratorium biologii molekularnej, aby uniknąć wprowadzenia zanieczyszczeń.
- Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane.
- Przestrzegać protokołu opisanego w tym podręczniku.
- Powtórzyć eksperyment na nowo zebranej próbce.
- b) Doszło do rozkładu kontroli wewnętrznej.
- Przestrzegać zasad dobrych praktyk podczas pracy w laboratorium biologii molekularnej, aby uniknąć wprowadzenia RNaz. Przestrzegać zaleceń przedstawionych w tym podręczniku.
- Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane.
- Przestrzegać warunków przechowywania odczynników, sprawdzić datę ważności odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu.
- c) Nieprawidłowa konfiguracja platformy qPCR podczas konfiguracji danych.
- Użyć konfiguracji zalecanej dla używanej platformy qPCR, opisaney w tym podręczniku.
















### Słaby sygnał lub brak sygnału w kanale żółtym (VIC/HEX) dla kontroli przygotowania próbki

- a) Doszło do rozkładu próbki klinicznej.
- Przestrzegać zaleceń dotyczących przechowywania próbki, postępowania z próbką i transportu próbki podanych przez dostawcę wyrobu do pobierania próbki.
- Przestrzegać protokołu opisanego w tym podręczniku, w tym kroków przygotowania próbki w buforze SARS-CoV-2 UM Prep Buffer.
- Przestrzegać warunków przechowywania odczynników, sprawdzić datę ważności odczynników, w tym buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu.
- b) Próbkę pobrano w niewłaściwy sposób. Na wymazówce lub w podłożu transportowym zebrano niewystarczającą ilość komórek ludzkich.
- Przestrzegać zaleceń dotyczących pobierania próbki i postępowania z próbką podanych przez dostawcę wyrobu do pobierania próbki.
- c) Nieprawidłowa konfiguracja platformy qPCR podczas konfiguracji danych.
- Użyć konfiguracji dla używanej platformy qPCR, opisaney w tym podręczniku.



# Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się w instrukcji użycia lub na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania 768 lub 3072 reakcji
	Data ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Składniki
	Zawiera
	Numer
	Globalny numer jednostki handlowej
	R oznacza wydanie instrukcji użycia, a n to numer wydania
	Zakres temperatury
	Producent
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Chronić przed światłem słonecznym
	Ostrzeżenie/przestroga

---

## Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej oraz dalszych informacji prosimy o kontakt z działem serwisu technicznego firmy QIAGEN pod adresem **[support.qiagen.com](https://support.qiagen.com)**.

## Dane do zamówień

Produkt	Spis treści	Nr kat.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Na 768 reakcji: bufor do przygotowania, barwnik ROX, mieszanina Master Mix, startery i sondy, kontrola wewnętrzna, woda (NTC) i kontrola pozytywna	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Na 3072 reakcje: bufor do przygotowania, barwnik ROX, mieszanina Master Mix, startery i sondy, kontrola wewnętrzna, woda (NTC) i kontrola pozytywna	4511469
<b>Aparat i akcesoria</b>		
Próbówki PCR o pojemności 0,1 ml do użytku z aparatem Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Do użytku z rotorem 72-Well Rotor, próbówki w paskach i zatyczki	981103
Oprogramowanie Rotor-Gene Q	Oprogramowanie Rotor-Gene Q w wersji 2.3.1 (lub wyższej)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Cykler do reakcji real-time PCR z 5 kanałami, analizator High Resolution Melt, oprogramowanie, komputer typu laptop i akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; obejmuje instalację	9002032
Loading Block	72 próbek x 0,1 ml	9018901

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

# Historia zmian dokumentu

Wersja	Opis
R1, kwiecień 2021 r.	Pierwsze wydanie.
R2, lipiec 2021 r.	<p>Uzupełnienie oświadczenia: Ustalono skuteczność tego testu w przypadku osób bezobjawowych. Zaktualizowano część Przeznaczenie w celu uwzględnienia możliwości testowania próbek pobranych od pacjentów bezobjawowych lub osób z podejrzeniem zakażenia wirusem wywołującym chorobę COVID-19. Dodano część Skuteczność kliniczna z uwzględnieniem próbek pobranych od osób bezobjawowych do danych Skuteczność.</p> <p>Usunięcie oświadczenia „Nie ustalono skuteczności tego testu w przypadku pacjentów bez przedmiotowych i podmiotowych objawów zakażenia układu oddechowego” z części Ograniczenia.</p> <p>Drobne poprawki redakcyjne i formatowania.</p>

## Umowa ograniczonej licencji dla zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być używany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami wchodzącymi w skład tego panelu. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego panelu ze składnikami nienależącymi do panelu, z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy panel i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Panel oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji, wyrażonych ani dorozumianych, poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik panelu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zephtometrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Excel® (Microsoft Corporation); ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific lub podmioty zależne). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

---

Składanie zamówień [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Pomoc techniczna [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Strona [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)