

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Κιτ SARS-CoV-2 RT-qPCR

Έκδοση νο.1, Νοέμβριος 2021

Κιτ SARS-CoV-2 RT-qPCR



CE

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	3
2. Προβλεπόμενη Χρήση	3
3. Βασική Αρχή Λειτουργίας του τεστ	4
4. Περιεχόμενα του κιτ (Παρεχόμενα Υλικά).....	5
5. Υλικά και Εξοπλισμός που Απαιτούνται, αλλά δεν παρέχονται.....	5
6. Αποθήκευση και Χειρισμός Αντιδραστηρίων.....	6
7. Συλλογή, Μεταφορά, Αποθήκευση και Προετοιμασία Δειγμάτων	6
8. Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις	7
9. Διεξαγωγή του τεστ (δοκιμασίας)	8
9.1 Ρύθμιση αντίδρασης.....	8
9.2 Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR σε πραγματικό χρόνο	10
10. Ανάλυση Δεδομένων	10
10.1 Ερμηνεία αποτελεσμάτων ελέγχων	10
10.2 Ερμηνεία Αποτελεσμάτων Δειγμάτων.	11
11. Αξιολόγηση Απόδοσης.....	14
11.1 Ευαισθησία Ανάλυσης (Όριο Ανίχνευσης)	14
11.2 Αναλυτική Αντιδραστικότητα (συμπεριληπτικότητα).....	15
11.2 Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα	16
11.3 Επαναληψιμότητα	17
11.4. Κλινική Αξιολόγηση.....	19
12. Ποιοτικός έλεγχος:.....	19
13. Τεχνική υποστήριξη	20
14. Εμπορικά σήματα και δηλώσεις αποποίησης ευθύνης	20
15. Επεξήγηση συμβόλων.....	21
16. Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	21

Κιτ SARS-CoV-2 RT-QPCR

1. Εισαγωγή

Ο νέος κορωνοϊός 2019, παλαιότερα γνωστός ως 2019-nCoV και που μετονομάστηκε σε SARS-CoV-2 από τη "Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών", είναι ένα νέο στέλεχος του κορωνοϊού που εντοπίστηκε για πρώτη φορά κατά την πανδημία του 2019-2020 στην Κίνα. Ο WHO (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) ονόμασε τη νόσο, η οποία προκλήθηκε από τον ιό SARS-CoV-2, COVID-19. Τα κοινά κλινικά σημεία της λοίμωξης περιλαμβάνουν κόπωση, αναπνευστικά συμπτώματα, πυρετό, βήχα, δύσπνοια και αναπνευστικές δυσκολίες. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η λοίμωξη μπορεί να προκαλέσει πνευμονία, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, νεφρική ανεπάρκεια και θάνατο. Σημαντικό ποσοστό των λοιμώξεων είναι ήπιες ή ασυμπτωματικές. Οι ηλικιωμένοι, οι καπνιστές, τα άτομα με χρόνιες παθήσεις (καρδιά, πνευμονοπάθεια, διαβήτη) και οι ασθενείς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, σε περίπτωση μόλυνσης από τον SARS-CoV-2, μπορούν να οδηγηθούν σε σοβαρή και απειλητική για τη ζωή νόσο.

2. Προβλεπόμενη Χρήση

Το κιτ EnzyQuest SARS-CoV-2 RT-qPCR είναι μια μοριακή δοκιμή RT-PCR σε πραγματικό χρόνο, η οποία προορίζεται για την ποιοτική ανίχνευση του RNA του SARS-CoV-2 που εξάγεται από τύπους ανθρώπινων αναπνευστικών δειγμάτων που συλλέγονται από ασθενείς για τους οποίους υπάρχει υποψία νόσου COVID-19 από τον πάροχο υγειονομικής περίθαλψης.

Ένα θετικό αποτέλεσμα δείχνει την παρουσία SARS-CoV-2 RNA. Απαιτείται κλινική συσχέτιση με το ιστορικό του ασθενούς και άλλες διαγνωστικές πληροφορίες για τον προσδιορισμό της κατάστασης της λοίμωξης του ασθενούς. Τα θετικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη βακτηριδιακή λοίμωξη ή την ταυτόχρονη λοίμωξη από άλλους ιούς. Ο παράγοντας που ανιχνεύεται ενδέχεται να μην είναι η οριστική αιτία της νόσου.

Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη λοίμωξη από 2019-nCoV και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως τη μοναδική βάση για τις αποφάσεις διαχείρισης ασθενούς. Τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να συνδυάζονται με κλινικές παρατηρήσεις, το ιστορικό του ασθενούς και επιδημιολογικές πληροφορίες.

Το κιτ αυτό προορίζεται για χρήση από εξειδικευμένο προσωπικό κλινικών εργαστηρίων που έχει λάβει ειδικές οδηγίες και εκπαίδευση σε διαδικασίες PCR πραγματικού χρόνου και διαγνωστικών διαδικασιών *in vitro*.

3. Βασική Αρχή Λειτουργίας του τεστ

Το κιτ SARS-CoV-2 RT-qPCR είναι ένα τεστ αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (rRT-PCR) αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο. Το σετ του εκκινητή (primer) και των ιχνηθετών (probes) SARS-CoV-2 έχει σχεδιαστεί σύμφωνα με την "Ενδιάμεση καθοδήγηση του WHO για εργαστηριακές δοκιμές για τον νέο κορωνοϊό 2019 (2019-nCoV) στον άνθρωπο". Αυτό το κιτ βασίζεται στην τεχνολογία φθορισμού PCR σε πραγματικό χρόνο με ιχνηθέτη TaqMan. Τα δείγματα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινοφαρυγγικά, στοματοφαρυγγικά, πρόσθια ρινικά και επιχρίσματα μέσης ρινικής κόγχης, ρινοφαρυγγικό έκπλυμα/αναρρόφημα και δείγματα ρινικού αναρροφήματος) εξάγονται με τη χρήση του κιτ «NucleoSpin RNA Virus, Mini kit for viral RNA from cell-free fluids» (Macherey Nagel). Μετά την εξαγωγή, το καθαρισμένο νουκλεϊνικό οξύ μεταγράφεται πρώτα σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με αντίστροφη μεταγραφή και στη συνέχεια ενισχύεται από την πολυμεράση θερμής έναρξης (Hot Start) στο όργανο rRT-PCR. Στην διαδικασία ενίσχυσης του PCR, η ενεργότητα νουκλεάσης 5' της πολυμεράσης Taq DNA προκαλεί την αποδόμηση του ιχνηθέτη TaqMan, με αποτέλεσμα να διαχωρίζεται η χρωστική αναφοράς από τη χρωστική απόσβεσης, δημιουργώντας φθορίζον σήμα. Η ένταση φθορισμού παρακολουθείται σε κάθε κύκλο PCR από το όργανο rRT-PCR: Διαύλους FAM και HEX για την ανίχνευση των γονιδίων E και N αντίστοιχα του SARS-CoV-2. Ο δίαυλος Cy5 χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του IPC.

Παράμετροι Ανίχνευσης του Κιτ	
Στόχος	Δίαυλος
Γονίδιο E	FAM
Γονίδιο N	HEX
IPC	Cy5

Πίνακας 1. Στόχοι και φθορίζουσες χρωστικές

4. Περιεχόμενα του κιτ (Παρεχόμενα Υλικά)

Κιτ 480 αντιδράσεων (αρ.κατ. RN004M-IVD)

Αρ. καταλόγου	Περιγραφή	Φιαλίδια	Cap
BR033 IVD-1.90	Νερό ελεύθερο νουκλεάσης, 1.90 ml	2	Λευκό
BR030 IVD-1.1	5x ρυθμιστικό διάλυμα RT-PCR ενός βήματος, 1.1 ml	2	Μπλε
BR031 IVD-1.1	10x Μείγμα Ιχνηθετών_SARS COV2, 1.1 ml	1	Μπλε
BR032 IVD-1.1	10x Μείγμα Εκκινητών_SARS COV2, 1.1 ml	1	Μπλε
BR054 IVD-150/5	Πρότυπο SARS COV2 (+), 5cp/μl, 0.15 ml	1	Βιολετί
BR035 IVD-0.55	20x μείγμα ενζύμων ενός βήματος για RT SARS COV2, 0,55ml	1	Μαύρο

Κιτ 96 αντιδράσεων (αρ.κατ. RN004S-IVD)

Αρ. καταλόγου	Περιγραφή	Φιαλίδια	Cap
BR033 IVD-1	Νερό ελεύθερο νουκλεάσης, 1 ml	2	Λευκό
BR030 IVD-0.5	5x ρυθμιστικό διάλυμα RT-PCR ενός βήματος, 0.5 ml	2	Μπλε
BR031 IVD-0.225	10x Μείγμα Ιχνηθετών_SARS COV2, 0.225 ml	1	Μπλε
BR032 IVD-0.225	10x Μείγμα Εκκινητών_SARS COV2, 0.225 ml	1	Μπλε
BR054 IVD-30/5	Πρότυπο SARS COV2 (+), 5cp/μl, 0.03 ml	1	Βιολετί
BR035 IVD-0.11	20x μείγμα ενζύμων ενός βήματος για RT SARS COV2, 0,11ml	1	Μαύρο

Πίνακες 2 και 3. Περιεχόμενα προϊόντων RN004S_IVD και RN004M_IVD

※ Το νερό ελεύθερο νουκλεάσης χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.

5. Υλικά και Εξοπλισμός που Απαιτούνται, αλλά δεν παρέχονται

- Γάντια χωρίς πούδρα
- Μικροπιπέτες και ρύγχοι με φίλτρα Rnase (ριβονουκλεάσης)/DNase(δεοξυριβονουκλεάσης)
- Κατάλληλες πλάκες αντίδρασης με 96 υποδοχές ή σωληνάρια αντίδρασης συμβατά με το όργανο PCR

- Φυλλάδιο οδηγιών χρήσης
- Εξοπλισμός και αναλώσιμα για την απομόνωση του ιού RNA από αναπνευστικά δείγματα
- Φυγόκεντρος και εξοπλισμός ανακίνησης
- Όργανο PCR σε πραγματικό χρόνο που ανιχνεύει FAM, HEX, Cy5 φθορίζουσες χρωστικές (σε μήκη κύματος εκπομπής 450-490nm, 515-535nm και 620-650nm αντίστοιχα)
- Συσκευασία NucleoSpin RNA Virus, «Mini kit for viral RNA from cell-free fluids» (Macherey Nagel, αρθ. Καταλόγου 740956.50 ή 250)

6. Αποθήκευση και Χειρισμός Αντιδραστηρίων

- Το κιτ αποστέλλεται σε ξηρό πάγο.
- Όλα τα συστατικά πρέπει να αποθηκεύονται αμέσως σε θερμοκρασία μεταξύ -15°C και -25°C κατά την άφιξη.
- Η κατάψυξη και η απόψυξη περιορίζονται σε 5 φορές.
- Ελαχιστοποιήστε τη διαφορά θερμοκρασίας των συστατικών.
- Πραγματοποιήστε απόψυξη στα απαραίτητα συστατικά αμέσως πριν από τη χρήση και τοποθετήστε τα ξανά στον καταψύκτη μετά τη χρήση.
- Προστατέψετε το 10x Μείγμα Ιχνηθετών_SARS COV2 από το φως κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και αποφύγετε την έκθεση σε άμεσο ηλιακό φως κατά την προετοιμασία της αντίδρασης.
- Δείτε την ετικέτα για την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στη συσκευασία.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης.

7. Συλλογή, Μεταφορά, Αποθήκευση και Προετοιμασία

Δειγμάτων

Τα πρωτόκολλα για τη συλλογή δειγμάτων και τον χειρισμό της μεταφοράς μπορεί να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα. Ανατρέξτε στις Προσωρινές Κατευθυντήριες Οδηγίες του CDC (Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων) για τη Συλλογή, τον Χειρισμό και τη Δοκιμή Κλινικών Δειγμάτων από Άτομα υπό Διερεύνηση (PUIs) (CDC Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons Under Investigation) για τη νόσο του Κορωνοϊού 2019 (COVID-19) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.

Τα δείγματα πρέπει να συσκευάζονται, να αποστέλλονται και να μεταφέρονται σύμφωνα με την τρέχουσα έκδοση του Κανονισμού της Διεθνούς Ένωσης Αερομεταφορών (IATA) περί Επικίνδυνων Εμπορευμάτων. Ακολουθήστε τους κανονισμούς αποστολής για τη Βιολογική Ουσία UN Αριθμ. 3373, Κατηγορία Β κατά την αποστολή πιθανών δειγμάτων 2019-nCoV στο εργαστήριο εξέτασης. Το RNA που εξάγεται σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο CE IVD είναι το αρχικό υλικό του κιτ EnzyQuest SARS-CoV-2 RT-qPCR_IVD ενός βήματος.

8. Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις

- Ακολουθήστε προσεκτικά τις διαδικασίες δοκιμής, τις οδηγίες, τις προφυλάξεις και τις προειδοποιήσεις στις οδηγίες χρήσης. Οποιαδήποτε αλλαγή που δεν έχει εγκριθεί από τον κατασκευαστή μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα της δοκιμής και ο ίδιος ο χρήστης είναι υπεύθυνος για τέτοιες αλλαγές. Ο κατασκευαστής δεν ευθύνεται για ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα που προκαλούνται από αυτούς τους λόγους.
- Αυτό το κιτ προορίζεται για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Για Εξουσιοδότηση Χρήσης Έκτακτης Ανάγκης
- Μην χρησιμοποιείτε τα περιεχόμενα που έχουν λήξει.
- Μην εναλλάσσετε αντιδραστήρια διαφορετικών παρτίδων παραγωγής.
- Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια άλλων κατασκευαστών μαζί με τα αντιδραστήρια του συγκεκριμένου τεστ.
- Χρησιμοποιείτε πάντα ελεύθερα DNase/RNase σωληνάρια αντίδρασης μίας χρήσης με ρύγχοι πιπέτας με φραγμούς αερολύματος για να αποτρέψετε τη μόλυνση των αντιδράσεων και των αντιδραστηρίων.
- Το κιτ πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από εξειδικευμένους επαγγελματίες του εργαστηρίου.
- Για την προετοιμασία του δείγματος, τη ρύθμιση της αντίδρασης και την ενίσχυση απαιτούνται ξεχωριστοί χώροι εργασίας, αφιερωμένοι στην εκτέλεση προκαθορισμένων διαδικασιών.
- Προετοιμάστε τον θετικό μάρτυρα (πρότυπο SARS COV2 (+), 5cp/μl,) σε ξεχωριστή περιοχή από τα δείγματα και τα συστατικά του κιτ.
- Μην αναμειγνύετε με αντιδραστήρια από άλλες συσκευασίες που διατίθενται στο εμπόριο.
- Κατά τη δοκιμή, προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του εργαστηρίου, καθαρίστε τον σταθμό εργασίας και τις επιφάνειες με προϊόν αφαίρεσης DNA/RNA.

- Τα δείγματα και τα υπολείμματα των χημικών ουσιών που απομένουν είναι δυνητικά μολυσματικά. Ο χειρισμός και η απόρριψη των αποβλήτων ακολουθούν τις καθιερωμένες κατευθυντήριες γραμμές για τη βιοασφάλεια των μικροβιολογικών εργαστηρίων βιοϊατρικής, τη διαχείριση των ιατρικών αποβλήτων και άλλους εθνικούς/περιφερειακούς νόμους και κανονισμούς.
- Εγκεκριμένα μόνο για την ανίχνευση του SARS-CoV-2, όχι για άλλους ιούς ή παθογόνους παράγοντες.
- Ακολουθείτε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές, φοράτε γάντια μίας χρήσης χωρίς πούδρα, εργαστηριακή ποδιά και προστατευτικά γυαλιά κατά το χειρισμό των δειγμάτων.
- Μην καταναλώνετε φαγητό ή ποτό και μην καπνίζετε όταν χειρίζεστε αντιδραστήρια και ανθρώπινα δείγματα.

9. Διεξαγωγή του τεστ (δοκιμασίας)

9.1 Ρύθμιση αντίδρασης

Η προετοιμασία του μείγματος πραγματοποιείται στην περιοχή προ-ενίσχυσης (θάλαμος PCR κατά προτίμηση) για την αποφυγή μόλυνσης με σετ πιπετών που δεν χρησιμοποιούνται για την προσθήκη υποστρωμάτων παρά μόνο του αρνητικού μάρτυρα που περιέχεται στο κιτ. Ιδανικά ακόμα και τον εσωτερικό θετικό μάρτυρα, μαζί με τα δείγματα θα πρέπει να προστίθενται σε άλλο χώρο και με άλλο σετ πιπετών.

- Η απόψυξη των συστατικών της συσκευασίας γίνεται σε πάγο (0-4°C).
- Μετά την απόψυξη, πραγματοποιείται ανακίνηση με συσκευή τύπου vortex για 10 δευτερόλεπτα στις 3000 rpm για το 10x Μείγμα Εκκινητών_SARS COV2, το 10x Μείγμα Ιχνηθετών_SARS COV2, το 5x ρυθμιστικό διάλυμα RT-PCR ενός βήματος και το Πρότυπο SARS COV2 (+), 5cp/μl, και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 δευτερόλεπτα στα 2,000 g για κάθε υλικό.
- 20x ενζυμικό μείγμα SARS COV2 ανακινείται στις 1200 rpm για 5 δευτερόλεπτα, ανακινείται ελαφρά χτυπώντας με το δάχτυλο εξωτερικά το φυαλίδιο και φυγοκεντρείται για 10 δευτερόλεπτα στα 2.000 g. Ιδανικά όλες οι φυγοκεντρήσεις να γίνονται στους 4 °C.
- Προετοιμασία Μείγματος Δοκιμασίας:
 - Παρασκευάζεται μείγμα δοκιμασίας σε ξεχωριστά σωληνάρια PCR σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα.

Στοιχεία μείγματος δοκιμασίας*	1 Αντίδραση (Συνολικός όγκος : 16 $\mu\ell$)	Όγκοι για δείγματα N ($\mu\ell$)
5x ρυθμιστικό διάλυμα RT-PCR ενός βήματος	4 $\mu\ell$)	4 x (N+5%N)
10x Μείγμα Εκκινητών_SARS COV2,	2 $\mu\ell$)	2 x (N+5%N)
10x Μείγμα Ιχνηθετών_SARS COV2	2 $\mu\ell$)	2 x (N+5%N)
20x μείγμα ενζύμων ενός βήματος για RT SARS COV2	1 $\mu\ell$)	1 x (N+5%N)
Νερό Ελεύθερο Νουκλεάσης	7 $\mu\ell$)	7 x (N+5%N)

Πίνακας 4. Σύσταση αντίδρασης και προετοιμασία συγκεντρωτικού διαλύματος πολλαπλών αντιδράσεων.

* Μείγμα για N αριθμό αντιδράσεων

- ii. Αναμίξτε με πιπέτα και πραγματοποιήστε σύντομη φυγοκέντρηση. Μεταφέρετε με πιπέτα 16 $\mu\ell$ από το συγκεντρωτικό διάλυμα (Master mix) δοκιμασίας σε συμβατά με αντίδραση PCR αληθινού χρόνου μικροφιαλίδια ή πλάκα 96 υποδοχών. Προσθέστε 4 $\mu\ell$ από το νερό (αρνητικό μάρτυρα) και καλύψτε τα φιαλίδια ή τις αντίστοιχες υποδοχές στην πλάκα. Μεταφέρετε την πλάκα ή τα φιαλίδια στην περιοχή επεξεργασίας του δείγματος. Η προσθήκη του δείγματος θα πρέπει να πραγματοποιείται στην περιοχή επεξεργασίας του δείγματος.
- iii. Προσθέστε 4 $\mu\ell$ του εξαχθέντος RNA, ή θετικού μάρτυρα, στις υποδοχές που είναι προ-γεμισμένες με τα μείγματα της δοκιμασίας. Εάν πρέπει να συμπεριληφθεί μεγαλύτερος όγκος υποστρώματος, ρυθμίστε ανάλογα τον όγκο νερού.

Ο όγκος εξαχθέντος RNA + ο όγκος νερού πρέπει να ισούται με 11 $\mu\ell$.

Π.χ., εάν σε κάθε αντίδραση χρειάζεται να συμπεριληφθούν 5 $\mu\ell$, προσθέστε μόνο 11-5= 6 $\mu\ell$ νερού ελεύθερου από νουκλεάση αντί για 7 σε κάθε αντίδραση και διαμερισμός ποσότητας 15 $\mu\ell$ μείγματος δοκιμασίας σε κάθε υποδοχή πριν από την προσθήκη προτύπου.

Σημείωση

Ιδανικά πρώτα να τοποθετείται το υπόστρωμα του νερού και να καλύπτονται τα αντίστοιχα φιαλίδια, μετά τα υπό εξέταση RNA υποστρώματα και να καλύπτονται τα φιαλίδια τους και τελευταίος ο θετικός μάρτυρας του kit για την αποφυγή επιμολύνσεων.

9.2 Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR σε πραγματικό χρόνο

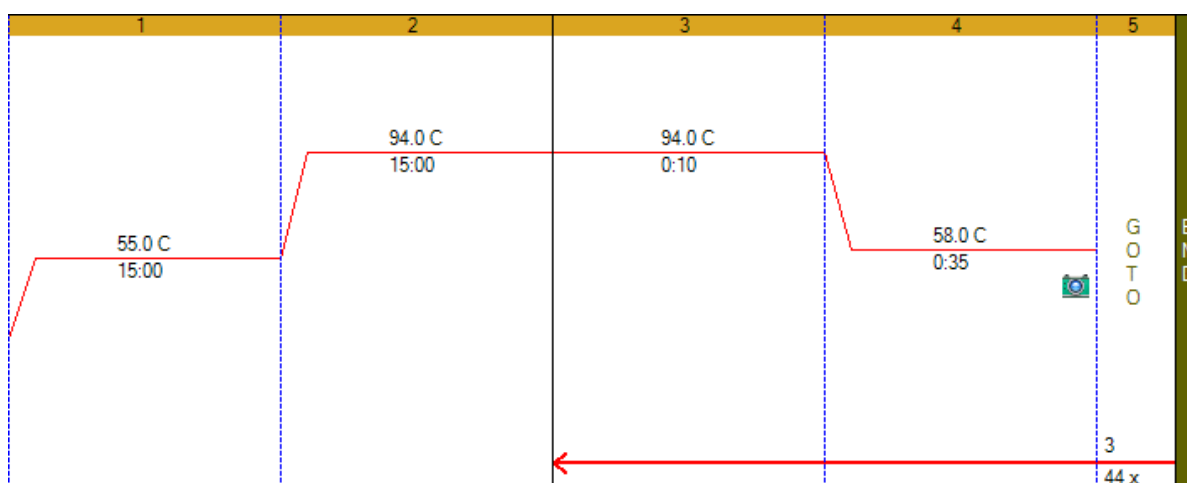
Για κάθε όργανο και λογισμικό PCR, εισαγάγετε τις ακόλουθες ρυθμίσεις της δοκιμασίας για το κιτ EnzyQuest SARS-CoV-2 RT-qPCR.

① Εισαγάγετε τον όγκο αντίδρασης 20 μL και τροποποιήστε τις συνθήκες αντίδρασης PCR που παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
RT	55°C	15 min	1
Επώαση	94°C	10-15 min *	1
Ενίσχυση	94°C	10 sec	45
	58°C	35 sec	

Πίνακας 5. Πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης.

* Για βέλτιστη απόδοση διατηρήστε τη διάρκεια επώασης για 15 λεπτά. Η επώαση για 10 λεπτά οδηγεί σε μειωμένη αποτελεσματικότητα ενίσχυσης.



**Μετρήστε τον φθορισμό στους 58°C (Διάλυτοι FAM, HEX και Cy5).

10. Ανάλυση Δεδομένων

10.1 Ερμηνεία αποτελεσμάτων ελέγχων

Συμπεριλάβετε μία θετική και μία αρνητική αντίδραση μάρτυρα σε κάθε σειρά αντιδράσεων. Το κιτ περιλαμβάνει 1 θετικό μάρτυρα για κάθε 14 αντιδράσεις του κιτ. Μια διαδικασία PCR θεωρείται έγκυρη εάν και οι δύο μάρτυρες (ένας θετικός και ένας αρνητικός ανά διαδικασία) πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής:

- Ο αρνητικός μάρτυρας είναι «έγκυρος» εάν δεν ανακτηθεί C_q ή αν όλες οι τιμές C_q των τριών γονιδίων-στόχων είναι μεγαλύτερες από 40.

- Ο θετικός μάρτυρας είναι «έγκυρος» εάν οι τιμές C_q των γονιδίων E και N - στόχων είναι μικρότερες ή ίσες με 40 και για τον εσωτερικό μάρτυρα (IPC) μικρότερο ή ίσο από 38.
- Η βασική γραμμή, βάσει της οποίας προκύπτουν τα C_q θα πρέπει να τοποθετείται αυτόματα από το πρόγραμμα CFX manager. Σε περίπτωση που γίνεται χειροκίνητη τοποθέτηση, θα πρέπει να τοποθετείται από έμπειρο χρήστη στη μέση της εκθετικής φάσης αύξησης των αντιδράσεων ή στην περιοχή κατά την οποία έχει ανακτηθεί η μέγιστη απόδοση του κιτ (350 μονάδες σχετικού φθορισμού -RFUs για τα FAM και HEX). Αυτόματη επιλογή βασικής γραμμής κάτω από 350 RFUs είναι αποδεκτή, ενώ χειροκίνητη μεταβολή κάτω από αυτό το όριο μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Έγκυρα Κριτήρια Μαρτύρων				
Τύπος Μάρτυρα	HEX (γονίδιο N ₁)	FAM (γονίδιο E ₁)	Cy5 (γονίδιο RPP30 ₁)	Ερμηνεία
Αρνητικό	>40	>40	>38	Έγκυρο
Θετικό	≤40	≤40	≤38	Έγκυρο

Πίνακας 6. Αποδεκτά όρια μαρτύρων.

10.2 Ερμηνεία Αποτελεσμάτων Δειγμάτων.

Το δείγμα θεωρείται θετικό εάν η καμπύλη HEX ή/και η καμπύλη FAM εμφανίζει τιμή Ct ≤ 40 ανεξάρτητα από την τιμή Cy5 Ct.

Το δείγμα θεωρείται αρνητικό εάν και η καμπύλη HEX και η καμπύλη FAM εμφανίζουν τιμή Ct > 40, ενώ η καμπύλη Cy5 εμφανίζει τιμή Ct ≤ 40.

Ανάλυση Δείγματος			
HEX (γονίδιο N ₁)	FAM (γονίδιο E ₁)	Cy5 (γονίδιο RPP30 ₁)	Ερμηνεία
≤40	≤40	≤38	Θετικό για SARS COV2
Χωρίς Ct ή >40	≤40	≤38	
≤40	Χωρίς Ct ή >40	≤38	
Χωρίς Ct ή >40	Χωρίς Ct ή >40	≤38	Αρνητικό για SARS COV2
Χωρίς Ct ή >40	Χωρίς Ct ή >40	Χωρίς Ct ή >38	Μη έγκυρο αποτέλεσμα**
≤40	Χωρίς Ct ή >40	Χωρίς Ct ή >38	Δυνητικά Θετικό για SARS COV2/ Πολύ υψηλό ιικό φορτίο σε κακής ποιότητας δείγμα RNA*
Χωρίς Ct ή >40	≤40	Χωρίς Ct ή >38	Δυνητικά Θετικό για SARS COV2/ Πολύ υψηλό ιικό φορτίο σε κακής ποιότητας δείγμα RNA*

Πίνακας 7. Αποδεκτά όρια τέρστ.

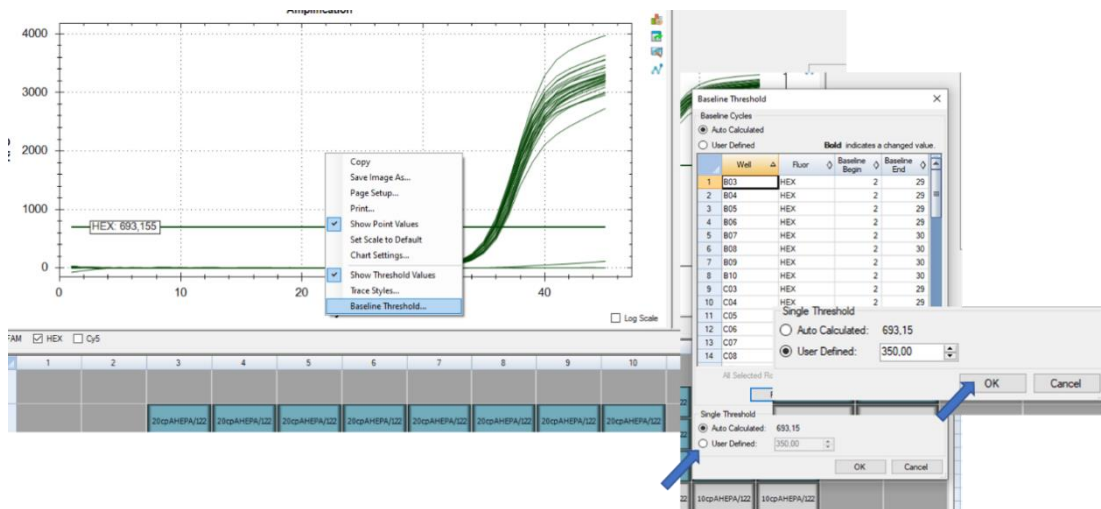
**Επανάληψη εξαγωγής RNA και ισχυρή σύσταση για νέα αντίδραση RT-PCR. Εάν το αποτέλεσμα επιμείνει, συνιστάται επαναδειγματοληψία και εκ νέου εξέταση.*

***Επανάληψη εξαγωγής RNA και ισχυρή σύσταση για νέα αντίδραση RT-PCR. Εάν το αποτέλεσμα επιμείνει, συνιστάται επαναδειγματοληψία και εκ νέου εξέταση. Το σφάλμα δειγματοληψίας που οδηγεί σε ολική αναστολή μπορεί να είναι οι αιτίες αυτού του αποτελέσματος.*

Η βασική γραμμή, βάσει της οποίας προκύπτουν τα C_q θα πρέπει να τοποθετείται αυτόματα από το πρόγραμμα CFX manager. Σε περίπτωση που γίνεται χειροκίνητη τοποθέτηση, θα πρέπει να τοποθετείται από έμπειρο χρήστη στη μέση της εκθετικής φάσης αύξησης των αντιδράσεων ή στην περιοχή κατά την οποία έχει ανακτηθεί η μέγιστη απόδοση του κιτ (350 μονάδες σχετικού φθορισμού -RFUs για τα FAM και HEX). Αυτόματη επιλογή βασικής γραμμής κάτω από 350 RFUs είναι αποδεκτή, ενώ χειροκίνητη μεταβολή κάτω από αυτό το όριο μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Τρόπος μεταβολής στο CFX manager:

- Δεξί κλικ πάνω στο γράφημα και επιλογή “Baseline Threshold”
- Επιλογή “user defined”
- Πληκτρολόγηση του 350 και αποδοχή.



Εναλλακτικά επιλέξτε την λογαριθμική κλίμακα και εκεί χειροκίνητα μετακινήστε τη γραμμή ώστε να είναι στο μέσο της λογαριθμικής φάσης της/των αντιδράσεων !!! Μετακίνηση της γραμμής κάτω από το όριο 350 RFUs μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη αξιολόγηση αποτελεσμάτων!!! Πάντα πρέπει να γίνεται από άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό και να συν-αξιολογούνται ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας!!

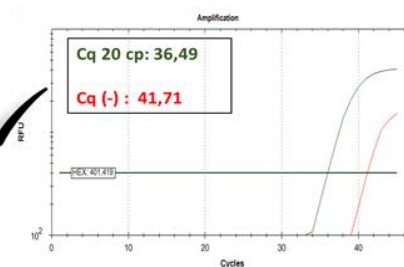
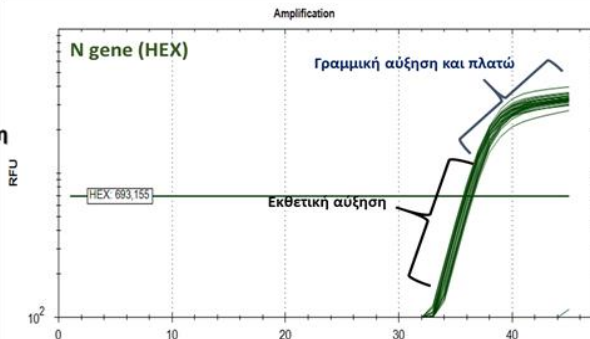
Παράδειγμα ανάλυσης αποτελέσματος:

Βασική γραμμή

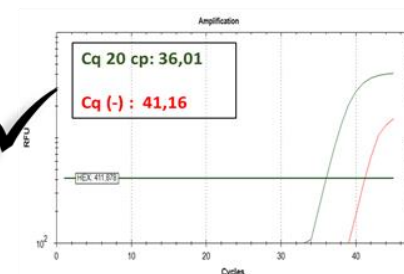
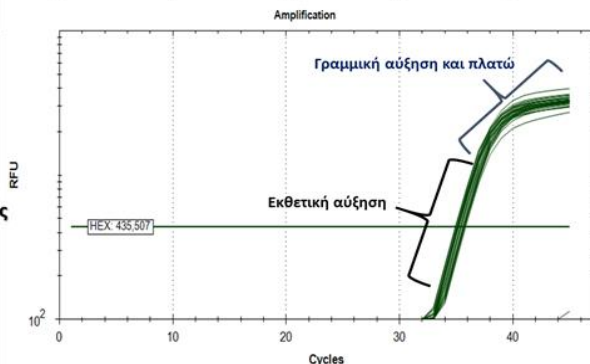
Λογαριθμική κλίμακα

Ανάλυση αποτελέσματος κατά τον πίνακα 7.

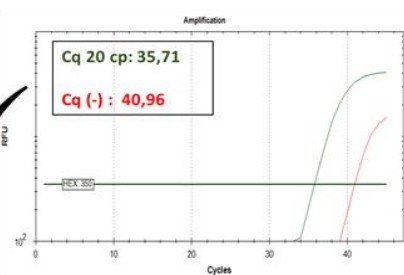
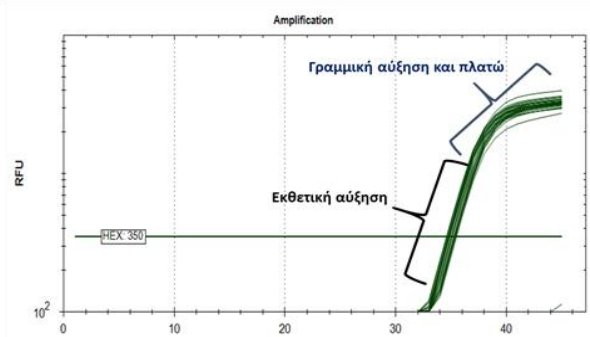
Αυτόματη



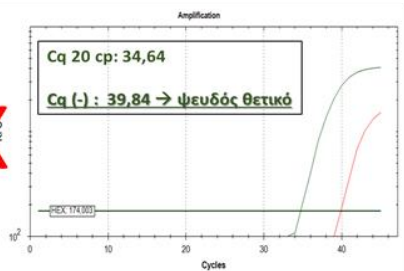
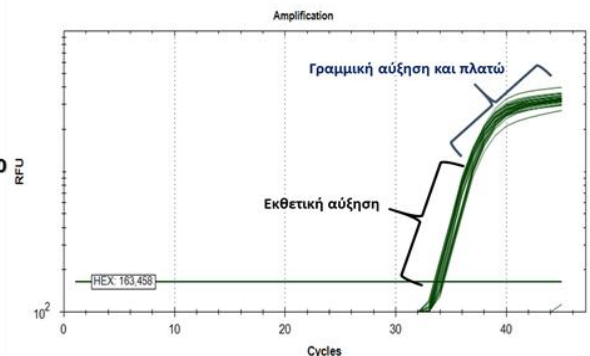
Χειροκίνητη
Στο μέσο της
λογαριθμικής



Χειροκίνητη
Στα 350 RFU



Χειροκίνητη
Κάτω από 350
RFUs



Αριστερά: Καμπύλη φθορισμού HEX σε δοκιμή 24 επαναλήψεων δειγμάτων RNA (απομονωμένα με το κιτ της Macherey Nagel) στα οποία έχουν προστεθεί 20 SARS COV2 μετάγραφα/αντίδραση (4 μl από δείγμα με 5 μετάγραφα/ μL. Επισημαίνονται οι διαφορετικές φάσεις και οι συνιστάμενες τοποθετήσεις της βασικής γραμμής.

Δεξιά: Καμπύλη φθορισμού HEX, θετικού μάρτυρα του κιτ (πράσινο) και επιβεβαιωμένου αρνητικού δείγματος RNA (κόκκινο χρώμα). Με βάση τα κριτήρια αξιολόγησης του πίνακα 7, μόνο με τις συνιστάμενες τοποθετήσεις της βασικής γραμμής επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα. Σε περίπτωση χειροκίνητης πρωτοβουλίας για πολύ χαμηλή τοποθέτηση θα προέκυπτε αντίστροφο αποτέλεσμα. Να σημειωθεί ότι τόσο στις αναλύσεις αρνητικά επιβεβαιωμένων δειγμάτων RNA όσο και συνθετικών RNA δειγμάτων η παραπάνω εικόνα στα δεξιά είναι εξαιρετικά σπάνια.

11. Αξιολόγηση Απόδοσης

11.1 Ευαισθησία Ανάλυσης (Όριο Ανίχνευσης)

Το Όριο Ανίχνευσης (LoD) του κιτ EnzyQuest SARS-CoV-2 RT-qPCR καθορίστηκε με τη χρήση μεταγραφών συνθετικών RNA του SARS CoV2 εμπλουτισμένων σε δύο διαφορετικές μήτρες: σε νερό ελεύθερο νουκλεάσης και σε διάλυμα που προέκυψε από ανάμιξη κλινικών δειγμάτων RNA αρνητικών για COVID-19 (παραχωρήθηκαν από το Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ στο πλαίσιο των αντίστοιχων Κλινικών Μελετών). Όλες οι σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις Οδηγίες Χρήσης που παρέχονται στο παρόν έγγραφο, στο Bio-Rad CFX96™/T100 Σύστημα Οργάνων Ανίχνευσης Νουκλεϊκών Οξέων (PCR) σε πραγματικό χρόνο με πρόσθετες δοκιμές στο Qiagen Rotor-Gene Q.

Η αποδοτικότητα του κιτ θα πρέπει να επικυρωθεί από έμπειρο χρήστη, εάν χρησιμοποιείται άλλος εξοπλισμός.

Το Όριο Ανίχνευσης (LoD) επιβεβαιώθηκε με την εξέταση εικοσιτεσσάρων ή τριάντα επαναλήψεων διαφορετικών συγκεντρώσεων COVID-19 RNA με χρήση τριών παρτίδων συσκευασίας σε ένα πείραμα αραιώσης προτύπου COVID-19 μεταγράφων είτε σε εργαστηριακά παρασκευασμένα δείγματα RNA, είτε σε μήτρα αρνητικού στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος που εμπλουτίστηκε ανεξάρτητα. 5 διαφορετικές αραιώσεις προετοιμάστηκαν ώστε να εκτελεστούν δοκιμές σε 20, 10, 7.5, 5 και 2.5 μετάγραφα ανά αντίδραση (συγκέντρωση 1000, 500, 375, 250 και 125 μετάγραφα ανά ml RNA υποστρώματος αντίστοιχα). Το τελικό όριο ανίχνευσης (LoD) που βασίζεται στην ερμηνεία αποτελεσμάτων της μελέτης είναι 5 μετάγραφα /αντίδραση (250 cp/ml RNA υποστρώματος). Τα αποτελέσματα παρατίθενται συνοπτικά στον παρακάτω Πίνακα

Πίνακας 8. Όριο ανίχνευσης του κιτ.

	Όριο ανίχνευσης του κιτ (μετάγραφα/αντίδραση)		Φθορίζουσες χρωστικές			
	Τεχνητό RNA υπόστρωμα	RNA εκχυλίσματα ρινοφαρυγγικά	Όριο ανίχνευσης E gene (FAM) σε μετάγραφα/αντίδραση		Όριο ανίχνευσης N gene (HEX) σε μετάγραφα/αντίδραση	
Περιέχει	5 ng/μl HeLa RNA, 20 ng/μl Carrier RNA	Ανάμειξη πολλών RNA εκχυλισμένων από επιβεβαιωμένα αρνητικά δείγματα (ΑΧΕΠΑ)	Τεχνητό RNA υπόστρωμα	RNA εκχυλίσματα ρινοφαρυγγικά	Τεχνητό RNA υπόστρωμα	RNA εκχυλίσματα ρινοφαρυγγικά
Παρτίδα 1	5	5	7,5	20	7,5	20
Παρτίδα 2	5	2,5	7,5	7,5	7,5	2,5
Παρτίδα 3	2,5	2,5	5	7,5	5	5

Το όριο ανίχνευσης είναι η αραιώση κατά την οποία το κιτ ανίχνευσε ως θετικά το 95 % των δοκιμαζόμενων υποστρωμάτων. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε τόσο με αυτόματα ορισμένη από το λογισμικό βασική γραμμή όσο και με χειροκίνητα τοποθετημένη στα 350 RFUs.

11.2 Αναλυτική Αντιδραστικότητα (συμπεριληπτικότητα)

Το εργαλείο Primer Checker χρησιμοποιήθηκε σε αναζήτηση εκκινητών και ιχνηθετών στη βάση δεδομένων GISAID με τη βοήθεια υπολογιστή έναντι 560.259 αλληλουχιών υψηλής ποιότητας γονιδιωμάτων SARS-CoV-2 που υποβλήθηκαν κατά τη διάρκεια περιόδου που εκτείνεται από 30/03/2021 έως 29/06/2021.

- Οι συγκρίσεις για τον πρόσθιο εκκινητή του γονιδίου E αποκάλυψαν 100% ομολογία για το 99.99% των αλληλουχιών. Εντοπίστηκαν αναντιστοιχίες μεταξύ μονών και διπλών νουκλεοτιδίων σε 695 (0,12%) και σε 3 (0,00054%) αλληλουχίες γονιδιωμάτων αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση του αντίστροφου εκκινητή του γονιδίου E, εντοπίστηκαν μόνο μονές αναντιστοιχίες σε 95 (0,017%) αλληλουχίες
- Οι συγκρίσεις για τον πρόσθιο εκκινητή του γονιδίου N αποκάλυψαν 100% ομολογία για το 99.99% των αλληλουχιών. Εντοπίστηκαν αναντιστοιχίες μονού και διπλού νουκλεοτιδίου σε 1627 (0,29%) και 2 (0,00036%) αλληλουχίες γονιδιώματος, αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση του αντίστροφου εκκινητή του γονιδίου N, εντοπίστηκαν μεμονωμένες αναντιστοιχίες σε 1244 (0,22%) αλληλουχίες, καθώς και σε 1 (0,00018%) ασυμφωνία διπλού νουκλεοτιδίου.
- Τα αποτελέσματα για τον ιχνηθέτη του γονιδίου E είναι 135 (0,024%) μεμονωμένες μεταλλάξεις, 5 (0,0009%) διπλές μεταλλάξεις και 1 (0,00018%) με έξι μεταλλάξεις.
- Τα αποτελέσματα για τον ιχνηθέτη του γονιδίου N είναι 9287 (1,66%) μεμονωμένες μεταλλάξεις και 20 (0,0036%) διπλές μεταλλάξεις.

Δεν αναμένεται να επηρεαστεί η αντιδραστικότητα των ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές και ιχνηθέτες) που περιλαμβάνονται στο kit EnzyQuest SARS-CoV-2 RT qPCR.

11.2 Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για τους εκκινητές και τους ιχνηθέτες αξιολογήθηκε με τη βοήθεια υπολογιστή με χρήση BLASTn για μικρές αλληλουχίες έναντι 38 ιών και βακτηρίων (συμπεριλαμβανομένων διαφόρων ανθρώπινων κορωνοϊών και αδενοϊών, του στρεπτόκοκκου, του ιού της παραγρίπης κ.λπ.). Η τιμή e ορίστηκε σε 10⁻⁶. Δεν βρέθηκε σημαντική σύμπτωση με κανέναν από τους 38 οργανισμούς.

Αριθ.	Ιών & Βακτηρίων που αναλύθηκαν με τη βοήθεια υπολογιστή	Προσχώρηση στη GenBank
1	Ανθρώπινος Κορωνοϊός 229E, πλήρες γονιδίωμα	NC_002645.1
2	Ανθρώπινος Κορωνοϊός HKU1, πλήρες γονιδίωμα	NC_006577.2
3	Ανθρώπινος Κορωνοϊός OC43 στέλεχος ATCC VR-759, πλήρες γονιδίωμα	NC_006213.1
4	Ανθρώπινος Κορωνοϊός NL63, πλήρες γονιδίωμα	NC_005831.2
5	Κορωνοϊός isolate HCoV-EMC/2012 συνδεδεμένος με το αναπνευστικό σύνδρομο της Μέσης Ανατολής, πλήρες γονιδίωμα	NC_019843.3
6	Ανθρώπινος Αδενοϊός 2, πλήρες γονιδίωμα	AC_000007.1
7	Ανθρώπινος Μεταπνευμονοϊός isolate 00-1, πλήρες γονιδίωμα	NC_039199.1
8	Ιός της Παραγρίπης των αιγοπροβάτων 3 στέλεχος JS2013, πλήρες γονιδίωμα	NC_028362.1
9	Ανθρώπινος rubulavirus 2, πλήρες γονιδίωμα	NC_003443.1
10	Παράγοντας σαν τον ιό της Ηπατίτιδας Δέλτα (HDV) των πτηνών, πλήρες γονιδίωμα	NC_040845.1
11	Ιός της ηπατίτιδας A, πλήρες γονιδίωμα	NC_001489.1
12	Ιός Vibrio vB_VspP_SBP1, πλήρες γονιδίωμα	NC_055784.1
13	Ανθρώπινος Αδενοϊός A, πλήρες γονιδίωμα	NC_001460.1
14	Ανθρώπινος Αδενοϊός D, πλήρες γονιδίωμα	NC_010956.1
15	Ανθρώπινος Αδενοϊός F, πλήρες γονιδίωμα	NC_001454.1
16	Ανθρώπινος Αδενοϊός D, πλήρες γονιδίωμα	AC_000006.1
17	Ανθρώπινος Αδενοϊός C, πλήρες γονιδίωμα	NC_001405.1
18	Ανθρώπινος Αδενοϊός E, πλήρες γονιδίωμα	NC_003266.2
19	Ανθρώπινος mastadenovirus A, πλήρες γονιδίωμα	AC_000005.1
20	Ανθρώπινος Ιός Παραγρίπης 3, πλήρες γονιδίωμα	NC_001796.2
21	Ανθρώπινος Ιός Παραγρίπης 1, πλήρες γονιδίωμα	NC_003461.1
22	Ιός Παραγρίπης 5, πλήρες γονιδίωμα	NC_006430.1
23	Χλαμύδια του τραχώματος D/UW-3/CX χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NC_000117.1
24	Στέλεχος Haemophilus influenzae Hi375 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP009610.1

25	Στέλεχος Legionella pneumophila Pontiac χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP016029.2
26	Στέλεχος Streptococcus pneumoniae BVJ1JL χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP071871.1
27	Στέλεχος Streptococcus pyogenes H293 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_HG316453.1
28	Στέλεχος Bordetella pertussis Pelita III χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP019957.1
29	Στέλεχος Μυκόπλασμα της πνευμονίας C267 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP014267.1
30	Στέλεχος κλωστηρίδιο το διαθλαστικό FDAARGOS_903 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP065681.1
31	Στέλεχος της Escherichia coli WS3294A χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP035819.1
32	Στέλεχος Listeria monocytogenes IZSAM_Lm_hs2008 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP010346.1
33	Norovirus GV, πλήρες γονιδίωμα	NC_008311.1
34	Στέλεχος Salmonella enterica 2012K-0845 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP053579.1
35	Στέλεχος Bacillus cereus VKM B-370 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP070339.1
36	Στέλεχος Clostridium botulinum CJ0611A1 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP059677.1
37	Shigella sp. PAMC 28760 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP014768.1
38	Στέλεχος χρυσίζων σταφυλόκοκκος (Staphylococcus aureus) EDCC5464 χρωμόσωμα, πλήρες γονιδίωμα	NZ_CP022291.1

Πίνακας 9. Μολυσματικοί παράγοντες που δεν ανιχνεύονται με το κιτ.

11.3 Επαναληψιμότητα

Η ακρίβεια του κιτ EnzyQuest SARS-CoV-2 RT-qPCR αξιολογήθηκε ως:

- Καθημερινή επαναληψιμότητα. Ένας χειριστής ανέλυσε 18 επαναλήψεις δύο αραιώσεων (10 και 200 αντίγραφα ανά αντίδραση), για 4 ημέρες.
- Επαναληψιμότητα μεταξύ παρτίδων. Ένας χειριστής ανέλυσε 18 επαναλήψεις δύο αραιώσεων (10 και 200 αντίγραφα ανά αντίδραση) χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικές παρτίδες συσκευασίας.
- Επαναληψιμότητα χειριστή. Δύο διαφορετικοί χειριστές ανέλυσαν επαναλήψεις κάθε δείγματος (10 και 200 αντίγραφα ανά αντίδραση).
- Επαναληψιμότητα σε ένα πείραμα. Ένας χειριστής ανέλυσε 36 επαναλήψεις δύο αραιώσεων δειγμάτων (10 και 200 αντίγραφα ανά αντίδραση).

Ακρίβεια του kit EnzyQuest SARS-CoV-2 RT-qPCR, για τα γονίδια E και N.

Μεταβλητή που δοκιμάστηκε

Πειραματική επαναληψιμότητα		E gene (FAM)		N gene (HEX)	
Μια παρτίδα, 36 επαναλήψεις από κάθε αραιώση στην ίδια δοκιμή	Μετάγραφα ανά αντίδραση	10	200	10	200
	n (συνολικός αριθμωv αντιδράσεων)	36	36	36	36
	Μέση τιμή C _q	37,80	33,09	37,69	33,16
	Συντελεστή Μεταβλητότητας (CI 95 %)	0,32	0,05	0,16	0,04
	Ανίχνευση επαναλήψεων (%)	100	100	100	100

Καθημερινή επαναληψιμότητα		E gene (FAM)		N gene (HEX)	
4 ημέρες, μία παρτίδα, 18 επαναλήψεις σε κάθε αραιώση	Μετάγραφα ανά αντίδραση	10	200	10	200
	n (συνολικός αριθμωv αντιδράσεων)	72	72	72	72
	Μέση τιμή C _q	37,92	33,07	37,73	33,13
	Συντελεστή Μεταβλητότητας (CI 95 %)	0,22	0,05	0,11	0,04
	Ανίχνευση επαναλήψεων (%)	98,61	100	98,61	100

Επαναληψιμότητα μεταξύ παρτίδων		E gene (FAM)		N gene (HEX)	
3 παρτίδες, 18 επαναλήψεις σε κάθε αραιώση	Μετάγραφα ανά αντίδραση	10	200	10	200
	n (συνολικός αριθμωv αντιδράσεων)	54	54	54	54
	Μέση τιμή C _q	37,66	32,85	37,46	32,94
	Συντελεστή Μεταβλητότητας (CI 95 %)	0,28	0,08	0,18	0,07
	Ανίχνευση επαναλήψεων (%)	100	100	100	100

Επαναληψιμότητα μεταξύ χειριστών		E gene (FAM)		N gene (HEX)	
2 χειριστές, 1 παρτίδα, 18 επαναλήψεις σε κάθε αραιώση	Μετάγραφα ανά αντίδραση	10	200	10	200
	n (συνολικός αριθμωv αντιδράσεων)	36	36	36	36
	Μέση τιμή C _q	37,79	33,07	37,72	33,09
	Συντελεστή Μεταβλητότητας (CI 95 %)	0,26	0,08	0,14	0,06
	Ανίχνευση επαναλήψεων (%)	100	100	100	100

Πίνακας 10. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας

11.4. Κλινική Αξιολόγηση

Για την κλινική επικύρωση εκατόν είκοσι (120) αναδρομικά, κλινικά δείγματα που έχουν αποαναγνωρισθεί ελέγχθηκαν και αξιολογήθηκαν από το νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ (Θεσσαλονίκη, Ελλάδα). Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία σύμφωνα με την αντίστοιχη κλινική μελέτη που διενεργήθηκε από το Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ). Οι δοκιμές συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα

Χρησιμοποιηθείσα δοκιμασία		Δοκιμασία Πιστοποιημένη κατά CE-IVD (Abbott Real Time SARS-CoV-2 assay)	
	Τύποι δείγματος	Θετικό	Αρνητικό
SARS COV2 Συσκευασία RTQPCR	Θετικό	86	2*
	Αρνητικό	1**	79

Θετική Ποσοστιαία Συμφωνία: $86/88 = 97,73\%$ (95% CI: 92,03%-99,72%)
Αρνητική Ποσοστιαία Συμφωνία: $79/80 = 98,75\%$ (95% CI: 93.23%-99.97%) (MedCalc Software Ltd. Diagnostic test evaluation calculator)

Πίνακας 11. Κλινικά αποτελέσματα. Ευαισθησία και εξειδίκευση διάγνωσης.

*Τα θετικά δείγματα που δεν επιβεβαιώθηκαν με το κιτ ήταν στο όριο ανίχνευσης του συγκρινόμενου κιτ της εταιρίας Abbott (<https://www.molecular.abbott/us/en/products/infectious-disease/RealTime-SARS-CoV-2-Assay>)

**Ανακτήθηκε C_q : 39,76 με τοποθέτηση της βασικής γραμμής στα 350 RFUs.

12. Ποιοτικός έλεγχος:

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο σύστημα διαχείρισης ποιότητας της ENZYQUEST κατά το πρότυπο ISO 13485:2016-, κάθε παρτίδα του κιτ SARS-CoV-2 RT-qPCR έχει δοκιμαστεί βάσει προκαθορισμένων προδιαγραφών για να διασφαλιστεί η σταθερή ποιότητα του προϊόντος. Ο θετικός μάρτυρας, ο αρνητικός μάρτυρας και ο εσωτερικός μάρτυρας διασφαλίζουν την εγκυρότητα ολόκληρης της διαδικασίας ανάλυσης

- Το νερό ελεύθερο νουκλεάσης που παρέχεται στο κιτ χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας και επιβεβαιώνει την απουσία μόλυνσης καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής από την εξαγωγή του ιικού RNA έως την ενίσχυση RT-PCR σε πραγματικό χρόνο και χρησιμοποιείται μία φορά σε κάθε

διαδικασία δοκιμής. Είναι αποδεκτή η χρήση νερού απαλλαγμένου από νουκλεάση από άλλες πηγές, εάν αυτό που παρέχεται στο κιτ δεν επαρκεί.

- Το Πρότυπο SARS COV2 (+), 5cp/μl, που παρέχεται στο κιτ, χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας που περιέχει μείγμα *in vitro* μεταγεγραμμένων RNA με αλληλουχίες-στόχους των γονιδίων N και E και ανθρώπινου γονιδίου RPP30. Το τρέχον υπόστρωμα χρησιμοποιείται για Ελέγχους Ποιότητας που εκτελούνται από την ENZYQUEST PC πριν από κάθε αποδέσμευση παρτίδας και για την αξιολόγηση της εγκυρότητας του εκκινητή και του ιχνηθέτη από τον έμπειρο χρήστη.
- Το σετ εκκινητών και ιχνηθέτη του εσωτερικού μάρτυρα, που περιλαμβάνεται στο κιτ, χρησιμεύει ως μάρτυρας εξαγωγής, καθώς ανιχνεύει το ανθρώπινο γονίδιο-στόχο που υποβάλλεται σε συν-καθαρισμό με το ιικό RNA του SARS-CoV-2. Η ανίχνευση εσωτερικού μάρτυρα σε κλινικά δείγματα είναι απαραίτητη για να αξιολογηθεί εάν ολόκληρη η διαδικασία ανάλυσης είναι έγκυρη ή όχι.

13. Τεχνική υποστήριξη

Για τεχνική υποστήριξη, ερωτήσεις σχετικά με το προϊόν και παράπονα, επικοινωνήστε μαζί μας:

ENZYQUEST PC

Επιστημονικό και Τεχνολογικό Πάρκο της Κρήτης

N. Πλαστήρα 100

Βασιλικά Βουτών, ΤΚ 70013

Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

Αρχική σελίδα: <http://www.enzyquest.com>













e-mail: info@enzyquest.com

Τηλέφωνο: +30 2811 392104

14. Εμπορικά σήματα και δηλώσεις αποποίησης ευθύνης

Όλα τα εμπορικά σήματα, οι καταχωρημένες ονομασίες που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων τους.

15. Επεξήγηση συμβόλων

 Κατασκευαστής	 η Περιεχόμενο επαρκές για <n> τεστ
 Ημερομηνία λήξης ΜΜ/ΕΕΕΕ	 Θετικός μάρτυρας
 Κωδικός παρτίδας	 Διαγνωστική ιατρική συσκευή in vitro
 Αριθμός καταλόγου	 Συμβουλευτείτε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης (ιστότοπος)
 Αριθμός σειράς	 Περιορισμός θερμοκρασίας
 Μην χρησιμοποιείτε αν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά.	 Διατηρείτε μακριά από τον ήλιο (10x Μείγμα εκκινητών_SARS COV2)

16. Βιβλιογραφικές Αναφορές

Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. Τεχνική καθοδήγηση για τη νόσο του κορωνοϊού (COVID-19): Εργαστηριακές δοκιμές για τον 2019-nCoV σε ανθρώπους. 3. Μοριακές δοκιμασίες για τη διάγνωση του 2019-nCoV. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2

Προσωρινές Κατευθυντήριες Οδηγίες του CDC (Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων) για τη Συλλογή, τον Χειρισμό και τη Δοκιμή Κλινικών Δειγμάτων από Άτομα υπό Διερεύνηση (PUIs) (CDC Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons Under Investigation) για τη νόσο του Κορωνοϊού 2019 (COVID-19) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.

Alexander E Gorbalenya, Susan C Baker, Ralph S Baric, Raoul J de Groot, Christian Drosten, Anastasia A Gulyaeva, Bart L Haagmans, Chris Lauber, Andrey M Leontovich, Benjamin W Neuman, Dmitry Penzar, Stanley Perlman, Leo L M Poon, Dmitry V Samborskiy, Igor A Sidorov, Isabel Sola, John Ziebuhr. "The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2." *Nature microbiology* τόμος 5,4 (2020): 536-544.

Peng Zhou, Xing-Lou Yang, Xian-Guang Wang, Ben Hu, Lei Zhang, Wei Zhang, Hao-Rui Si, Yan Zhu, Bei Li, Chao-Lin Huang, Hui-Dong Chen, Jing Chen, Yun Luo, Hua Guo, Ren-Di Jiang, Mei-Qin Liu, Ying Chen, Xu-Rui Shen, Xi Wang, Xiao-Shuang Zheng, Kai Zhao, Quan-Jiao Chen, Fei Deng, Lin-Lin Liu, Bing Yan, Fa-Xian Zhan, Yan-Yi Wang, Geng-Fu Xiao & Zheng-Li Shi. "A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin." Nature 579, (2020): 270-273.

Gralinski, Lisa E, and Vineet D Menachery. "Return of the Coronavirus: 2019-nCoV." Viruses vol. 12,2 135. 24 Jan. 2020

MedCalc Software Ltd. Diagnostic test evaluation calculator. https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php (Version 20.019; accessed December 8, 2021)

Abbott RealTime SARS-CoV-2, REF: 09N77-095
<https://www.molecular.abbott/int/en/products/infectious-disease/RealTime-SARS-CoV-2-Assay>



ENZYQUEST P.C.
Επιστημονικό και Τεχνολογικό Πάρκο Κρήτης, Ν. Πλαστηρα 100, Βασιλικά Βουτών, 700 13
Ηράκλειο, Ελλάδα
+30 2811 392104
www.enzyquest.com