

Zestaw SARS-CoV-2 qRT-PCR
Dx Kit firmy Agilent
K1180A



Instrukcja użycia

Do stosowania w diagnostyce in vitro

Tylko na eksport. Nie do sprzedaży w Stanach Zjednoczonych.

Wersja B2, Maj 2022 r.

Tabela symboli

	Europejski znak zgodności		Przeostoga
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Numer katalogowy/kod
	Producent		Zapoznać się z instrukcją użycia
	Data ważności		Zawiera odczynnik w ilości wystarczającej na <N> testów
	Numer serii		Nie używać ponownie
	Ograniczenie temperatury		Unikalny identyfikator urządzenia
	Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej		

Uwaga dla nabywcy: Ograniczona licencja

Niniejszy produkt jest sprzedawany na podstawie umowy licencyjnej pomiędzy firmami Agilent i Life Technologies Corporation. Cena zakupu tego produktu obejmuje ograniczone, niezbywalne prawa należące do firmy Life Technologies Corporation do używania wyłącznie tej ilości produktu do testów *in vitro* w kierunku zakażenia wirusem SARS-CoV-2 u ludzi, zgodnie z instrukcją użycia dołączoną do tego produktu. Nie są przekazywane żadne inne prawa. Dalsze informacje na temat zakupu licencji na powyższy patent można uzyskać, kontaktując się pod adresem Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. E-mail: outlicensing@lifetech.com.

1 SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent Informacje o produkcie

Przeznaczenie	6
Opis produktu	7
Omówienie produktu/zasada działania oznaczenia	7
Opis etapów testu	7
Materiały kontrolne, które należy stosować z zestawem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent	7
Przebieg oznaczenia	9

2 Materiały, bezpieczeństwo i postępowanie

Materiały dostarczane	11
Odczynniki, materiały, wyposażenie i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane	12
Środki ostrożności dotyczące bezpieczeństwa	15
Przechowywanie i sposób postępowania	17
Opakowanie produktu	17
Przechowywanie i stabilność odczynników oraz sposób obchodzenia się z nimi	17
Pobieranie i obchodzenie się z próbkami oraz ich przechowywanie	17

3 Instrukcja ekstrakcji kwasów nukleinowych

Ekstrakcja kwasów nukleinowych	19
--------------------------------	----

4 Instrukcje przygotowywania reakcji qRT-PCR

Konfigurowanie doświadczenia qRT-PCR i systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym	21
Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia AriaMx/AriaDx (wymagane, jeśli szablon nie został jeszcze utworzony)	22
Tworzenie doświadczenia AriaMx/AriaDx na podstawie zapisanego szablonu	27
Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia ABI 7500 Fast (wymagane, jeśli szablon nie został jeszcze utworzony)	27
Tworzenie doświadczenia ABI 7500 Fast na podstawie zapisanego szablonu	33
Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (wymagane, jeśli nie utworzono jeszcze zapisanego protokołu i plików płytki)	34
Tworzenie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR z użyciem zapisanego protokołu i plików płytki	40
Przygotowywanie reakcji qRT-PCR	41

5 Instrukcje przeprowadzania reakcji qRT-PCR

Wykonywanie reakcji qRT-PCR w systemie Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System	46
Uruchomienie programu reakcji qRT-PCR w systemie AriaMx/AriaDx	46
Przypisanie ustawień analizy danych dla doświadczenia AriaMx/AriaDx	47
Eksportowanie danych z oprogramowania Aria	51

Wykonywanie reakcji qRT-PCR na urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym ABI 7500 Fast	54
Uruchamianie programu reakcji qRT-PCR na urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym ABI 7500 Fast	54
Przypisanie ustawień analizy danych dla doświadczenia ABI 7500 Fast	54
Eksportowanie danych z tabeli dołków w oprogramowaniu Design & Analysis do pliku CSV	59
Wykonywanie reakcji qRT-PCR w systemie Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	61
Uruchomienie programu reakcji qRT-PCR w systemie CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	61
Przypisanie ustawień analizy danych dla systemu CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	61
Eksportowanie danych z oprogramowania CFX Maestro	66

6 Analiza i wyniki

Interpretacja wyników	69
Wyniki i interpretacja w przypadku próbek kontrolnych	69
Wyniki i interpretacja w przypadku próbek klinicznych	70

7 Kontrola jakości

Kontrola jakości	73
------------------	----

8 Ograniczenia oznaczenia

Ograniczenia	75
--------------	----

9 Charakterystyka działania

Charakterystyka działania	77
Czułość analityczna (granica wykrywalności)	77
Zakres zastosowania testu	78
Reaktywność krzyżowa	78
Ocena kliniczna	79

10 Materiały referencyjne

Etykiety produktu	81
-------------------	----

1

SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent Informacje o produkcie

Przeznaczenie **6**

Opis produktu **7**

Przebieg oznaczenia **9**

Niniejszy rozdział zawiera informacje wprowadzające dotyczące oznaczenia.

Przeznaczenie

SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent to test RT-PCR w czasie rzeczywistym do diagnostyki w warunkach in vitro przeznaczony do jakościowego wykrywania RNA wirusa SARS-CoV-2 wyizolowanego z próbek wymazu z jamy nosowo-gardłowej (NG), nosa i jamy ustno-gardłowej (UG) pobranych od osób, które spełniają kryteria kliniczne i (lub) epidemiologiczne zachorowania na COVID-19*.

Wyniki są przeznaczone do identyfikacji RNA wirusa SARS-CoV-2. RNA wirusa SARS-CoV-2 jest zasadniczo wykrywane w próbkach pobranych z górnych dróg oddechowych podczas ostrej fazy zakażenia. Wyniki dodatnie wskazują na występowanie RNA wirusa SARS-CoV-2. Do określenia statusu zakażenia u pacjenta konieczna jest korelacja kliniczna z wywiadem medycznym pacjenta i innymi informacjami diagnostycznymi. Dodatnie wyniki nie wykluczają zakażenia bakteryjnego ani koinfekcji innymi wirusami. Wykryty czynnik chorobotwórczy może nie być ostateczną przyczyną choroby.

Ujemne wyniki nie wykluczają zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie powinny być wykorzystywane jako jedyna podstawa do podejmowania decyzji dotyczących leczenia pacjenta. Wyniki ujemne muszą zostać połączone z innymi obserwacjami klinicznymi, wywiadem medycznym pacjenta oraz informacjami epidemiologicznymi.

Zestaw SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent jest przeznaczony do stosowania przez wykwalifikowany i przeszkolony personel laboratoriów, który otrzymał szczegółowe instrukcje i został przeszkolony w zakresie korzystania z systemu firmy Agilent i procedur diagnostycznych przeprowadzanych metodą in vitro.

* Wydajność oznaczenia z zastosowaniem zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent określono, wykorzystując próbki wymazu z jamy nosowo-gardłowej pobrane na podłoże transportowe UTM lub VCM. Probki wymazów z jamy ustno-gardłowej, nosa oraz ze środkowej części małżowiny nosowej to akceptowalne rodzaje próbek do stosowania wraz z oznaczeniem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent, jednak wydajność w ich przypadku nie została ustalona. Badanie wymazów z jamy ustno-gardłowej, nosa i ze środkowej części małżowiny nosowej (pobieranych samodzielnie pod nadzorem lub przez pracownika służby zdrowia) jest ograniczone do pacjentów z objawami COVID-19.

Opis produktu

Omówienie produktu/zasada działania oznaczenia

SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent to test łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR). Zestaw(y) starterów i sond dla wirusa SARS-CoV-2 opracowano w celu wykrywania RNA wirusa SARS-CoV-2 w próbkach wymazów z jamy nosowo-gardłowej (NG), nosa i jamy ustno-gardłowej (UG) pobranych od pacjentów, u których lekarz podejrzewa COVID-19.

Opis etapów testu

Kwasy nukleinowe są izolowane i oczyszczane z ok. 140–200 µl (w zależności od metody ekstrakcji) próbki wymazu z jamy nosowo-gardłowej (NG) z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu do ekstrakcji (zestaw Qiagen QIAasympphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit z systemem QIAasympphony, zestaw ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II Kit z systemem KingFisher Flex). Oczyszczony kwas nukleinowy (5 µl) jest przepisany w trakcie odwrotnej transkrypcji na cDNA, a następnie amplifikowany w trakcie jednoetapowej reakcji qRT-PCR z użyciem odczynników Brilliant III qRT-PCR firmy Agilent w obsługiwanych urządzeniach do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. W trakcie procesu sonda łączy się ze swoistą sekwencją docelową, znajdującą się pomiędzy starterami „forward” i „reverse”. W czasie fazy wydłużania w cyklu reakcji PCR aktywność nukleazowa 5’ polimerazy *Taq* powoduje degradację sondy, co prowadzi do oddzielenia barwnika reporterowego od barwnika tłumiącego i wygenerowanie sygnału fluorescencyjnego. W każdym cyklu dodatkowe cząsteczki barwnika reporterowego są odcinane od odpowiednich sond, co zwiększa intensywność fluorescencji. Intensywność fluorescencji jest monitorowana w każdym cyklu reakcji PCR przez obsługiwane urządzenia do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast lub Bio-Rad CFX96).

Materiały kontrolne, które należy stosować z zestawem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent

- Wymagane jest zastosowanie kontroli niezawierającej matrycy (ujemnej) w celu wykluczenia zanieczyszczenia w trakcie oznaczenia, które może prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich. Należy stosować co najmniej jedną kontrolę na jedną płytkę PCR. W celu uzyskania próbki kontrolnej niezawierającej matrycy użytkownik dodaje wody zamiast wyizolowanego RNA.
- Konieczne jest zastosowanie kontroli dodatniej, zawierającej matrycę, w celu potwierdzenia, że mechanizm wykrywania docelowego RNA wirusa SARS-CoV-2 nie został zakłócony. Należy stosować co najmniej jedną kontrolę na jedną płytkę PCR (50 kopii na reakcję). Kontrolę dodatnią w zestawie stanowi syntetyczny RNA odpowiadający docelowym sekwencjom wirusa.

- Należy zastosować kontrolę ekstrakcji (próbkę kontrolną zawierającą materiał pochodzący od człowieka, ang. Human Specimen Control, HSC) w celu zagwarantowania, że RNA w oryginalnej próbce został dobrze zachowany podczas ekstrakcji. Należy stosować co najmniej jedną taką próbkę na partię ekstrakcji.
- Wymagane jest zastosowanie kontroli wewnętrznej (genu ludzkiej RNazy P) w celu potwierdzenia, że RNA z oryginalnej próbki jest wykrywalny w reakcji qRT-PCR. Powinien zostać wykryty w próbce HSC, a także w większości próbek pobranych od ludzi, które zawierają wystarczającą ilość komórkowego RNA. W próbkach pobranych od ludzi kontrola wewnętrzna może nie zostać wykryta, jeśli RNA wirusa SARS-CoV-2 jest obecny w dużych stężeniach.

Próbki kontrolne dostarczane z zestawem

Tabela 1 Próbką kontrolną dostarczana z zestawem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent

Rodzaj próbki kontrolnej	Nazwa próbki kontrolnej	Nazwa dostawcy	Nr kat. dostawcy
Kontrola dodatnia	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

Wymagane próbki kontrolne, które nie są dostarczane wraz z zestawem

- Woda klasy molekularnej, niezawierająca nukleazy, do stosowania jako próbka kontrolna niezawierająca matrycy (ujemna)
- Kontrola ekstrakcji: klient może skorzystać z kilku opcji na podstawie zaleceń CDC
 - Próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (HSC) wytwarzana przez CDC, KT0189
 - Ujemny materiał z próbki pobranej od człowieka: laboratoria mogą przygotować materiał z próbki pobranej od człowieka (np. ludzkiej surowicy lub zebranych resztek ujemnych próbek z układu oddechowego) w celu poddawania ekstrakcji wraz z próbkami klinicznymi w ramach kontroli ekstrakcji. Ten materiał należy przygotować w objętości wystarczającej do wykorzystania w wielu seriach oznaczeń. Materiał powinien zostać przetestowany przed wykorzystaniem jako kontrola ekstrakcji w celu potwierdzenia, że daje wyniki oczekiwane dla próbki HSC, wymienione w niniejszej instrukcji użycia.
 - Spreparowany materiał z próbki pobranej od człowieka: laboratoria mogą przygotować spreparowane próbki materiału pochodzącego od człowieka poprzez zawieszenie dowolnej ludzkiej linii komórkowej (np. A549, Hela lub 293) w PBS. Ten materiał należy przygotować w objętości wystarczającej do wykorzystania w wielu seriach oznaczeń. Materiał powinien zostać przetestowany przed wykorzystaniem jako kontrola ekstrakcji w celu potwierdzenia, że daje wyniki oczekiwane dla próbki HSC, wymienione w niniejszej instrukcji użycia.

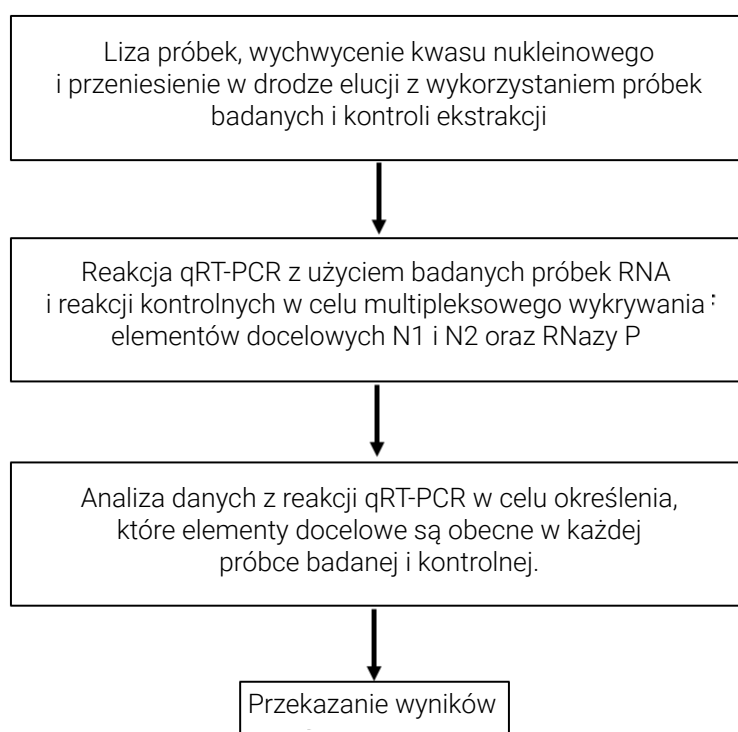
Przebieg oznaczenia

Aby rozpocząć oznaczenie, należy wyizolować kwas nukleinowy z badanych próbek wymazu z jamy nosowo-gardłowej wraz z odpowiednią próbką kontrolną zawierającą materiał pochodzący od człowieka (HSC).

Następnie należy przeprowadzić multipleksową reakcję qRT-PCR z wykorzystaniem próbek wyizolowanego RNA oraz dostarczonej dodatniej próbki kontrolnej RNA. Należy uwzględnić próbkę kontrolną niezawierającą matrycy (NTC).

Po zakończeniu reakcji qRT-PCR należy przeanalizować dane pod kątem amplifikacji elementów docelowych wirusa N1 oraz N2, a także genu ludzkiej RNazy P.

Na końcu należy przekazać wyniki dla badanych próbek.



Rycina 1 Przebieg oznaczenia SARS-CoV2 qRT-PCR Dx

2 Materiały, bezpieczeństwo i postępowanie

Materiały dostarczane 11

Odczynniki, materiały, wyposażenie i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane 12

Środki ostrożności dotyczące bezpieczeństwa 15

Przechowywanie i sposób postępowania 17

W niniejszym rozdziale opisano odczynniki i inne materiały stosowane w oznaczeniu oraz zamieszczono informacje dotyczące bezpiecznego wykonania oznaczenia.

Materiały dostarczane

Tabela 2 zawiera listę materiałów dostarczanych z zestawem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent oraz wymagania dotyczące temperatury ich przechowywania. Dodatkowe instrukcje dotyczące przechowywania materiałów zawiera część „Przechowywanie i sposób postępowania” na stronie 17.

Tabela 2 Materiały dostarczane z zestawem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent, nr kat. K1180A

Materiały	Ilość	Elementy	Temperatura przechowywania
Odczynniki Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents, nr kat. K1180-64100*	Dostarczane w ilości wystarczającej do przeprowadzenia 400 reakcji qRT-PCR (próbki badane i kontrolne) <i>Należy pamiętać, że na każdej płycie reakcyjnej do reakcji qRT-PCR należy uwzględnić co najmniej 3 dołki na reakcje kontrolne.</i>	Mieszanina 2 × Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	Przechowywać w temperaturze –20°C po odbiorze.
		RT/RNase Block Dx	Przechowywać w temperaturze –20°C po odbiorze.
		Barwnik referencyjny Reference Dye Dx [†]	Przechowywać w temperaturze –20°C po odbiorze.
		100 mM DTT Dx	Przechowywać w temperaturze –20°C po odbiorze.
		Mieszanina 10 × SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx [†]	Przechowywać w temperaturze –20°C po odbiorze.
Kontrola dodatnia Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, nr kat. K1180-64200 [‡]	Dostarczana w ilości wystarczającej do przeprowadzenia 8 oznaczeń	Kontrola dodatnia SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Przechowywać w temperaturze –80°C po odbiorze.

* Zestaw odczynników SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents jest również sprzedawany oddzielnie przez firmę Agilent pod numerem katalogowym K1180B.

[†] Ten odczynnik jest wrażliwy na światło i gdy to tylko możliwe, należy chronić go przed dostępem światła.

[‡] Kontrola dodatnia SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx jest również sprzedawana oddzielnie przez firmę Agilent pod numerem katalogowym K1180C.

Odczynniki, materiały, wyposażenie i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane

Tabela 3 zawiera listę opcjonalnych materiałów do etapu ekstrakcji RNA w protokole, który jest wykonywany na urządzeniu do automatyzacji. Procedurę ekstrakcji RNA opisano w części „Instrukcja ekstrakcji kwasów nukleinowych” na stronie 18.

Tabela 3 Materiały opcjonalne do ekstrakcji RNA – wymagane, lecz niedostarczane

Zestaw do ekstrakcji RNA	Urządzenie
Zestaw QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, nr kat. 937055	QIAGEN QIAAsymphony SP, nr kat. 9001297 (automatyzacja)
Zestaw Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher, nr kat. A48383	System Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Purification System, nr kat. 5400630 (automatyzacja)

Tabela 4 zawiera opcje próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (ang. Human Specimen Control, HSC). Ta próbka kontrolna to preparat ludzkiej linii komórkowej wykorzystywany jako kontrola procedury ekstrakcji w celu wykazania pomyślnego uzyskania kwasu nukleinowego, a także integralności odczynników do ekstrakcji.

Tabela 4 Opcje próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (HSC) – wymaganej, lecz niedostarczanej

Próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (HSC)	Opis
Human Specimen Control (HSC), 10 fiolek × 500 µl, CDC, nr kat. KT0189	Wytwarzana i sprzedawana przez CDC. Próbka kontrolna HSC oferowana przez CDC zawiera niezakaźny (poddany działaniu beta-propiolaktanu) materiał z ludzkiej linii komórkowej zawieszony w 0,01 M buforze PBS o pH 7,2–7,4.

Tabela 4 Opcje próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (HSC) – wymaganej, lecz niedostarczanej

Próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (HSC)	Opis
Ujemny materiał z próbki pobranej od człowieka	Przygotowywany przez laboratorium. Ten rodzaj próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (HSC) to objętość materiału z próbki pobranej od człowieka (np. ludzkiej surowicy lub zebranych resztek ujemnych próbek z układu oddechowego) poddawana ekstrakcji wraz z próbkami klinicznymi w ramach kontroli ekstrakcji. Ten materiał należy przygotować w objętości wystarczającej do wykorzystania w wielu seriach oznaczeń. Materiał powinien zostać przetestowany przed wykorzystaniem jako kontrola ekstrakcji w celu potwierdzenia, że daje wyniki oczekiwane dla próbki HSC, wymienione w niniejszej instrukcji użycia.
Spreparowany materiał z próbki pobranej od człowieka	Przygotowywany przez laboratorium. Ten rodzaj próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (HSC) to spreparowane próbki materiału pochodzącego od człowieka przygotowane poprzez zawieszenie dowolnej linii komórkowej (np. A549, Hela lub 293) w PBS. Ten materiał należy przygotować w objętości wystarczającej do wykorzystania w wielu seriach oznaczeń. Materiał powinien zostać przetestowany przed wykorzystaniem jako kontrola ekstrakcji w celu potwierdzenia, że daje wyniki oczekiwane dla próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (HSC), wymienione w niniejszej instrukcji użycia.

Tabela 5 i Tabela 6 zawierają listę dodatkowych odczynników, materiałów, wyposażenia i urządzeń, które są wymagane, lecz niedostarczane z zestawem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent.

Tabela 5 Odczynniki i materiały wymagane, lecz niedostarczane

Odczynnik lub materiał	Postać
Woda klasy molekularnej niezawierająca nukleazy	Odczynnik
10% roztwór wybielacza (rozcieńczenie 1:10 wybielacza zawierającego podchloryn sodu o stężeniu 5,25–6%)	Materiał
DNAZap, Ambion, nr kat. AM9890 lub równoważny środek odkażający	Materiał
RNase AWAY, Fisher Scientific, nr kat. 21-236-21 lub równoważny środek odkażający	Materiał
Jednorazowe, bezpudrowe rękawiczki i fartuchy laboratoryjne	Materiał
Jałowe, niezawierające nukleazy końcówki do pipet z barierą aerozolową	Materiał
Probówki do mikrowirówek 1,5 ml, niezawierające nukleazy	Materiał
Probówki do mikrowirówek 2 ml, niezawierające nukleazy	Materiał
Płytki z 96 dołkami, niezawierające nukleazy, 200 µl	Materiał
<i>Należy korzystać z płytek kompatybilnych z wybranym systemem do reakcji PCR w czasie rzeczywistym</i>	
Paski 8 probówek, niezawierające nukleazy	Materiał

Tabela 5 Odczynniki i materiały wymagane, lecz niedostarczane

Odczynnik lub materiał	Postać
Niezawierająca nukleazy folia samoprzylepna do zamykania płytek <i>lub</i> paski z 8 optycznymi wieczkami do płytek z 96 dołkami do reakcji PCR <i>Należy korzystać z folii lub wieczek kompatybilnych z wybranym systemem do reakcji PCR w czasie rzeczywistym</i>	Materiał
Wkładka kompresyjna MicroAmp Optical Film Compression Pads, Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4312639*	Materiał

* Wkładki kompresyjne są wymagane tylko w sytuacji korzystania z folii samoprzylepnej do zamykania płytek oznaczanych w systemie AriaMx/AriaDx Real-Time PCR

Tabela 6 Wymagane, lecz niedostarczane urządzenia, oprogramowanie i sprzęt

Urządzenie, oprogramowanie lub sprzęt	Postać
System do reakcji PCR w czasie rzeczywistym - System Agilent AriaMx Real-Time PCR System (nr kat. G8830A) lub AriaDx Real-Time PCR System (nr kat. K8930AA) Oprogramowanie: Oprogramowanie Aria w wersji 1.71 lub 1.8 oraz oprogramowanie Electronic Tracking Software (dołączone do systemu o numerze katalogowym K8930AA lub dostępne oddzielnie pod numerem katalogowym G5380AA) - Urządzenie ABI 7500 Fast Real Time PCR z laptopem (nr kat. 4351106) lub komputerem stacjonarnym (nr kat. 4351107) Oprogramowanie: Oprogramowanie 7500 w wersji 2.3 oraz oprogramowanie Design & Analysis w wersji 2.4.3 - System Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (nr kat. 1855195) lub system CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System with Starter Package (nr kat. 1855196) Oprogramowanie: Oprogramowanie CFX Maestro 2.0 w wersji 4.1.2 (dołączone do systemu o numerze katalogowym 1855196 lub dostępne oddzielnie pod numerem katalogowym 12004110)	Urządzenie z komputerem i oprogramowaniem
Oprogramowanie do wyświetlania danych wyeksportowanych z oprogramowania do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, np. Microsoft Excel	Oprogramowanie
Worteks	Sprzęt
Mikrowirówka	Sprzęt
Wirówka do płytek z 96 dołkami	Sprzęt
Mikropipety P10, P20, P200 i P1000	Sprzęt
Pipety wielokanałowe (5–50 µl)	Sprzęt
Statywy na probówki mikrowirówkowe	Sprzęt
Dwa (2) chłodzone statywy na płytki z 96 dołkami	Sprzęt
Pojemnik na lód	Sprzęt

Środki ostrożności dotyczące bezpieczeństwa

- 1 Test SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent powinien być wykonywany przez wykwalifikowany i przeszkolony personel w celu uniknięcia ryzyka uzyskania błędnych wyników. Próbkę pacjentów oraz próbki kontrolne należy przygotowywać w oddzielnych obszarach w celu uniknięcia fałszywie dodatnich wyników.
- 2 Test został dopuszczony wyłącznie do wykrywania kwasu nukleinowego wirusa SARS-CoV-2, a nie pochodzącego z innych wirusów lub czynników chorobotwórczych.
- 3 Należy uważnie przeczytać całą instrukcję użycia.
- 4 Próbkę od pacjentów i próbki kontrolne powinny być zawsze traktowane jak zakaźne i (lub) stanowiące zagrożenie biologiczne zgodnie z procedurami bezpieczeństwa obowiązującymi w laboratorium. Należy zapoznać się z dokumentem Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with 2019-nCoV.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- 5 Należy przestrzegać niezbędnych środków ostrożności podczas pracy z próbkami. Należy stosować środki ochrony osobistej (PPE) zgodnie z aktualnymi wytycznymi dotyczącymi postępowania z potencjalnie zakaźnymi próbkami. Jeśli dojdzie do rozlania, natychmiast zdezynfekować.
- 6 Próbkę mogą być zakaźne. Podczas wykonywania tego oznaczenia należy stosować ogólne środki ostrożności. Właściwe metody postępowania i utylizacji powinny zostać ustalone przez kierownika laboratorium. Tylko personel odpowiednio przeszkolony w zakresie obchodzenia się z materiałami zakaźnymi powinien być dopuszczony do wykonywania tej procedury diagnostycznej.
- 7 Jeśli podejrzewa się zakażenie wirusem 2019-nCoV na podstawie aktualnych klinicznych kryteriów przesiewowych zalecanych przez organy ds. zdrowia publicznego, próbki powinny być pobierane z zastosowaniem odpowiednich środków ostrożności w zakresie kontroli zakażeń.
- 8 Należy korzystać wyłącznie z dostarczonego lub wskazanego jednorazowego sprzętu laboratoryjnego.
- 9 Zawsze używać końcówek do pipet z barierą aerozolową. Używane końcówki muszą być jałowe i wolne od DNaz oraz RNaz.

- 10** Testy oparte na metodzie PCR są wrażliwe na przypadkowe wprowadzenie produktów amplifikacji z poprzednich reakcji PCR. Jakikolwiek zanieczyszczenie próbek testowych lub odczynników może skutkować uzyskaniem nieprawidłowego wyniku. Przebieg pracy w laboratorium musi mieć charakter jednokierunkowy. Aby zapobiec zanieczyszczeniu próbek produktem PCR, podczas całej procedury należy stosować następujące najlepsze praktyki:
- Wyznaczyć oddzielne stanowiska pracy dla czynności przed reakcją PCR i po reakcji PCR oraz korzystać z odpowiednich materiałów i odczynników w każdym obszarze. Szczególną ostrożność należy zachować, aby nigdy nie korzystać z materiałów z obszaru dla czynności po reakcji PCR w obszarach wyznaczonych dla czynności przed reakcją PCR. Do dozowania roztworów przeznaczonych do stosowania przed reakcją PCR należy zawsze korzystać z pipet przeznaczonych do czynności przed reakcją PCR z niezawierającymi nukleazy końcówkami z barierą aerozolową.
 - Miejsca pracy należy utrzymywać w czystości. Powierzchnie w obszarach wyznaczonych dla czynności przed reakcją PCR należy czyścić codziennie oraz pomiędzy poszczególnymi oznaczeniami 10% roztworem wybielacza i (lub) produktami, takimi jak DNAzap lub RNase AWAY. Pozostałości wybielacza należy usunąć 70% etanolem.
 - Należy nosić czysty fartuch laboratoryjny i czyste, bezpudrowe rękawiczki. Stosować zasady dobrej higieny laboratoryjnej, w tym zmieniać rękawiczki po kontakcie z każdą potencjalnie zanieczyszczoną powierzchnią.
 - Po każdym ręcznym przeniesieniu cieczy należy zmienić końcówkę pipety z barierą aerozolową.
 - Podczas ekstrakcji kwasu nukleinowego z próbek należy stosować odpowiednią technikę aseptyczną, aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami i uniknąć niezamierzonego wprowadzenia nukleaz do próbek.
 - Gdy to tylko możliwe, próbówki z odczynnikami i próbówki reakcyjne powinny być zakręcone lub przykryte.
- 11** Nie jeść, nie pić, nie palić, nie stosować produktów kosmetycznych w obszarze pracy.
- 12** Modyfikacje odczynników oznaczenia, protokołu oznaczenia lub oprzyrządowania są niedozwolone.
- 13** Sposób przechowywania odczynników i obchodzenia się z nimi przedstawia **Tabela 2** na stronie 11 oraz część „**Przechowywanie i sposób postępowania**” na stronie 17.
- 14** Nie używać zestawu po upływie wskazanej daty ważności.
- 15** Utylizować odpady zgodnie z przepisami lokalnymi, stanowymi i federalnymi.
- 16** Karty charakterystyki są dostępne na stronie www.agilent.com.
- 17** Na urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym nie należy używać materiałów, które mogą zawierać tiocyjanian guanidyny lub guanidynę. W połączeniu z podchlorynem sodu (wybielaczem) mogą powstawać wysoce reaktywne i (lub) toksyczne związki.
- 18** Wyniki dodatnie wskazują na obecność RNA wirusa SARS-CoV-2.

Przechowywanie i sposób postępowania

Opakowanie produktu

Po otrzymaniu zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent należy dokładnie sprawdzić opakowanie pod kątem widocznych uszkodzeń. W przypadku stwierdzenia uszkodzenia opakowania produktu należy się skontaktować z działem pomocy technicznej firmy Agilent.

Przechowywanie i stabilność odczynników oraz sposób obchodzenia się z nimi

- Przed użyciem należy zawsze sprawdzić datę ważności. Nie używać przeterminowanych odczynników.
- Chronić sondy fluorescencyjne przed działaniem światła.
- Startery, sondy (w tym porcje) oraz mieszaninę master mix z enzymem należy rozmrozić i trzymać na lodzie lub chłodzonym statywie przez cały czas podczas przygotowywania i stosowania.
- Próbkę kontrolną należy rozmrozić i trzymać na lodzie lub chłodzonym statywie przez cały czas podczas przygotowywania i stosowania.
- Temperatury przechowywania odczynników zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent zawiera **Tabela 2** na stronie 11.

Pobieranie i obchodzenie się z próbkami oraz ich przechowywanie

Nieodpowiednie lub niewłaściwe pobieranie, przechowywanie i transport próbek może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników testu. Zdecydowanie zaleca się przeprowadzenie szkolenia w zakresie pobierania próbek ze względu na znaczenie jakości próbek. Odpowiednie źródło informacji stanowi norma CLSI MM13-A.

- Pobieranie próbek
 - Należy się zapoznać z dokumentem Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (PUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.
 - Należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta przyrządu do pobierania próbek, dotyczącymi właściwych metod pobierania.
- Transportowanie próbek
 - Materiał kliniczny pobrany od pacjenta umieszczany jest w odpowiednim systemie transportowym. W przypadku zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent obejmuje to próbki z jamy nosowo-gardłowej w podłożu transportowym do przenoszenia wirusów (VTM), uniwersalnym podłożu transportowym (UTM), soli fizjologicznej, podłożu Liquid Amies lub podłożu do transportu próbek (STM).

3 Instrukcja ekstrakcji kwasów nukleinowych

Ekstrakcja kwasów nukleinowych 19

W niniejszym rozdziale zamieszczono instrukcje dotyczące ekstrakcji RNA z badanych próbek klinicznych oraz próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (ang. Human Specimen Control, HSC).

Ekstrakcja kwasów nukleinowych

Wydajność zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent jest uzależniona od ilości oraz jakości matrycy RNA oczyszczonej z próbek pobranych od ludzi. Poniżej wymieniono dostępne w handlu zestawy do izolacji RNA oraz procedury, które zostały zakwalifikowane i zweryfikowane pod kątem odzysku i czystości RNA do użycia z zestawem.

Do ekstrakcji próbek należy stosować procedury zalecane przez producenta (z wyjątkiem przypadków wymienionych w poniższych zaleceniach). Próbką kontrolną zawierającą materiał pochodzący od człowieka (HSC) musi zostać uwzględniona w każdej serii ekstrakcji.

Zestaw QIAGEN QIAasympfony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, protokół automatyzacji

Zalecenie: użyć 140 µl próbki i przeprowadzić elucję z zastosowaniem 60 µl buforu.

Zestaw MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, protokół automatyzacji

Zalecenie: użyć 200 µl próbki i przeprowadzić elucję z zastosowaniem 50 µl buforu.

4

Instrukcje przygotowywania reakcji qRT-PCR

Konfigurowanie doświadczenia qRT-PCR i systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym **21**
Przygotowywanie reakcji qRT-PCR **41**

W niniejszym rozdziale znajdują się instrukcje przygotowywania ilościowej reakcji PCR z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR) w celu badania próbek pacjentów i próbek kontrolnych.

Konfigurowanie doświadczenia qRT-PCR i systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Przed przygotowaniem płytki reakcyjnej do reakcji qRT-PCR należy skonfigurować doświadczenie w systemie do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, tak aby urządzenie było gotowe do uruchomienia, gdy tylko płytka reakcyjna zostanie przygotowana.

Należy przestrzegać instrukcji dołączonych do danego systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

System Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

- Jeśli użytkownik nie dysponuje plikiem szablonu z odpowiednimi ustawieniami, powinien się zapoznać z częścią **„Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia AriaMx/AriaDx (wymagane, jeśli szablon nie został jeszcze utworzony)”** na stronie 22.
- Jeśli użytkownik dysponuje plikiem szablonu, powinien się zapoznać z częścią **„Tworzenie doświadczenia AriaMx/AriaDx na podstawie zapisanego szablonu”** na stronie 27.

UWAGA

Włącz zasilanie urządzenia AriaMx lub AriaDx co najmniej na 3 godziny przed użyciem. Urządzenie może być przez cały czas włączone, tak aby zawsze było gotowe do użycia.

Zgodnie ze specyfikacją urządzenia warunki pracy to temperatura 20–30°C, wilgotność 20–80% i wysokość nad poziomem morza ≤ 2000 m.

Urządzenie ABI 7500 Fast Real Time PCR

- Jeśli użytkownik nie dysponuje plikiem szablonu z odpowiednimi ustawieniami, powinien się zapoznać z częścią **„Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia ABI 7500 Fast (wymagane, jeśli szablon nie został jeszcze utworzony)”** na stronie 27.
- Jeśli użytkownik dysponuje plikiem szablonu, powinien się zapoznać z częścią **„Tworzenie doświadczenia ABI 7500 Fast na podstawie zapisanego szablonu”** na stronie 33.

System Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

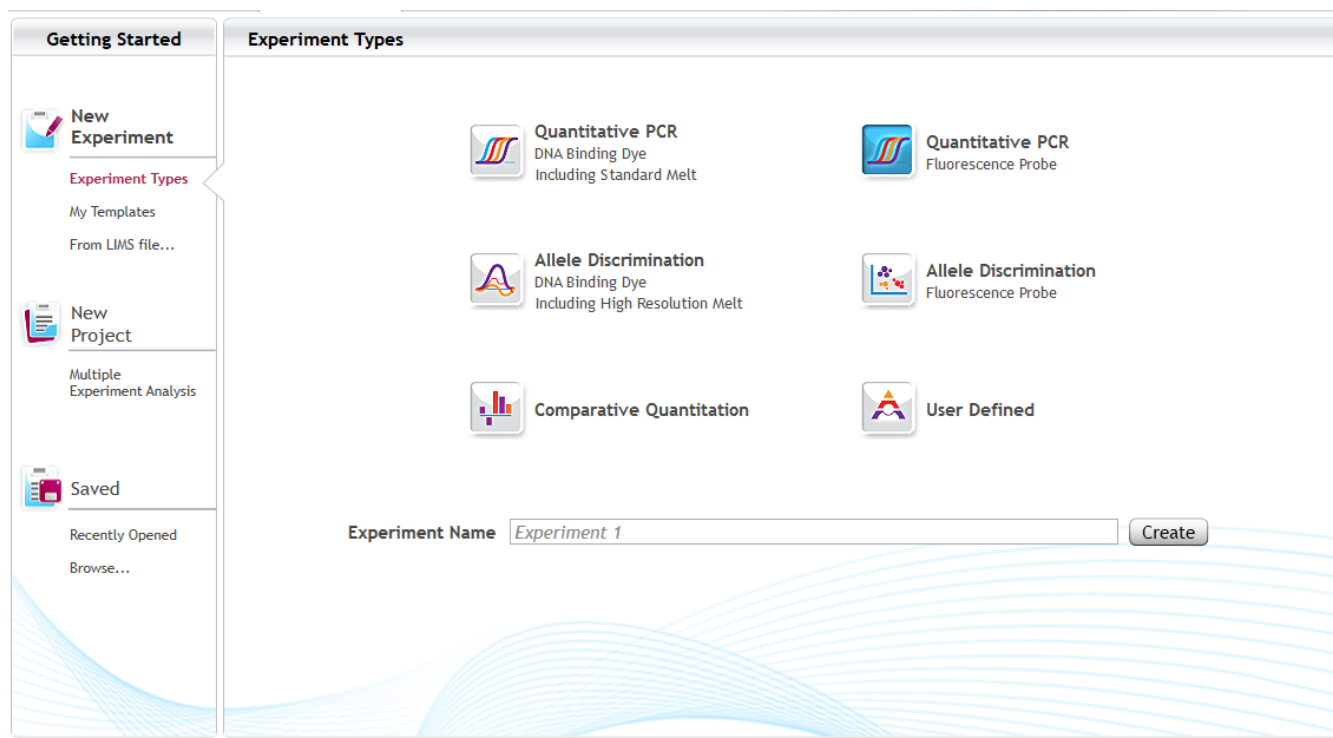
- Jeśli użytkownik nie dysponuje zapisanym protokołem i plikami płytek z odpowiednimi ustawieniami, powinien się zapoznać z częścią **„Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (wymagane, jeśli nie utworzono jeszcze zapisanego protokołu i plików płytki)”** na stronie 34.
- Jeśli użytkownik dysponuje zapisanym protokołem i plikami płytek, powinien zapoznać się z częścią **„Tworzenie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR z użyciem zapisanego protokołu i plików płytki”** na stronie 40.

Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia AriaMx/AriaDx (wymagane, jeśli szablon nie został jeszcze utworzony)

Jeśli użytkownik dysponuje już szablonem dla doświadczenia, powinien przejść do części „Tworzenie doświadczenia AriaMx/AriaDx na podstawie zapisanego szablonu” na stronie 27.

Etap 1. Utworzenie doświadczenia

- 1 Z poziomu komputera połączanego z urządzeniem otwórz oprogramowanie Aria na ekranie Getting Started.
- 2 Kliknij opcję **Experiment Types** pod opcją **New Experiment**, jeśli nie została jeszcze wybrana.
- 3 Na środku ekranu wybierz opcję **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** (zob. Rycina 2).



Rycina 2 Ekran rozpoczęcia pracy w oprogramowaniu Aria — wybrana opcja **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**

- 4 Wpisz nazwę doświadczenia w polu Experiment Name i kliknij opcję **Create**.

Nowe doświadczenie zostanie otwarte na ekranie Plate Setup. Domyślnie zaznaczone są wszystkie dołki na mapie płytki.

Zaznaczenie wszystkich 96 dołków jest prawidłowe, jeśli wszystkie dołki na płytce zostaną uwzględnione w reakcji qRT-PCR. Jeśli któryś dołek na płytce będzie pusty, należy odznaczyć go na tym etapie.

Etap 2. Przypisanie rodzajów i nazw dołków

- 5 W panelu Properties po prawej stronie ekranu rozwiń listę rozwijaną **Well type** i wybierz opcję **Unknown**.

Wszystkie dołki na mapie płytki zostaną oznaczone jako Unknown.

- 6 Przypisz dołkowi A12 rodzaj próbki kontrolnej niezawierającej matrycy (NTC).

a Kliknij dołek A12 na mapie płytki w celu wybrania pojedynczego dołka.

b W panelu Properties po prawej stronie ekranu rozwiń listę rozwijaną **Well type** i wybierz opcję **NTC**.

Dołek A12 zostanie oznaczony na mapie płytki jako NTC, natomiast wszystkie pozostałe nadal będą miały przypisany rodzaj Unknown.

- 7 Ponownie zaznacz wszystkie dołki na mapie płytki.

Kliknięcie pola wyboru w lewym górnym rogu mapy płytki spowoduje zaznaczenie wszystkich dołków.

Konfiguracja płytki będzie wyglądała w sposób, który przedstawia **Rycina 3**.

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

Rycina 3 Przypisanie rodzajów dołków na ekranie konfiguracji płytki oprogramowania Aria

- 8 Przypisz nazwy dołków do dołków kontrolnych i, jeśli to wskazane, do dołków przeznaczonych na badane próbki. Nazwy dołków, które należy przypisać dołkom kontrolnym, zawiera **Tabela 7**. Nazwy dołków można przypisać ręcznie lub zaimportować z arkusza Excel bądź pliku tekstowego z danymi rozdzielonymi przecinkami, w którym znajdują się identyfikatory dołków wraz z nazwami dołków, które mają zostać przypisane.
- Aby przypisać nazwy dołków ręcznie, zmień ustawienie Show z opcji **Type** na **Name**. Wybierz dołek/dołki na płytce, a następnie wpisz nazwę dla wybranego dołka/wybranych dołków w polu Well Name.
 - Aby przypisać nazwy dołków z pliku Excel lub pliku tekstowego, kliknij prawym przyciskiem myszy mapę płytki i wybierz opcję **Import Well Name**. W wyświetlonym oknie dialogowym wybierz plik Excel lub plik tekstowy. Informacje na temat wymogów formatowania plików można znaleźć w pomocy systemowej oprogramowania Aria.

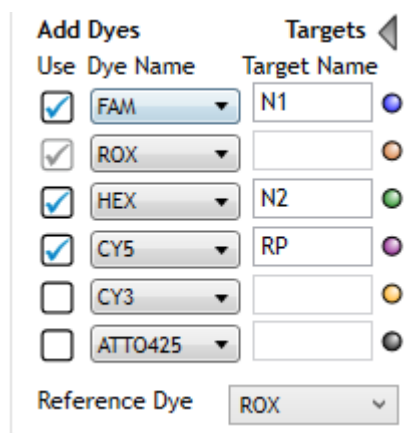
Tabela 7 Nazwy dołków przypisywane dołkom kontrolnym

Identyfikator dołka	Nazwa dołka
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pos

* Jeśli na płytce używana będzie więcej niż jedna próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka, należy skorzystać z dodatkowych dołków w kolumnie 12 na potrzeby tych reakcji i odpowiednio nazwać dołki (np. HSC1, HSC2 itp.).

Etap 3. Przypisanie barwników i elementów docelowych

- 9 W panelu Properties pod opcją **Add Dyes** zaznacz pola wyboru dla barwników FAM, HEX i Cy5. We wszystkich dołkach na mapie płytki pojawią się oznaczone kolorystycznie kropki dla każdego z zaznaczonych barwników.
- 10 Z listy rozwijanej Reference Dye wybierz opcję **ROX**. We wszystkich dołkach na mapie płytki pojawi się oznaczona kolorystycznie kropka z literą „R”.
- 11 Kliknij grot strzałki ► obok opcji **Targets**.
- 12 W wyświetlonych polach Target Name wpisz nazwy elementów docelowych zgodnie z informacjami, które przedstawia **Rycina 4**.



Rycina 4 Przypisanie barwników i elementów docelowych na ekranie konfiguracji płytki oprogramowania Aria

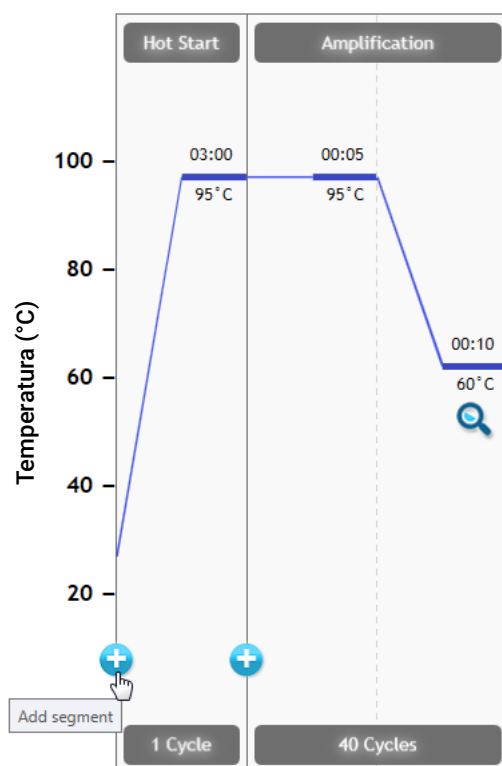
Etap 4. Konfiguracja profilu termicznego

13 Po lewej stronie ekranu, pod opcją **Set Up** kliknij opcję **Thermal Profile**.

Zostanie otwarty ekran Thermal Profile wyświetlający domyślny profil termiczny.

14 Dodaj segment RT do początku programu cykli reakcji.

- a Ustaw kursor nad segmentem Hot Start na wyświetlaczu. Kliknij ikonę + (którą przedstawia **Rycina 5**) widoczną po lewej stronie segmentu Hot Start.

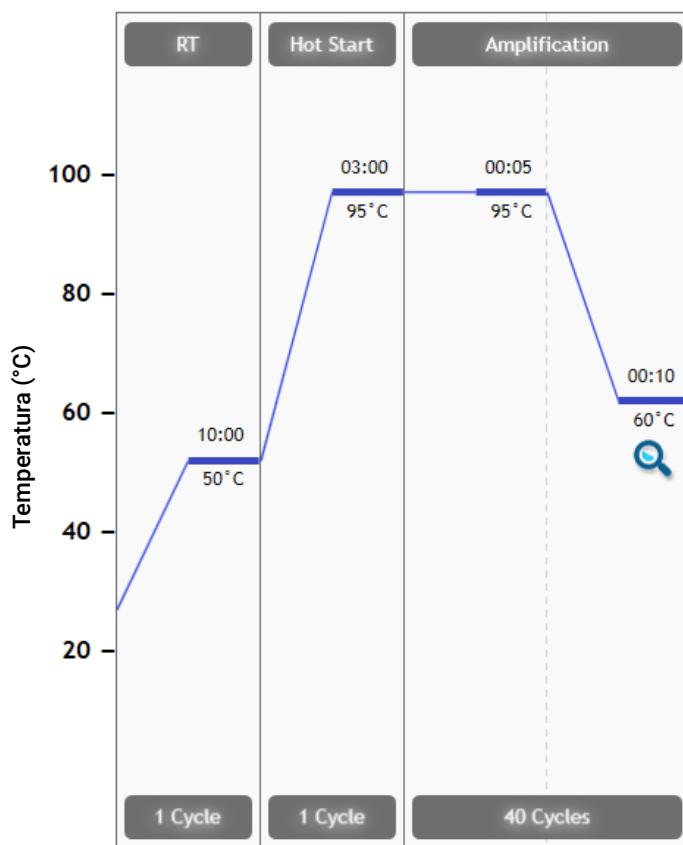


Rycina 5 Dodanie nowego segmentu na ekranie profilu termicznego oprogramowania Aria

Program otworzy okno dla nowego segmentu z listą dostępnych rodzajów segmentów.

- b W oknie segmentu kliknij opcję **RT**.

Profil termiczny będzie wyglądał w sposób, który przedstawia **Rycina 6**.



Rycina 6 Profil termiczny na ekranie profilu termicznego oprogramowania Aria

15 Upewnij się, że profil termiczny wyświetlany na ekranie odpowiada programowi cykli termicznych, który przedstawia **Tabela 8**.

Tabela 8 Program cykli termicznych dla systemu AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

Numer segmentu	Liczba cykli	Czas trwania	Temperatura
1	1	10 minut	50°C
2	1	3 minuty	95°C
3	40	5 sekund	95°C
		10 sekund	60°C

Etap 5. Zapisanie doświadczenia jako szablon

16 Kliknij kolejno opcje **File > Save As Template**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Save As. Ustawiony rodzaj pliku to **AriaMx Template Files** (rozszerzenie pliku *amxt*) lub **AriaDx Template Files** (rozszerzenie pliku *adxt*).

17 Wybierz folder dla nowego szablonu.

18 W polu File name wpisz **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

19 Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a program zapisze nowy plik szablonu we wskazanym folderze.

W przyszłych oznaczeniach należy korzystać z zapisanego szablonu w celu tworzenia i konfigurowania doświadczenia qRT-PCR w sposób opisany w części „**Tworzenie doświadczenia AriaMx/AriaDx na podstawie zapisanego szablonu**”.

Na tym etapie należy bezpośrednio przejść do części „**Przygotowywanie reakcji qRT-PCR**” na stronie 41.

Tworzenie doświadczenia AriaMx/AriaDx na podstawie zapisanego szablonu

Jeśli szablon doświadczenia z niezbędną konfiguracją płytki oraz profilem termicznym nie został utworzony, należy zapoznać się z częścią „**Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia AriaMx/AriaDx (wymagane, jeśli szablon nie został jeszcze utworzony)**” na stronie 22.

- 1 Z poziomu komputera połączanego z urządzeniem otwórz oprogramowanie Aria na ekranie Getting Started.
- 2 Pod opcją **New Experiment** kliknij opcję **My Templates**.
- 3 W polu Experiment Name wpisz nazwę nowego doświadczenia.
- 4 Wybierz szablon **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** i utwórz doświadczenie.
 - Jeśli szablon znajduje się w folderze domyślnym, kliknij bezpośrednio szablon, aby go zaznaczyć, a następnie kliknij opcję **Create** (lub kliknij dwukrotnie szablon). Program utworzy nowe doświadczenie i otworzy je na ekranie Plate Setup.
 - Jeśli szablon nie znajduje się w aktualnie wybranym folderze, kliknij ikonę **Browse to Template** (przedstawioną poniżej), aby otworzyć okno przeglądarki. Przejdź do folderu zawierającego plik szablonu **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**. Wybierz plik i kliknij opcję **Open**. Program utworzy nowe doświadczenie i otworzy je na ekranie Plate Setup.



Na tym etapie należy bezpośrednio przejść do części „**Przygotowywanie reakcji qRT-PCR**” na stronie 41.

Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia ABI 7500 Fast (wymagane, jeśli szablon nie został jeszcze utworzony)

Jeśli użytkownik dysponuje już szablonem dla doświadczenia, powinien przejść do części „**Tworzenie doświadczenia ABI 7500 Fast na podstawie zapisanego szablonu**” na stronie 33.

Etap 1. Utworzenie doświadczenia

- 1 Włącz urządzenie ABI 7500 Fast.
- 2 Z poziomu komputera połączanego z urządzeniem otwórz aplikację 7500 System Software.
- 3 Na ekranie głównym pod opcją **Set Up** kliknij opcję **Advanced Setup**.

Zostanie wyświetlony ekran Experiment.

- 4 W obszarze **Experiment Menu** po lewej stronie ekranu, pod opcją **Setup** kliknij opcję **Experiment Properties**, jeśli nie została jeszcze wybrana.

Na środku ekranu zostaną wyświetlone ustawienia dla opcji Experiment Properties.

- 5 Udziel odpowiedzi na pytania wyświetlane na ekranie, korzystając z opcji wyboru i wpisów, które przedstawia **Tabela 9**.

Tabela 9 Ustawienia właściwości doświadczenia

Pytanie	Opcja wyboru/wpis
How do you want to identify this experiment? (Jak chcesz zidentyfikować to doświadczenie?)	- Experiment Name (Nazwa doświadczenia): wpisz niepowtarzalną nazwę dla doświadczenia - Barcode (Kod kreskowy): pozostaw to pole puste - User Name (Nazwa użytkownika): wpisz swoje nazwisko - Comments (Komentarze): wpisz pożądane komentarze lub pozostaw to pole puste
Which instrument are you using to run the experiment? (Z jakiego urządzenia będziesz korzystać w celu przeprowadzenia doświadczenia?)	7500 Fast (96 Wells)
What type of experiment do you want to set up? (Jaki rodzaj doświadczenia chcesz skonfigurować?)	Quantitation – Standard Curve (Oznaczenie ilościowe – krzywa standardowa)
Which reagents do you want to use to detect the target sequence? (Jakie odczynniki chcesz wykorzystać do wykrycia sekwencji docelowej?)	TaqMan® Reagents (Odczynniki TaqMan®)
Which ramp speed do you want to use in the instrument run? (Jaką prędkość narastania chcesz wykorzystać w serii oznaczenia w urządzeniu?)	Fast (Szybka)

Etap 2. Zdefiniowanie elementów docelowych i próbek

- 6 W obszarze **Experiment Menu** po lewej stronie ekranu, pod opcją **Setup** kliknij opcję **Plate Setup**. Upewnij się, że u góry wybrana jest karta **Define Targets and Samples**.

Na środku ekranu są wyświetlane narzędzia do definiowania elementów docelowych i próbek.

- 7 W tabeli Define Targets utwórz elementy docelowe N1, N2 i RP (zob. **Rycina 7**). Kliknij opcję **Add New Target**, aby w razie potrzeby dodać wiersz do tabeli.

Dla opcji **Quencher** wybierz ustawienie **NFQ-MGB** dla wszystkich elementów docelowych. Dla opcji **Color** użyj ustawienia domyślnego lub wybierz pożądany kolor.

Define Targets			
Add New Target Add Saved Target Save Target Delete Target			
Target Name	Reporter	Quencher	Color
N1	FAM	NFQ-MGB	
N2	VIC	NFQ-MGB	
RP	CY5	NFQ-MGB	

Rycina 7 Definiowanie elementów docelowych na ekranie konfiguracji płytki oprogramowania 7500

- W tabeli Define Samples utwórz nazwy próbek (zob. **Rycina 8**). Kliknij opcję **Add New Sample**, aby w razie potrzeby dodać wiersz do tabeli.

Trzy próbki to próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (**HSC**), próbka kontrolna niezawierająca matrycy (**NTC**) oraz dodatnia próbka kontrolna (**Pos**) zawierająca kontrolę dodatnią SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control. Należy pamiętać, że próbkom badanym nie są przypisywane nazwy.

Dla opcji **Color** użyj ustawienia domyślnego lub wybierz pożądany kolor.

Define Samples	
Add New Sample Add Saved Sample Save Sample Delete Sample	
Sample Name	Color
HSC	
NTC	
Pos	

Rycina 8 Definiowanie próbek na ekranie konfiguracji płytki oprogramowania 7500

Etap 3. Przypisanie elementów docelowych i zadań

- Kliknij znajdującą się u góry ekranu kartę **Assign Targets and Samples**. Upewnij się, że wybrana jest karta **View Plate Layout**.

Na ekranie zostanie wyświetlona mapa płytki z 96 dołkami.

- Zaznacz wszystkie 96 dołków na mapie płytki.

Wybrane dołki są wyróżnione kolorem niebieskim i mają biały owal w środku.

Zaznaczenie wszystkich 96 dołków jest prawidłowe, jeśli wszystkie dołki na płycie zostaną uwzględnione w reakcji qRT-PCR. Jeśli któryś dołek na płycie będzie pusty, należy odznaczyć go na tym etapie

- W tabeli pod opcją **Assign target(s) to the selected wells** zaznacz wszystkie trzy pola wyboru w kolumnie Assign, aby wskazać, że wszystkie trzy elementy docelowe będą monitorowane i raportowane we wszystkich dołkach. Upewnij się, że w kolumnie Task zaznaczona jest litera „U” dla wszystkich trzech elementów docelowych. Zob. **Rycina 9**.

Na mapie płytki wyświetlany jest symbol dla każdego elementu docelowego we wszystkich 96 dołkach.

Assign target(s) to the selected wells.			
Assign	Target	Task	Quantity
☒	N1	  	
☒	N2	  	
☒	RP	  	

Rycina 9 Przypisywanie elementów docelowych w karcie widoku płytki oprogramowania 7500

12 Zmień przypisane zadanie dla próbki kontrolnej niezawierającej matrycy.

- Zaznacz dołek A12 na mapie płytki.
- W tabeli pod opcją **Assign target(s) to the selected wells** zmień wybór w kolumnie Task na „N” dla wszystkich trzech elementów docelowych. Upewnij się, że pola wyboru w kolumnie Assign pozostają zaznaczone.

Mapa płytki będzie wyglądała w sposób, który przedstawia **Rycina 10**.

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

Rycina 10 Mapa płytki na ekranie konfiguracji płytki systemu 7500

Etap 4. Przypisanie próbek kontrolnych

13 Przypisz próbkę kontrolną niezawierającą matrycy do dołka A12.

- a Wybierz dołek A12 na mapie płytki.
- b W tabeli pod opcją **Assign sample(s) to the selected wells** zaznacz opcję **NTC**.

Nazwa próbki NTC zostanie wyświetlona w wybranym dołku.

14 Przypisz próbkę kontrolną zawierającą materiał pochodzący od człowieka do dołka B12.

- a Wybierz dołek B12 na mapie płytki.

Jeśli na płytce musi zostać uwzględniona więcej niż jedna próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka, wybierz wymaganą liczbę dodatkowych dołków w kolumnie 12 na mapie płytki.

- b W tabeli pod opcją **Assign sample(s) to the selected wells** zaznacz opcję **HSC**.

Nazwa próbki HSC zostanie wyświetlona w wybranym dołku/wybranych dołkach.

15 Przypisz dodatnią próbkę kontrolną SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control do dołka H12.

- a Wybierz dołek H12 na mapie płytki.
- b W tabeli pod opcją **Assign sample(s) to the selected wells** zaznacz opcję **Pos**.

Nazwa próbki Pos zostanie wyświetlona w wybranym dołku.

Etap 5. Przypisanie barwnika referencyjnego

16 W tabeli pod opcją **Select the dye to use as the passive reference** wybierz opcję **ROX**.

Etap 6. Konfigurowanie sposobu przebiegu reakcji

17 W obszarze **Experiment Menu** po lewej stronie ekranu, pod opcją **Setup** kliknij opcję **Run Method**. Kliknij kartę **Tabular View** znajdującą się u góry.

Na środku ekranu zostaną wyświetlone narzędzia do definiowania objętości reakcji i profilu termicznego.

18 Sprawdź, czy w polu **Reaction Volume Per Well** ustawiono wartość 20 µl. Jeśli nie, wpisz w polu wartość **20**.

19 Dostosuj profil termiczny, tak aby odpowiadał profilowi, który przedstawia **Rycina 11**. Podsumowanie ustawień zawiera również **Tabela 10**.

Jeśli konieczne jest dodanie nowego etapu wstrzymania na początku profilu termicznego dla etapu odwrotnej transkrypcji w temperaturze 50°C, wykonaj poniższe czynności.

- a Wybierz etap znajdujący się na lewym skrajnym brzegu ilustracji profilu termicznego.
- b Kliknij kolejno opcje **Add Stage > Holding**.

Nowy etap wstrzymania zostanie dodany na początku profilu termicznego. Dostosuj temperaturę i czas trwania, tak aby odpowiadały tym, które przedstawia **Rycina 11**.

	Holding Stage	Holding Stage	Cycling Stage	
			Number of Cycles: 40 ☐ Enable AutoDelta Starting Cycle: 2	
Ramp Rate (%):	100.0	100.0	100.0	100.0
Temperature (°C):	50.0	95.0	95.0	60.0
Time:	10:00	03:00	00:05	00:30
AutoDelta Temp:				
AutoDelta Time:				
Collect Data on Ramp:				
Collect Data on Hold:				
	Step 1	Step 1	Step 1	Step 2

Rycina 11 Profil termiczny na ekranie sposobu przebiegu reakcji oprogramowania 7500

Tabela 10 Ustawienia profilu termicznego dla urządzenia 7500 Fast Real Time PCR Instrument

Numer segmentu	Liczba cykli	Czas trwania	Temperatura
1	1	10 minut	50°C
2	1	3 minuty	95°C
3	40	5 sekund	95°C
		30 sekund	60°C

Etap 7. Zapisanie doświadczenia

20 Kliknij grot strzałki skierowany w dół, znajdujący się obok przycisku **Save** u góry ekranu, aby rozwinąć menu z opcjami zapisu.

21 Wybierz z menu opcję **Save As**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Save As.

22 Wybierz folder dla pliku nowego doświadczenia.

23 W polu File name wpisz nazwę doświadczenia.

24 Upewnij się, że wybrano rodzaj pliku **Experiment Document Single files (*.eds)**.

25 Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a program zapisze plik doświadczenia we wskazanym folderze.

Etap 8. Zapisanie doświadczenia jako szablonu w celu wykorzystania w przyszłości

26 Kliknij grot strzałki skierowany w dół, znajdujący się obok przycisku **Save**, aby rozwinąć menu z opcjami zapisu.

27 Wybierz z menu opcję **Save As Template**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Save As Template.

28 Wybierz folder dla nowego szablonu.

29 W polu File name wpisz **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

30 Upewnij się, że wybrano rodzaj pliku **Experiment Document Template files (*.edt)**.

31 Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a program zapisze nowy plik szablonu we wskazanym folderze.

W przyszłych oznaczeniach należy korzystać z zapisanego szablonu w celu tworzenia i konfigurowania doświadczenia qRT-PCR w sposób opisany w części „**Tworzenie doświadczenia ABI 7500 Fast na podstawie zapisanego szablonu**”.

Na tym etapie należy bezpośrednio przejść do części „**Przygotowywanie reakcji qRT-PCR**” na stronie 41.

Tworzenie doświadczenia ABI 7500 Fast na podstawie zapisanego szablonu

Jeśli szablon doświadczenia z niezbędną konfiguracją płytki oraz profilem termicznym nie został utworzony, należy zapoznać się z częścią „**Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia ABI 7500 Fast (wymagane, jeśli szablon nie został jeszcze utworzony)**” na stronie 27.

Etap 1. Utworzenie doświadczenia

1 Włącz urządzenie ABI 7500 Fast.

2 Z poziomu komputera połączanego z urządzeniem otwórz aplikację 7500 System Software.

3 Na ekranie głównym pod opcją **Set Up** kliknij opcję **Template**.

Zostanie wyświetlone okno dialogowe Open.

4 W oknie dialogowym przejdź do folderu, w którym został zapisany szablon.

5 Kliknij dwukrotnie plik **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt**.

Urządzenie rozpocznie inicjalizację.

7500 System Software zostanie otwarte na ekranie Experiment z wyświetloną konfiguracją płytki.

Etap 2. Zapisanie doświadczenia

6 Kliknij grot strzałki skierowany w dół, znajdujący się obok przycisku **Save** u góry ekranu, aby rozwinąć menu z opcjami zapisu.

7 Wybierz z menu opcję **Save As**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Save As.

- 8 Wybierz folder dla pliku nowego doświadczenia.
- 9 W polu File name wpisz nazwę doświadczenia.
- 10 Upewnij się, że wybrano rodzaj pliku **Experiment Document Single files (*.eds)**.
- 11 Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a program zapisze plik doświadczenia we wskazanym folderze.

Na tym etapie należy bezpośrednio przejść do części „**Przygotowywanie reakcji qRT-PCR**” na stronie 41.

Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (wymagane, jeśli nie utworzono jeszcze zapisanego protokołu i plików płytki)

Jeśli istnieje już odpowiedni protokół oraz pliki płytki, należy przejść do części „**Tworzenie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR z użyciem zapisanego protokołu i plików płytki**” na stronie 40.

Etap 1. Utworzenie doświadczenia

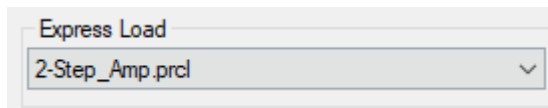
- 1 Włącz urządzenie do reakcji PCR w czasie rzeczywistym CFX96 Touch.
- 2 Z poziomu komputera połączanego z urządzeniem otwórz oprogramowanie Bio-Rad CFX Maestro.
- 3 W kreatorze uruchamiania wybierz z listy rozwijanej **Select instrument** opcję **CFX96**, a następnie kliknij ustawienie **User-defined**.

Zostanie otwarty ekran Run Setup z kartą Protocol. Na środku ekranu wyświetlany jest domyślny profil termiczny.

Etap 2. Konfiguracja profilu termicznego

- 4 Z listy rozwijanej Express Load wybierz opcję **2-Step_Amp.prcl**.

Profil termiczny zostanie zaktualizowany do ustawień domyślnych dla 2-etapowego protokołu amplifikacji, odpowiedniego do stosowania z sondami fluorescencyjnymi.

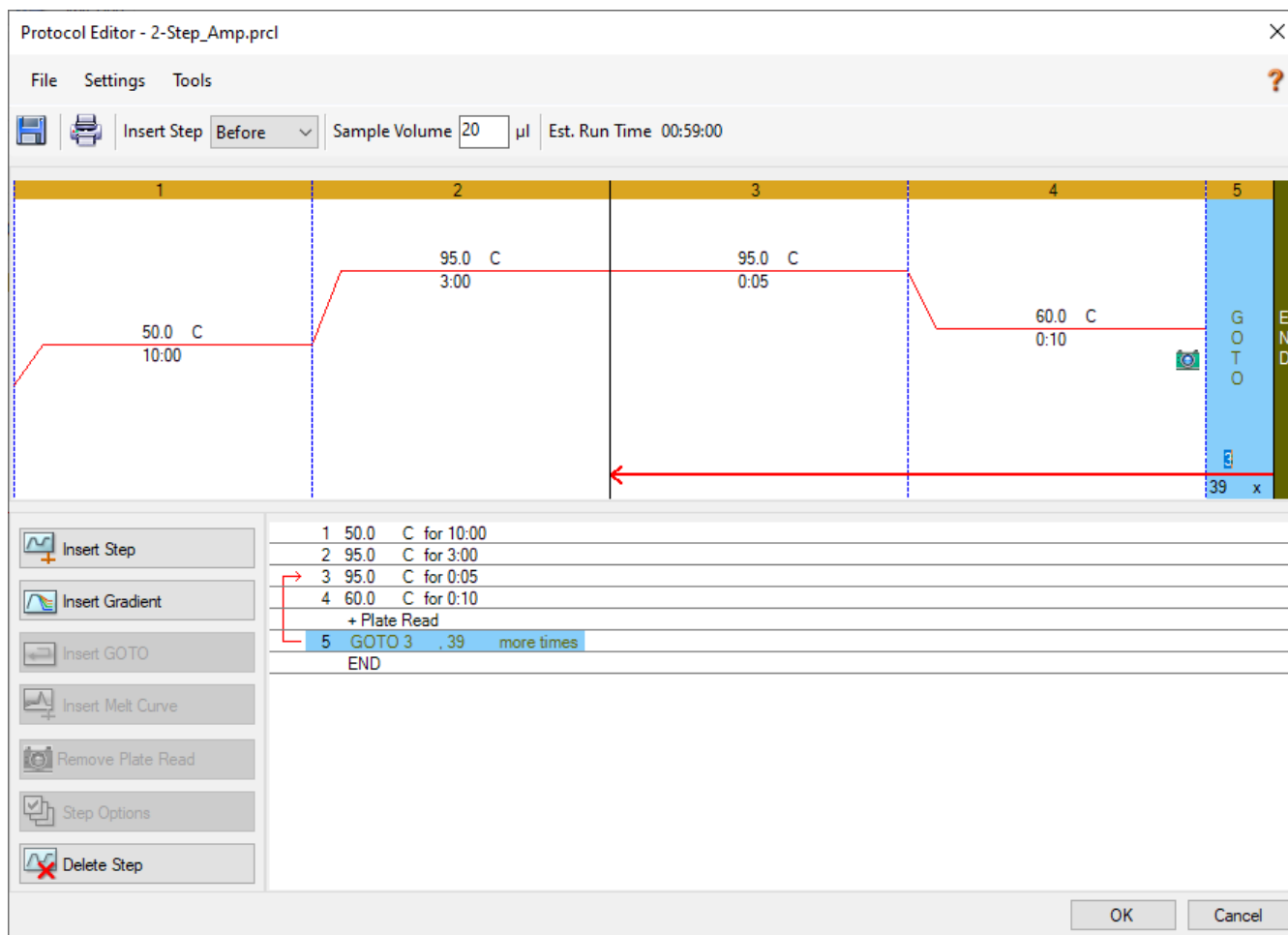


Rycina 12 Opcja szybkiego wczytywania z wybranym ustawieniem **2-Step_Amp.prcl** na karcie protokołu oprogramowania CFX Maestro

- 5 Kliknij opcję **Edit Selected**.

Zostanie otwarte okno Protocol Editor.
- 6 W oknie Protocol Editor dodaj etap dla odwrotnej transkrypcji na początku profilu termicznego.
 - a Wybierz etap 1 na ilustracji profilu termicznego.
 - b Z listy rozwijanej Insert Step wybierz opcję **Before**.

- c Kliknij opcję **Insert Step**.
Nowy etap 1 zostanie dodany przed wybranym etapem.
 - d Zmień ustawienia nowego etapu na 50°C przez 10 minut.
- 7 Dostosuj pozostałe etapy profilu termicznego, tak aby odpowiadały tym, które przedstawia **Rycina 13**. Podsumowanie ustawień zawiera również **Tabela 11**. Upewnij się, że dla etapu GOTO (etapu 5) wybrano ustawienie powtórzenia 39 razy.



Rycina 13 Profil termiczny w oknie edytora protokołu oprogramowania CFX Maestro

Tabela 11 Program cyklu termicznego dla urządzenia do reakcji PCR w czasie rzeczywistym Bio-Rad CFX96 Touch

Numer segmentu	Liczba cykli	Czas trwania	Temperatura
1	1	10 minut	50°C
2	1	3 minuty	95°C
3	40	5 sekund	95°C
		10 sekund	60°C

Etap 3. Zapisz plik protokołu.

- 8 Kliknij opcję **Save**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Save As z poleceniem zapisania pliku protokołu dla doświadczenia. Plik protokołu zawiera ustawienia z karty Protocol ekranu Run Setup.

- 9 Wybierz folder dla pliku protokołu.

- 10 W polu File name wpisz **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol**.

- 11 Upewnij się, że wybrano rodzaj pliku **Protocol File (*.prcl)**.

- 12 Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a program zapisze plik protokołu we wskazanym folderze.

- 13 Kliknij przycisk **OK**, aby zamknąć okno Protocol Editor.

W przyszłych oznaczeniach skorzystaj z zapisanego pliku protokołu w celu skonfigurowania karty Protocol w sposób opisany w części „**Tworzenie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR z użyciem zapisanego protokołu i plików płytki**”.

Etap 4. Wybór fluoroforów i przypisanie nazw elementów docelowych

- 14 U dołu ekranu Run Setup kliknij przycisk **Next**.

Na ekranie Run Setup zostanie wyświetlona karta Plate. Na środku ekranu wyświetlana jest ilustracja mapy płytki.

- 15 Upewnij się, że z listy rozwijanej Scan Mode wybrano ustawienie **All Channels**.

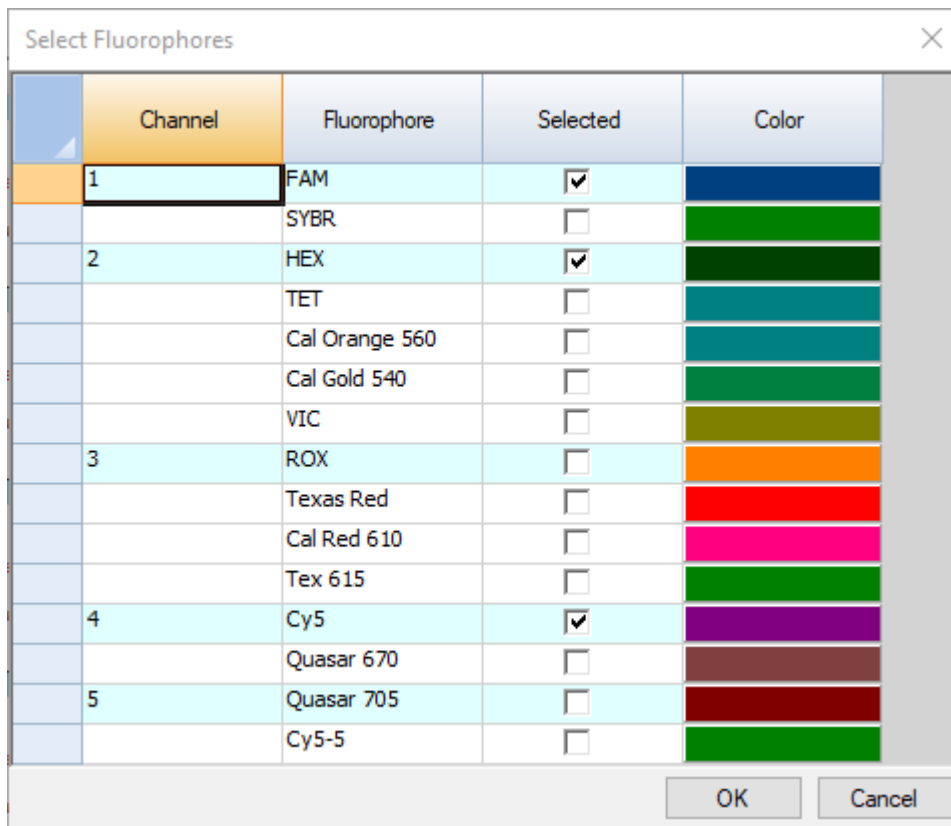
- 16 Kliknij opcję **Edit Selected**.

Zostanie otwarte okno Plate Editor.

- 17 W oknie Plate Editor kliknij opcję **Select Fluorophores**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Select Fluorophores.

- 18 W oknie dialogowym zaznacz pola wyboru dla fluoroforów **FAM**, **HEX** i **Cy5**. Usuń zaznaczenie pól wyboru dla wszystkich pozostałych fluoroforów. Zob. **Rycina 14**.



Rycina 14 Wybór fluoroforów w oknie dialogowym wyboru fluoroforów oprogramowania CFX Maestro

19 Kliknij przycisk **OK**.

Okno dialogowe Select Fluorophores zostanie zamknięte. Trzy wybrane fluorofory będą widoczne na liście po prawej stronie okna Plate Editor pod opcją **Target Names**.

20 Wybierz wszystkie dołki na mapie płytki.

Wybrane dołki są wyróżnione kolorem niebieskim.

Zaznaczenie wszystkich 96 dołków jest prawidłowe, jeśli wszystkie dołki na płytce zostaną uwzględnione w reakcji qRT-PCR. Jeśli któryś dołek na płytce będzie pusty, należy odznaczyć go na tym etapie.

21 Upewnij się, że pod opcją **Target Names** zaznaczone są wszystkie trzy fluorofory oraz że dla wszystkich dołków wyświetlane są nazwy wszystkich trzech fluoroforów.

22 W polach obok nazw fluoroforów wpisz nazwy elementów docelowych dla fluoroforów (zob. **Rycina 15**). Naciśnij klawisz **Enter** po wpisaniu każdej nazwy, aby zastosować nazwę do dołków na płytce.

Target Names

Load ☒ FAM N1 +

Load ☒ HEX N2 +

Load ☒ Cy5 RP +

Rycina 15 Przypisywanie nazw elementów docelowych w oknie edytora płytki oprogramowania CFX Maestro

Etap 5. Przypisanie rodzajów i nazw próbek

23 Przypisz próbce rodzaj próbki kontrolnej niezawierającej matrycy.

- Wybierz dołek A12 na mapie płytki.
- Z listy rozwijanej Sample Type wybierz opcję **NTC**.

Etykieta **NTC** zostanie wyświetlona u góry dołka A12.

24 Upewnij się, że wszystkie pozostałe dołki mają przypisany rodzaj próbki Unknown, co wskazuje etykieta **Unk** u góry dołków (zob. **Rycina 16**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP

Rycina 16 Przypisywanie rodzajów próbek w oknie edytora płytki oprogramowania CFX Maestro

25 W dołku B12 przypisz nazwę próbki dla próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka.

a Wybierz dołek B12 na mapie płytki.

Jeśli na płytce musi zostać uwzględniona więcej niż jedna próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka, wybierz wymaganą liczbę dodatkowych dołków w kolumnie 12 na mapie płytki.

b W polu pod opcją **Sample Names** wpisz **HSC** (zob. **Rycina 17**). Naciśnij klawisz **Enter**.

Nazwa próbki HSC zostanie wyświetlona w wybranym dołku/wybranych dołkach.



Rycina 17 Dodawanie nazwy próbki HSC w oknie edytora płytki oprogramowania CFX Maestro

26 W dołku H12 przypisz nazwę próbki dla dodatkowej próbki kontrolnej SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control.

a Wybierz dołek H12 na mapie płytki.

b W polu pod opcją **Sample Names** wpisz **Pos** i naciśnij klawisz **Enter**.

Nazwa próbki Pos zostanie wyświetlona w dołku H12.

Etap 6. Zapisanie pliku płytki

27 Kliknij opcję **Save**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Save As z poleceniem zapisania pliku płytki dla doświadczenia. Plik płytki zawiera ustawienia z karty Plate ekranu Run Setup.

28 Wybierz folder dla pliku płytki.

29 W polu File name wpisz **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate**.

30 Upewnij się, że wybrano rodzaj pliku **Plate File (*.pltd)**.

31 Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a program zapisze plik płytki we wskazanym folderze.

32 Kliknij przycisk **OK**, aby zamknąć okno Plate Editor.

33 U dołu ekranu Run Setup kliknij przycisk **Next**.

Na ekranie Run Setup zostanie wyświetlona karta Start Run.

W przyszłych oznaczeniach skorzystaj z zapisanego pliku płytki w celu skonfigurowania karty Plate w sposób opisany w części „**Tworzenie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR z użyciem zapisanego protokołu i plików płytki**”.

Na tym etapie należy bezpośrednio przejść do części „**Przygotowywanie reakcji qRT-PCR**” na stronie 41.

Tworzenie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR z użyciem zapisanego protokołu i plików płytki

Jeśli doświadczenie z niezbędną konfiguracją płytki oraz profilem termicznym nie zostało utworzone, należy zapoznać się z częścią „**Tworzenie i konfigurowanie doświadczenia Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (wymagane, jeśli nie utworzono jeszcze zapisanego protokołu i plików płytki)**” na stronie 34.

Etap 1. Utworzenie doświadczenia

- 1 Włącz urządzenie do reakcji PCR w czasie rzeczywistym CFX96 Touch.
- 2 Z poziomu urządzenia połączonego z komputerem otwórz oprogramowanie Bio-Rad CFX Maestro.
- 3 W kreatorze uruchamiania wybierz z listy rozwijanej **Select instrument** opcję **CFX96**, a następnie kliknij ustawienie **User-defined**.

Zostanie otwarty ekran Run Setup z kartą Protocol. Na środku ekranu wyświetlany jest domyślny profil termiczny.

Etap 2. Wczytanie pliku protokołu

- 4 Kliknij opcję **Select Existing**.
- 5 W oknie dialogowym przejdź do folderu, w którym zapisany jest plik **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prcl**.
- 6 Kliknij dwukrotnie plik protokołu.

Ustawienia z pliku protokołu zostaną wczytane do doświadczenia.

Etap 3. Wczytanie pliku płytki

- 7 U dołu ekranu Run Setup kliknij przycisk **Next**.
- 8 Kliknij opcję **Select Existing**.
- 9 W oknie dialogowym przejdź do folderu, w którym zapisany jest plik **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.pltd**.
- 10 Kliknij dwukrotnie plik płytki.

Ustawienia z pliku płytki zostaną wczytane do doświadczenia.

- 11 U dołu ekranu Run Setup kliknij przycisk **Next**.

Na ekranie Run Setup zostanie wyświetlona karta Start Run.

Na tym etapie należy bezpośrednio przejść do części „**Przygotowywanie reakcji qRT-PCR**” na stronie 41.

Przygotowywanie reakcji qRT-PCR

PRZESTROGA

Płytkę do reakcji qRT-PCR należy przygotować tuż przed użyciem i trzymać ją przez cały czas na lodzie lub chłodzonym statywie do momentu umieszczenia w urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Etap 1. Przygotowanie mieszaniny odczynników i płytki do reakcji qRT-PCR w obszarze wyznaczonym dla czynności przed reakcją PCR

- 1 Rozmroź na lodzie wszystkie zamrożone odczynniki do reakcji qRT-PCR. Listę wszystkich wymaganych odczynników zawiera **Tabela 12**. Mieszaninę 10x SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx oraz barwnik referencyjny Reference Dye Dx należy chronić przed działaniem światła.
- 2 Przygotuj rozcieńczenie 1:500 dostarczonego barwnika referencyjnego Reference Dye Dx z użyciem wody niezawierającej nukleazy (w celu uzyskania końcowego stężenia 30 nM w reakcjach). Wszystkie roztwory zawierające barwnik referencyjny należy chronić przed działaniem światła.

Rozcieńczony barwnik referencyjny Reference Dye Dx, jeśli jest przechowywany w temperaturze 4°C w probówce zabezpieczonej przed dostępem światła, można zużyć w ciągu dnia na potrzeby dodatkowych oznaczeń.

- 3 Przygotuj mieszaninę odczynników, łącząc składniki wymienione w **Tabela 12** we wskazanej kolejności. Przygotuj jedną mieszaninę odczynników dla wszystkich próbek (3 próbki kontrolnych i maksymalnie 93 próbek badanych), wykorzystując wielokrotność wszystkich składników wymienionych poniżej. Mieszaninę odczynników należy trzymać na lodzie i chronić przed działaniem światła. Należy ją przygotować tuż przed użyciem.
 - W przypadku przygotowywania 96 reakcji mieszaninę odczynników należy przygotować w probówce o pojemności 2 ml.
 - Jeśli przygotowywanych jest 48 reakcji, mieszaninę odczynników należy przygotować w probówce o pojemności 1,5 ml.

Tabela 12 zawiera wyliczone objętości potrzebne do przygotowania 1, 48 i 96 reakcji.

Tabela 12 Mieszanina odczynników do reakcji qRT-PCR

Składnik	Objętość dla 1 reakcji	Objętość dla 48 reakcji (w tym nadwyżka)	Objętość dla 96 reakcji (w tym nadwyżka)
Woda niezawierająca nukleazy	1,5 µl	81 µl	162 µl
Mieszanina 2 x Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 µl	540 µl	1080 µl
Mieszanina 10 x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx	2 µl	108 µl	216 µl
100 mM DTT Dx	0,2 µl	10,8 µl	21,6 µl
Rozcieńczony barwnik referencyjny Reference Dye Dx (z etap 2)	0,3 µl	16,2 µl	32,4 µl
RT/RNase Block Dx	1 µl	54 µl	108 µl

- 4 Ostrożnie wymieszaj mieszaninę odczynników na wortexie, unikając powstawania pęcherzyków, a następnie odwiruj probówkę w mikrowirówce przez 5 sekund.
- 5 Przenieś po 15 μl mieszaniny odczynników do dołków na płytce z 96 dołkami, korzystając z poniższej procedury.
 - a Umieść czysty pasek 8 probówek w chłodzonym statywie na płytce z 96 dołkami.
 - b Przenieś 190 μl mieszaniny odczynników (w przypadku wykonywania 96 reakcji) lub 100 μl (w przypadku 48 reakcji) do każdej z 8 probówek w pasku. W razie potrzeby uwolnij wszystkie duże pęcherzyki powietrza, które mogły powstać na dnie probówek.
 - c Za pomocą pipety wielokanałowej przenieś po 15 μl mieszaniny odczynników z paska 8 probówek do kolumn płytki z 96 dołkami. W czasie całego procesu płytka powinna znajdować się na lodzie lub chłodzonym statywie na płytce z 96 dołkami, chroniona przed dostępem światła.

UWAGA

W przypadku wykonywania 48 reakcji kolumny od 1 do 6 należy pozostawić puste.

- 6 Po przykryciu płytki przenieś ją do obszaru wyznaczonego na czynności przed reakcją PCR w celu dodania próbek. Przechowuj płytkę na lodzie lub chłodzonym statywie.

Etap 2. Naniesienie próbek kontrolnych i badanych na płytkę do reakcji qRT-PCR w obszarze wyznaczonym na czynności przed reakcją PCR (obszarze dodawania próbek)

- 7 Rozcieńcz dodatnią próbkę kontrolną SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control w celu uzyskania roztworu roboczego o stężeniu 10 kopii/ μl .
 - a Dodaj 99 μl wody niezawierającej nukleazy do czystej probówki o objętości 1,5 ml. Do tej probówki dodaj 1 μl nierozcieńczonej dodatniej próbki kontrolnej SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control. Dobrze wymieszaj na wortexie, a następnie krótko odwiruj w mikrowirówce.
 - b Dodaj 99 μl wody niezawierającej nukleazy do drugiej czystej probówki o objętości 1,5 ml. Do tej probówki dodaj 1 μl rozcieńczonej dodatniej próbki kontrolnej SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control, przygotowanej podczas **etap a**. Dobrze wymieszaj na wortexie, a następnie krótko odwiruj w mikrowirówce.

Ta probówka zawiera roztwór roboczy dodatniej próbki kontrolnej SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control o stężeniu 10 kopii/ μl .

Roztwór roboczy, jeśli jest przechowywany w temperaturze 4°C, można zużyć w ciągu dnia na potrzeby dodatkowych oznaczeń. Odłóż oryginalny roztwór dodatniej próbki kontrolnej SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control do przechowywania w temperaturze -80°C.

8 Przygotuj reakcje kontrolne w sposób, który przedstawia **Rycina 18**.

- W celu uzyskania próbki kontrolnej niezawierającej matrycy (NTC) dodaj 5 µl wody niezawierającej nukleazy do dołka A12.
- W celu uzyskania próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (HSC) krótko wymieszaj na wortexie RNA uzyskane z próbki HSC. Następnie dodaj 5 µl RNA do dołka B12.

Jeśli na płytce używana będzie więcej niż jedna próbka HSC, skorzystaj z dodatkowych dołków w kolumnie 12, wyznaczonych podczas konfigurowania płytki w oprogramowaniu urządzenia do reakcji qRT-PCR.

- W celu uzyskania dodatkowej próbki kontrolnej SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control (Pos) dodaj 5 µl rozcieńczonej dodatkowej próbki kontrolnej SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control do dołka H12.

9 Przygotowywanie reakcji dla próbek badanych (od S1 do S93) (zob. **Rycina 18**). Często zmieniaj rękawiczki, aby uniknąć zanieczyszczenia.

- Krótko wymieszaj na wortexie próbki RNA uzyskane z próbek badanych. Następnie odwiruj je w mikrowirówce przez 5 sekund.
- W przypadku każdej próbki nanieś 5 µl do jednego dołka na płytce do reakcji qRT-PCR. Zwracaj dokładną uwagę, która próbka jest dodawana do każdego dołka. Po każdym dodaniu próbki zmieniaj końcówkę pipety.
- Jeśli płytka do reakcji qRT-PCR ma zostać zamknięta folią samoprzylepną, przed zamknięciem wymieszaj krótko mieszaniny, pobierając je pipetą i wypuszczając z powrotem, unikając powstawania pęcherzyków powietrza.

UWAGA

W przypadku wykonywania 48 reakcji dołki na płytce od S1 do S48 należy pozostawić puste.

10 Zamknij płytkę folią samoprzylepną lub paskami wieczek probówek.

11 Jeśli płytka jest zamykana paskami wieczek probówek, krótko wymieszaj ją na wortexie. (Nie należy korzystać z wortexu w przypadku płytek zamkniętych folią samoprzylepną).

12 Krótko odwiruj płytkę w wirówce do płytek.

13 Jeśli korzystasz z systemu Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System i płytki zamkniętej folią samoprzylepną, umieść nad płytką wkładkę kompresyjną.

14 Przejdź bezpośrednio do przeprowadzenia reakcji qRT-PCR w systemie do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

- Zob. część „**Wykonywanie reakcji qRT-PCR w systemie Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System**” na stronie 46
- Zob. część „**Wykonywanie reakcji qRT-PCR na urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym ABI 7500 Fast**” na stronie 54
- Zob. część „**Wykonywanie reakcji qRT-PCR w systemie Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System**” na stronie 61

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	NTC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	HSC
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S89
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S90
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S91
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S92
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S93
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	Pos

Rycina 18 Konfiguracja płytki dla próbek badanych 1–93 i próbek kontrolnych (próbka kontrolna niezawierająca matrycy [NTC], próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka [HSC] oraz dodatnia próbka kontrolna Synthetic Positive RNA Control Dx [Pos])

5 Instrukcje przeprowadzania reakcji qRT-PCR

Wykonywanie reakcji qRT-PCR w systemie Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System **46**

Wykonywanie reakcji qRT-PCR na urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym ABI 7500 Fast **54**

Wykonywanie reakcji qRT-PCR w systemie Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System **61**

W niniejszym rozdziale zamieszczono instrukcje dotyczące wykonywania programu cyklicznych reakcji qRT-PCR na wybranym urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Wykonywanie reakcji qRT-PCR w systemie Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

W tej części opisano procedurę wykonywania reakcji qRT-PCR w systemie Agilent AriaMx lub AriaDx Real-Time PCR System.

Uruchomienie programu reakcji qRT-PCR w systemie AriaMx/AriaDx

- 1 Sprawdź, czy zasilanie urządzenia AriaMx/AriaDx jest włączone.
- 2 Z poziomu komputera połączanego z urządzeniem otwórz doświadczenie, które zostało wcześniej utworzone w aplikacji Aria.
- 3 Przejdź do ekranu Thermal Profile, Run Status lub Raw Data Plots.
- 4 Kliknij opcję **Run**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Instrument Explorer.
- 5 Odszukaj urządzenie, z którego będziesz korzystać do przeprowadzenia serii oznaczenia, i kliknij opcję **Send Config**. (Instrukcje dotyczące wyszukiwania i dodawania urządzenia można znaleźć w przewodniku konfiguracji i użytkownika systemu AriaMx lub AriaDx).
 - Jeśli połączenie z urządzeniem następuje po raz pierwszy od momentu uruchomienia programu Aria, wyświetlone zostanie okno dialogowe Login. Wybierz nazwę użytkownika z listy rozwijanej, wpisz hasło logowania w polu Password, a następnie kliknij przycisk **Login**. Aby zalogować się z użyciem innego konta użytkownika, kliknij prawym przyciskiem myszy nazwę urządzenia, a następnie opcję **Log off current user**. Będzie wtedy możliwe zalogowanie na požądane konto użytkownika.
 - Jeśli doświadczenie nie zostało jeszcze zapisane, zostanie wyświetlone polecenie zapisania doświadczenia przed kontynuacją.
- 6 Przenieś płytkę reakcyjną do urządzenia i umieść na bloku termicznym.
- 7 Na ekranie dotykowym urządzenia otwórz przygotowane doświadczenie na ekranie Thermal Profile i naciśnij przycisk **Run Experiment**.

Urządzenie rozpocznie prowadzenie doświadczenia.
- 8 Wróć do programu na komputerze. Program przekieruje użytkownika na ekran Run Status, na którym można monitorować postęp serii oznaczenia.

Monitorowanie serii oznaczenia nie jest wymagane. Jeśli oprogramowanie Aria zostanie zamknięte przed ukończeniem serii oznaczenia, należy zanotować, gdzie zostanie zapisany plik doświadczenia po serii oznaczenia.

Przypisanie ustawień analizy danych dla doświadczenia AriaMx/AriaDx

Etap 1. Wyświetlenie wykresów amplifikacji dla wszystkich elementów docelowych we wszystkich dołkach

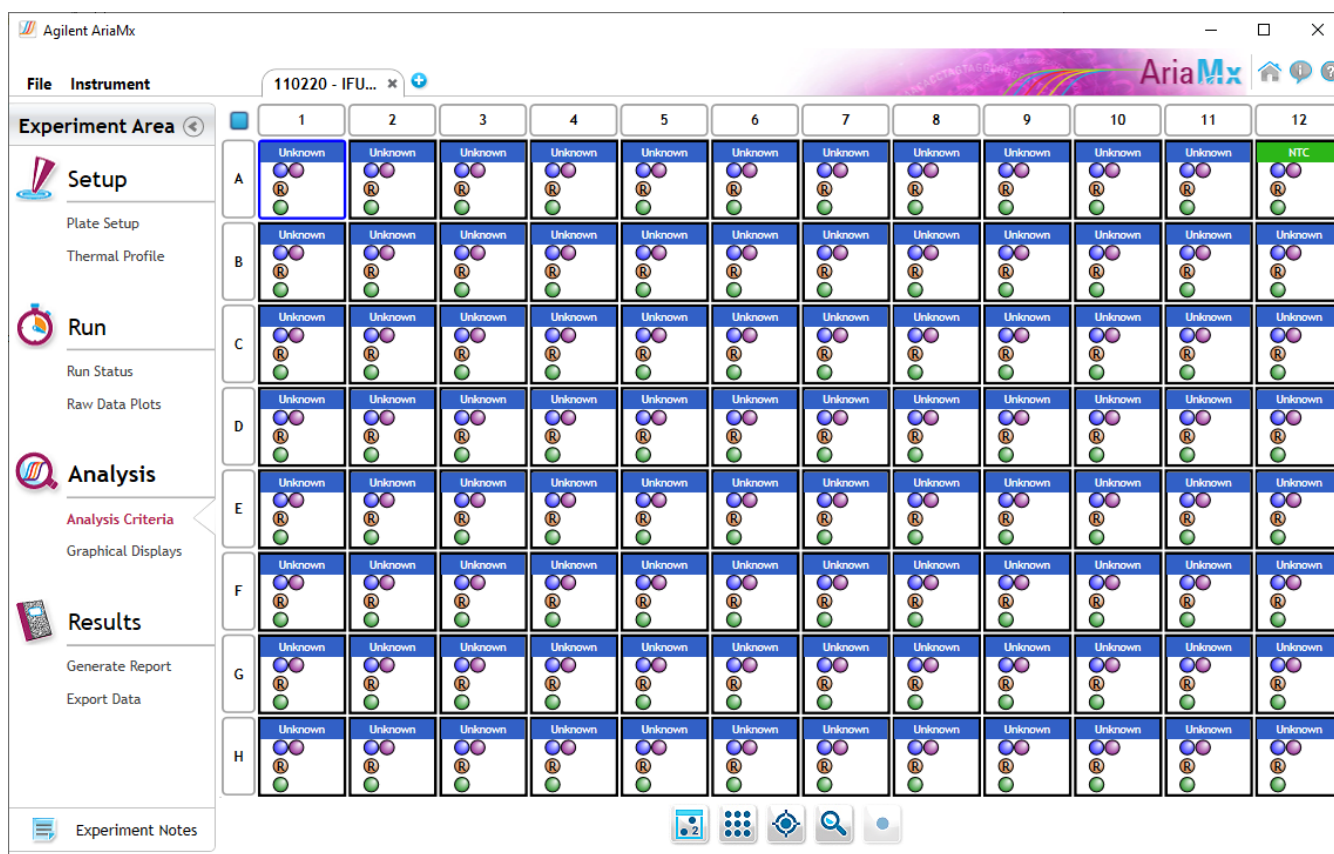
- 1 Po zakończeniu serii oznaczenia otwórz plik doświadczenia w oprogramowaniu Aria.
- 2 Kliknij opcję **Analysis Criteria** po lewej stronie ekranu.

Zostanie otwarty ekran Analysis Criteria z ustawieniami umożliwiającymi określenie ustawień analizy.

- 3 Upewnij się, że na potrzeby analizy zostały wybrane wszystkie dołki, rodzaje dołków i elementy docelowe (zob. **Rycina 19**).

UWAGA

Jeśli płytkę zawiera puste dołki, upewnij się, że na karcie Plate Setup przypisano im rodzaj dołka Blank.



Rycina 19 Ekran kryteriów analizy oprogramowania Aria

- 4 Kliknij opcję **Graphical Displays** po lewej stronie ekranu.

Zostanie otwarty ekran Graphical Displays, na którym będą wyświetlane dane z narzędziami do konfigurowania parametrów analizy.

- 5 Upewnij się, że na ekranie wyświetlany jest wykres Amplification Plots oraz że domyślne parametry analizy odpowiadają tym, które przedstawia **Rycina 20**.

Jeśli pełny panel parametrów analizy, który przedstawia **Rycina 20**, nie jest widoczny, kliknij grot strzałki skierowany w dół, znajdujący się tuż pod opcją **Smoothing**, aby rozwinąć panel.

Należy pamiętać, że domyślne wartości Threshold Fluorescence w doświadczeniu użytkownika będą się prawdopodobnie różnić od wartości, które przedstawia **Rycina 20**. Oprogramowanie oblicza domyślne wartości na podstawie poziomu szumu fluorescencji w zakresie cykli tła. W związku z tym wartości domyślne będą się różnić pomiędzy doświadczeniami.

Amplification Plots

Fluorescence Term:

Smoothing:

Baseline Correction:

Crosstalk Correction:

Graph Type:

Threshold Fluorescence:

☒ N1	-	0.021	+		
☒ N2	-	0.028	+		
☒ RP	-	0.038	+		

Background Based Threshold

Cycle Range: - 5 + thru - 9 +

Sigma Multiplier: - 10 +

Rycina 20 Domyślne ustawienia wykresów amplifikacji w oprogramowaniu Aria (wartości progowe fluorescencji będą różnić się pomiędzy doświadczeniami)

- 6 Upewnij się, że dla opcji **Background Based Threshold** wybrano domyślny zakres cykli 5–9.
- 7 Sprawdź wykresy amplifikacji z wczesną amplifikacją (tj. przed cyklem 9). Wyklucz z analizy wszystkie próbki badane z wczesną amplifikacją i oznacz je ponownie z wykorzystaniem mniejszego stężenia.

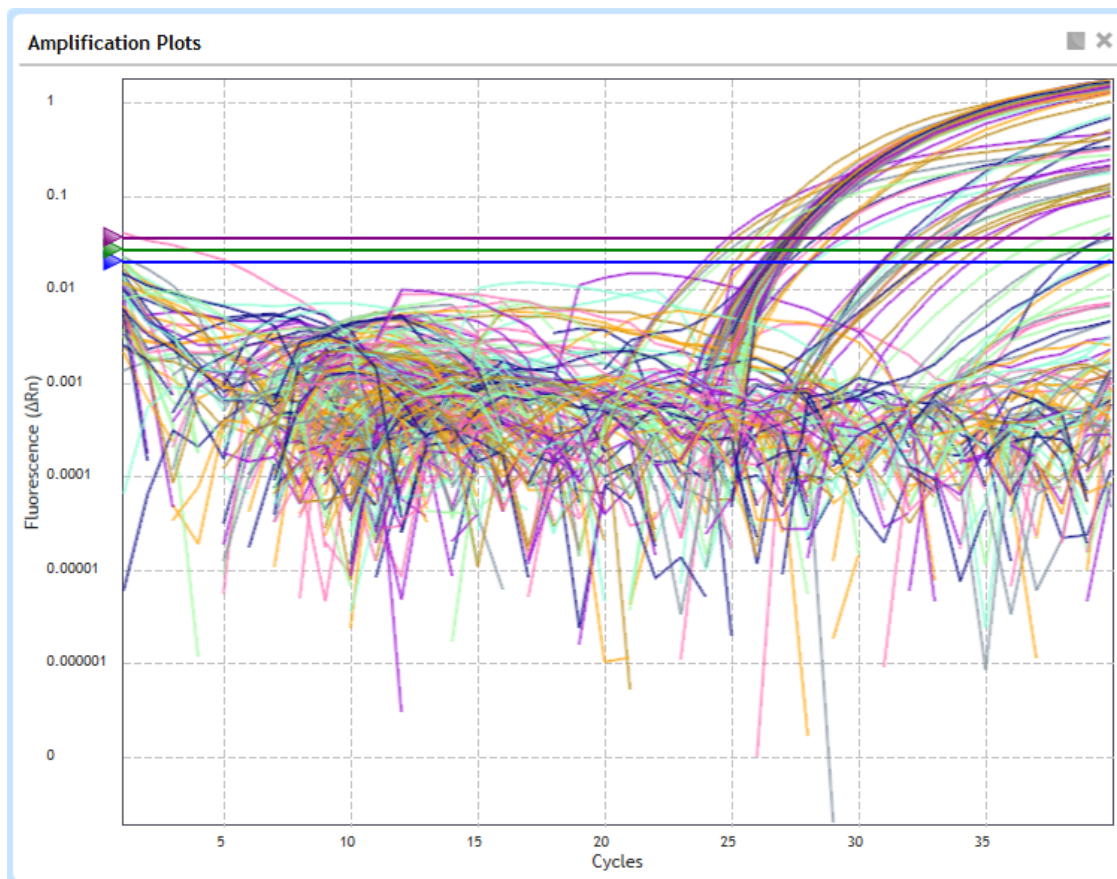
W próbkach badanych z nietypowo dużymi stężeniami wirusowego RNA amplifikacja wirusowych elementów docelowych może osiągnąć wykrywalne poziomy przy bardzo wczesnym numerze cyklu (< 9). W ramach obliczeń korekty z użyciem linii bazowej oprogramowanie może interpretować takie wczesne sygnały amplifikacji jako szum tła i nie przypisać w takich próbkach wartości Cq do elementów docelowych wirusa.

Należy prowadzić obserwację pod kątem obecności takich próbek badanych, wyświetlając wykresy amplifikacji bez korekty z zastosowaniem linii bazowej (termin fluorescencyjny R lub Rn). Jeśli któraś z badanych próbek wykazuje cechy amplifikacji przed 9. cyklem, należy usunąć te dołki z analizy, odznaczając je na ekranie Analysis Criteria. Następnie należy ponownie przeprowadzić reakcję qRT-PCR dla takiej próbki po rozcieńczeniu kwasu nukleinowego w stosunku 1:100 z użyciem odpowiedniego buforu do elucji.

Etap 2. Ocena wartości progowych

- 8 Dla opcji Graph Type zmień ustawienie z **Linear** na **Log**. Upewnij się, że dla opcji Fluorescence Term wybrano ustawienie ΔRn .

Wyświetlanie wykresów amplifikacji w wartościach logarytmicznych zapewnia lepszy obraz szumu tła sygnału. Przykład przedstawia **Rycina 21**. Linia wartości progowej dla każdego elementu docelowego jest wyświetlana w postaci poziomej linii.



Rycina 21 Wykresy amplifikacji oprogramowania Aria w skali logarytmicznej — wartości progowe elementów docelowych są wyświetlane w postaci poziomych linii

- 9 Oceń wzrokowo wykresy amplifikacji oraz domyślną wartość progową dla elementu docelowego N1.
- Kliknij ikonę wyświetlenia elementów docelowych znajdującą się poniżej wykresu. 
 - W otwartym menu usuń zaznaczenie pól wyboru dla wszystkich pozostałych elementów docelowych, tak aby na wykresie Amplification Plots wyświetlany był wyłącznie element docelowy N1.
 - Określ, czy wartość progowa jest zarówno wystarczająco wysoka, by przekraczała szum tła, jak i wystarczająco niska, by uwzględnić wykresy w wykładniczej fazie amplifikacji (zob. **Rycina 23**). Na podstawie tych ustaleń kontynuuj zgodnie ze wskazówkami, które zawiera **Tabela 13**.
- 10 Powtórz **etap 9** dla elementu docelowego N2, a następnie dla elementu docelowego RP.

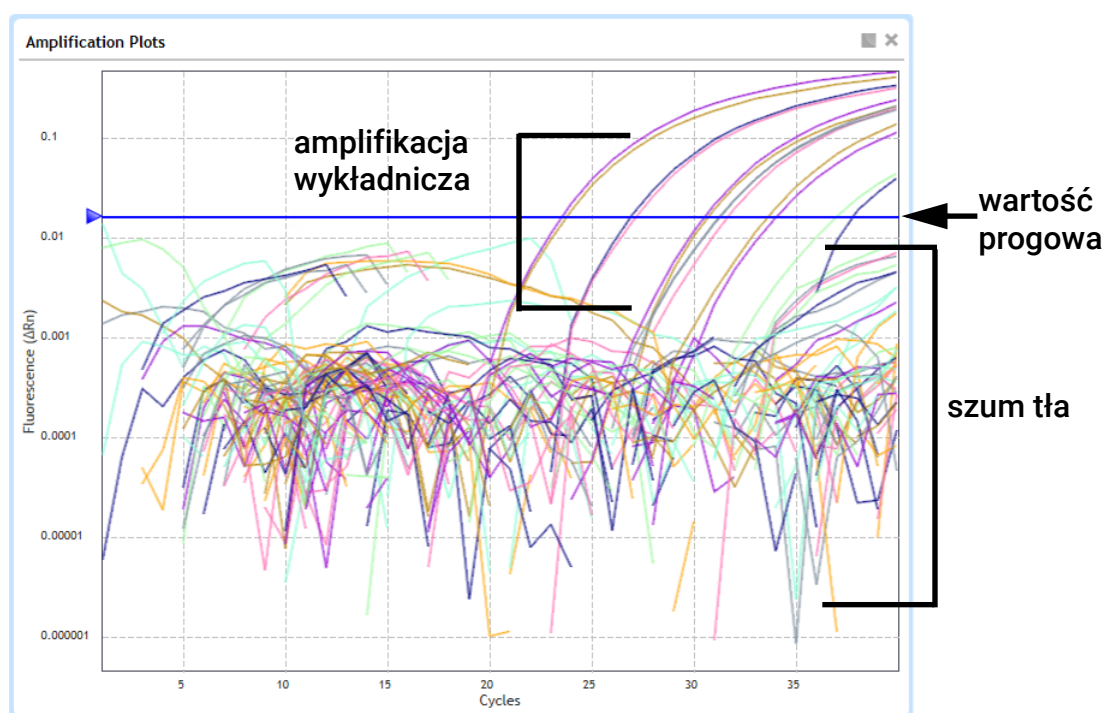
11 Upewnij się, że w obszarze **Threshold Fluorescence** zaznaczone są wszystkie trzy elementy docelowe oraz że wszystkie trzy wartości Threshold Fluorescence są zablokowane (zob. **Rycina 22**).

12 Kliknij ikonę wyświetlenia elementów docelowych znajdującą się poniżej wykresu.  Upewnij się, że wybrane są wszystkie elementy docelowe.

Threshold Fluorescence:

☒ N1	- 0.021 +		
☒ N2	- 0.028 +		
☒ RP	- 0.038 +		

Rycina 22 Wybrane elementy docelowe i zablokowane wartości Threshold Fluorescence



Rycina 23 Wykresy amplifikacji oprogramowania Aria dla elementu docelowego N1

Tabela 13 Weryfikowanie optymalnego ustawienia wartości progowej w oprogramowaniu Aria

Pozycja wartości progowej	Opis	Działanie
Optymalna pozycja	Powyżej szumu tła i obejmująca wszystkie wykresy w wykładniczej fazie amplifikacji	Zablokuj wartość Threshold Fluorescence po prawej stronie ekranu, klikając ikonę kłódki. Gdy wartość jest zablokowana, ikona przedstawia zamkniętą kłódkę. Zablokowanie wartości zapobiega jej zmianie w przypadku zmiany kryteriów analizy.
Zbyt wysoka	Niektóre wykresy w fazie wykładniczej amplifikacji nie przechodzą przez wartość progową	- Sprawdź, czy występują dołki z wyjątkowo dużym szumem tła. Takie odstające dołki mogą spowodować zbyt wysokie ustawienie wartości progowej przez oprogramowanie. - Wróć do ekranu Analysis Criteria, aby wykluczyć taki dołek z analizy. Oprogramowanie obliczy ponownie wartość progową po wykluczeniu wartości odstającej. Można również przeciągnąć ręcznie na wykresie za pomocą myszy linię wartości progowej do nowej pozycji. - Zweryfikuj, czy nowa wartość progowa jest w optymalnej pozycji, i zablokuj wartość Threshold Fluorescence zgodnie z opisem powyżej. - Po zablokowaniu nowej wartości wróć do ekranu Analysis Criteria, aby ponownie uwzględnić w analizie odstający dołek*. * Jeśli wykres amplifikacji dla odstającego dołka nie wykazuje amplifikacji wykładniczej w żadnym numerze cyklu, sprawdź, czy obniżona wartość progowa nie powoduje przypisania przez oprogramowanie do dołka wartości C_q (ze względu na sygnał tła przekraczający wartość progową). Jeśli tak jest, spróbuj zmodyfikować inne ustawienia analizy dla tego dołka, np. dostosować ustawienie Baseline Correction.
Zbyt niska	Niektóre wykresy nie znajdują się powyżej szumu tła.	Zwiększ wartość progową do poziomu nieznacznie przekraczającego szum tła.

Etap 3. Sprawdzenie wyników w dołku NTC

13 W tabeli Results Table odszukaj reakcję z próbką kontrolną niezawierającą matrycy (NTC), znajdującą się w dołku A12.

14 Upewnij się, że w kolumnie C_q dla wszystkich trzech elementów docelowych widoczna jest informacja „No C_q” lub wartość C_q > 37,00.

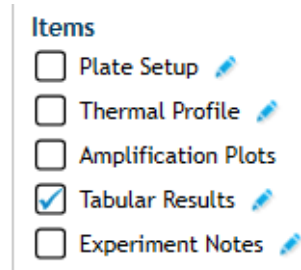
Jeśli wartość C_q dla reakcji NTC w przypadku któregoś elementu docelowego wynosi ≤ 37,00, mogło dojść do zanieczyszczenia próbki. Należy unieważnić serię i powtórzyć oznaczenie, ściśle stosując się do wytycznych.

Eksportowanie danych z oprogramowania Aria

Etap 1. Zdefiniowanie i zapisanie ustawień eksportu

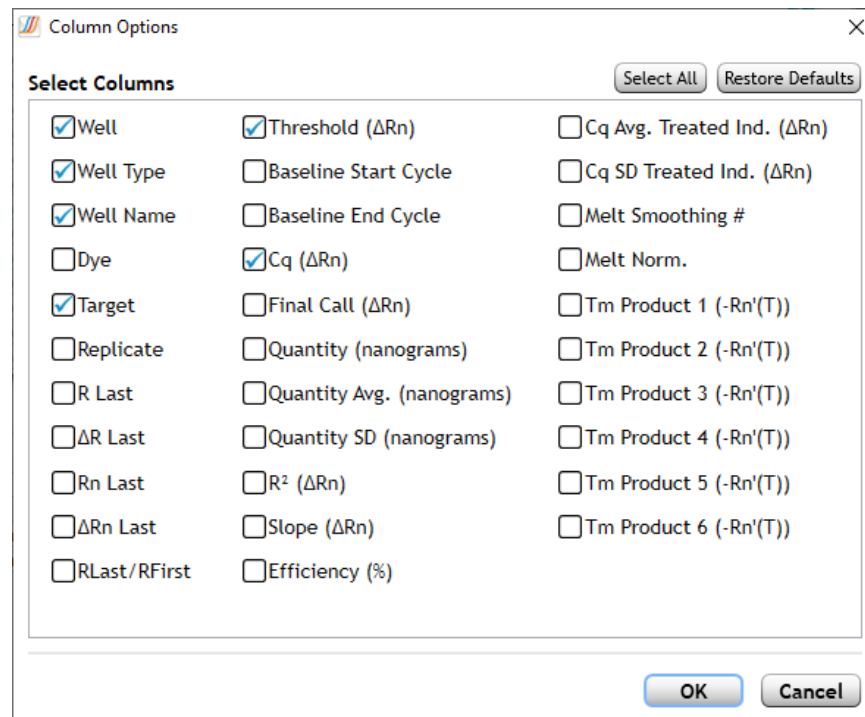
Jeśli ustawienia eksportu zostały już zapisane, przejdź bezpośrednio do „Etap 2. Eksportowanie danych” na stronie 53.

- 1 Po lewej stronie ekranu, pod opcją **Results** kliknij opcję **Export Data**.
Zostanie otwarty ekran Export Data.
- 2 W panelu Export Configuration wybierz rodzaj pliku dla eksportowanych danych, np. **Excel**.
- 3 Upewnij się, że dla opcji **Items** zaznaczono pole wyboru Tabular Results. Usuń zaznaczenie pól wyboru dla wszystkich pozostałych pozycji. Zob. **Rycina 24**.



Rycina 24 Ekran eksportowania danych oprogramowania Aria – pozycje do wyeksportowania

- 4 Kliknij ikonę ołówka obok opcji **Tabular Results** w celu określenia, które kolumny danych mają zostać uwzględnione.
Zostanie otwarte okno dialogowe Column Options.
- 5 Dostosuj ustawienia, tak aby do uwzględnienia były zaznaczone tylko kolumny, które przedstawia **Rycina 25**.



Zaznaczone kolumny:

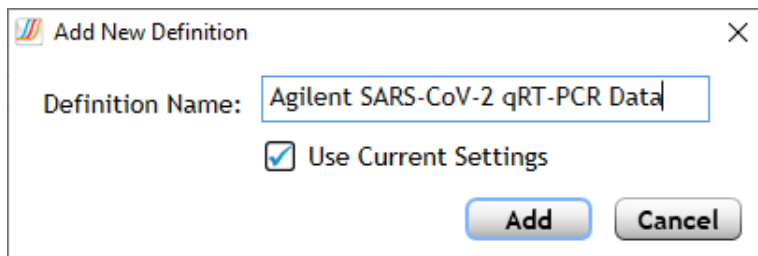
Well
Well Type
Well Name
Target
Threshold
Cq

Rycina 25 Okno dialogowe opcji kolumn oprogramowania Aria

- 6 Kliknij przycisk **OK**, aby zastosować zmiany i zamknąć okno dialogowe.

- 7 Zapisz ustawienia eksportu jako nową definicję.
 - a W panelu Export Configuration otwórz listę rozwijaną Definition.
 - b Kliknij opcję **Add New**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Add New Definition.
 - c W polu Definition Name wpisz **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**. Zob. **Rycina 26**.
 - d Upewnij się, że zaznaczone jest pole wyboru Use Current Settings.
 - e Kliknij przycisk **Add**.



Rycina 26 Okno dialogowe dodawania nowej definicji oprogramowania Aria

Etap 2. Eksportowanie danych

- 8 Upewnij się, że w panelu Export Configuration dla listy rozwijanej Definition wybrano ustawienie **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**.
- 9 Kliknij przycisk **Export Data**.

Zostanie otwarty raport w domyślnej aplikacji dla wybranego rodzaju pliku.
- 10 Przeanalizuj dane Cq dla każdej z próbek badanych i kontrolnych w celu interpretacji wyników. Zob. **Rozdział 6**, „Analiza i wyniki”

Wykonywanie reakcji qRT-PCR na urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym ABI 7500 Fast

W tej części opisano procedurę wykonywania reakcji qRT-PCR na urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym Applied Biosystems 7500 Fast.

Uruchamianie programu reakcji qRT-PCR na urządzeniu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym ABI 7500 Fast

- 1 Sprawdź, czy zasilanie urządzenia ABI 7500 Fast jest włączone.
- 2 Z poziomu komputera połączanego z urządzeniem otwórz doświadczenie, które zostało wcześniej utworzone w oprogramowaniu 7500.
- 3 Naciśnij drzwiczki tacki na urządzeniu, aby otworzyć pokrywę. Umieść płytkę reakcyjną na bloku termicznym urządzenia.
- 4 Dociśnij drzwiczki tacki, aby zamknąć pokrywę.
- 5 Z poziomu komputera kliknij opcję **START RUN**.
Urządzenie rozpocznie prowadzenie doświadczenia.

Przypisanie ustawień analizy danych dla doświadczenia ABI 7500 Fast

Etap 1. Wyświetlenie wykresów amplifikacji dla wszystkich elementów docelowych we wszystkich dołkach

- 1 Po zakończeniu serii oznaczenia otwórz oprogramowanie Design & Analysis.
- 2 U góry ekranu kliknij opcję Quality Check, jeśli nie została jeszcze zaznaczona. Upewnij się, że z listy rozwijanej wybrano opcję **Amplification Plot**.

Na ekranie amplifikacji wyświetlone zostaną wykresy amplifikacji, tabela wyników w każdej dołku oraz schemat mapy płytki.

UWAGA

Jeśli na płytce znajdują się puste dołki, pomiar w analizie wszystkie elementy docelowe dla tych dołków i przeprowadź ponowną analizę.

- 3 Kliknij kolejno opcje **Actions > Primary Analysis Setting**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Primary Analysis Settings. Domyślne ustawienia w tym oknie dialogowym przedstawia **Rycina 27**.

- 4 Sprawdź, czy ustawienia odpowiadają tym, które przedstawia **Rycina 27**. W razie potrzeby kliknij opcję **Reset to Default**.

Primary Analysis Setting

General

Well Cq

QC Alerts

PCR Stage/Step

Stage 3, Step 2

Algorithm Settings

Baseline Threshold

Target	Use Default	Auto Threshold	Threshold	Auto Baseline	Baseline Start	Baseline End
Default Setting		☒	AUTO	☒	AUTO	AUTO
N1	☒	☒	AUTO	☒	AUTO	AUTO
N2	☒	☒	AUTO	☒	AUTO	AUTO
RP	☒	☒	AUTO	☒	AUTO	AUTO

Reset to Default

Cancel

Save

Rycina 27 Ustawienia domyślne w oknie dialogowym głównych ustawień analizy oprogramowania Design & Analysis

- Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe Primary Analysis Settings zostanie zamknięte.

- Upewnij się, że w rogu przycisku Analize widoczny jest zielony znak zaznaczenia. Jeśli nie, kliknij przycisk **Analyze**.
- Sprawdź wykresy amplifikacji z wczesną amplifikacją (tj. przed cyklem 9). Wyklucz z analizy wszystkie próbki badane z wczesną amplifikacją i oznacz je ponownie z wykorzystaniem mniejszego stężenia.

W próbkach badanych z nietypowo dużymi stężeniami wirusowego RNA amplifikacja wirusowych elementów docelowych może osiągnąć wykrywalne poziomy przy bardzo wczesnym numerze cyklu (< 9). W ramach obliczeń korekty z użyciem linii bazowej oprogramowanie może interpretować takie wczesne sygnały amplifikacji jako szum tła i nie przypisać w takich próbkach wartości Cq do elementów docelowych wirusa.

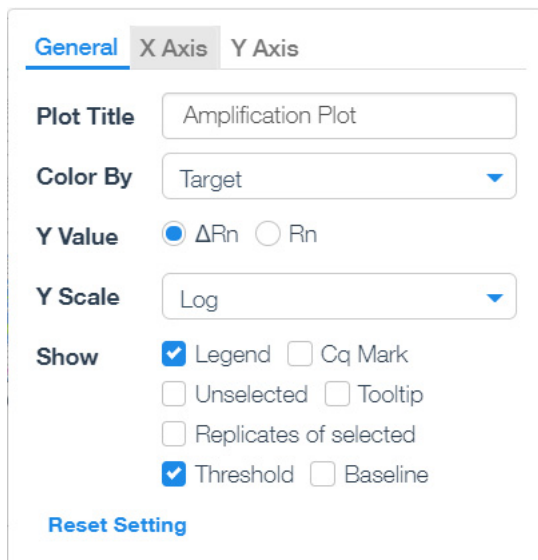
Należy prowadzić obserwację pod kątem obecności takich próbek badanych, wyświetlając wykres amplifikacji bez korekty z zastosowaniem linii bazowej (dla opcji **Y Value** wybierz ustawienie **Rn**). Jeśli któraś z badanych próbek wykazuje cechy amplifikacji przed 9. cyklem, należy usunąć te dołki z analizy, pomijając je na ekranie Quality Check. Następnie należy ponownie przeprowadzić reakcję qRT-PCR dla takiej próbki po rozcieńczeniu kwasu nukleinowego w stosunku 1:100 z użyciem odpowiedniego buforu do elucji.

Etap 2. Ocena wartości progowych

- Kliknij ikonę Settings znajdującą się tuż powyżej wykresu Amplification Plot.
Okno dialogowe Settings zostanie otwarte na karcie General.
- Upewnij się, że dla opcji Y Value wybrano ustawienie ΔRn .

10 Na liście rozwijanej Y Scale zmień ustawienie z **Linear** na **Log** (zob. **Rycina 28**).

Wyświetlanie wykresów amplifikacji w wartościach logarytmicznych zapewnia lepszy obraz szumu tła sygnału. Przykład przedstawia **Rycina 29**. Linia wartości progowej dla każdego elementu docelowego jest wyświetlana w postaci poziomej linii.



General X Axis Y Axis

Plot Title Amplification Plot

Color By Target

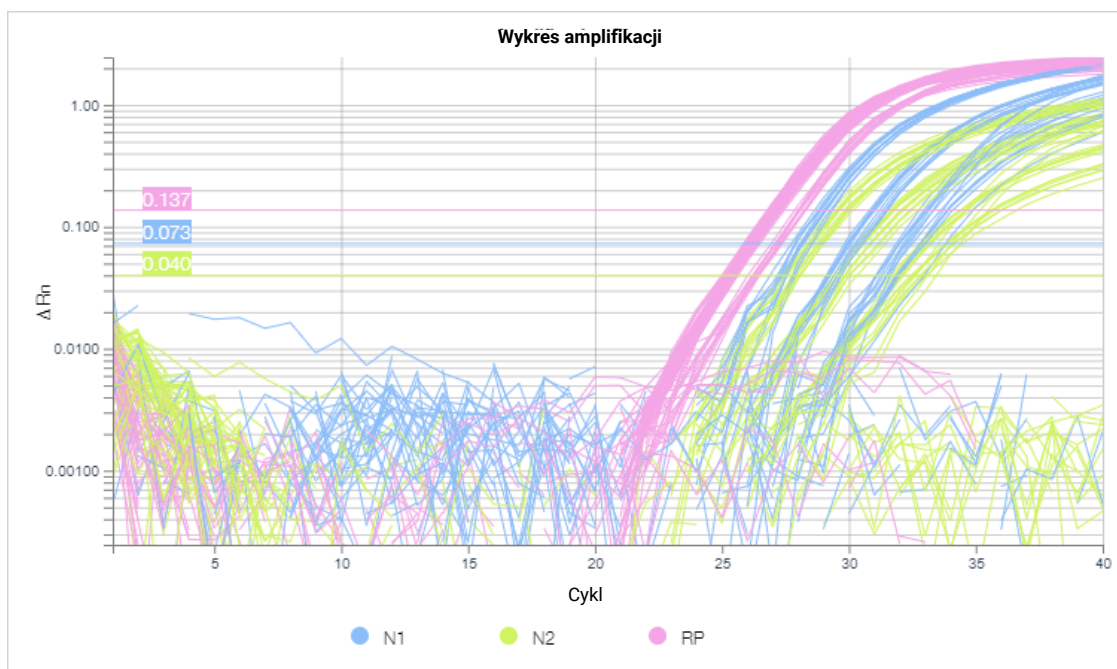
Y Value ☒ ΔRn ☐ Rn

Y Scale Log

Show ☒ Legend ☐ Cq Mark
☐ Unselected ☐ Tooltip
☐ Replicates of selected
☒ Threshold ☐ Baseline

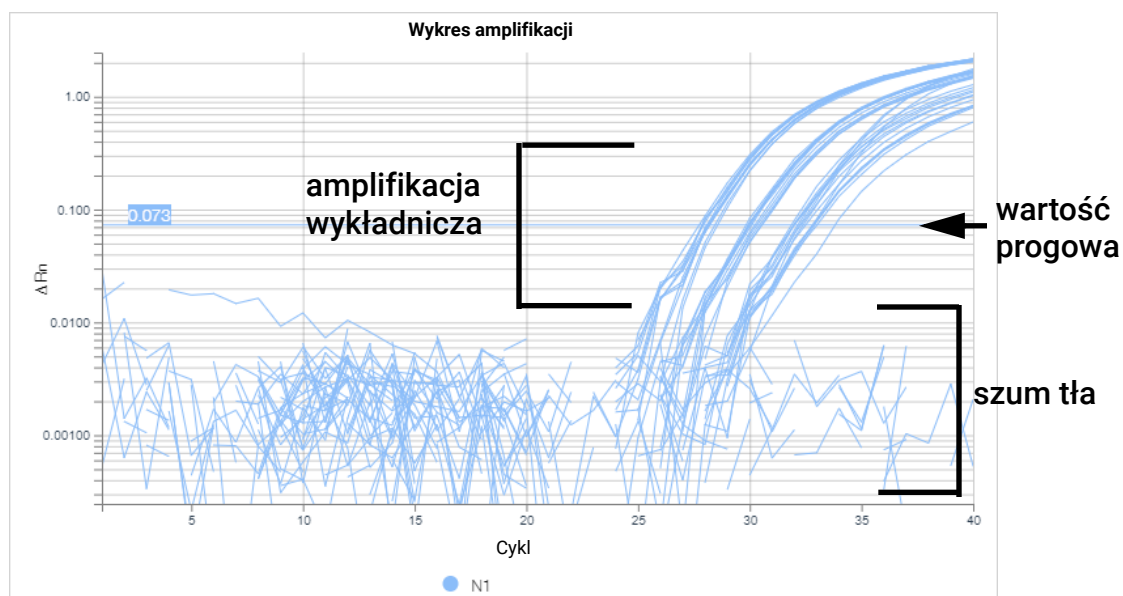
[Reset Setting](#)

Rycina 28 Ustawienia ogólne dla wykresu amplifikacji w oprogramowaniu Design & Analysis



Rycina 29 Wykresy amplifikacji oprogramowania Design & Analysis w skali logarytmicznej – wartości progowe elementów docelowych są wyświetlane w postaci poziomych linii

- 11 Oceń wzrokowo wykresy amplifikacji oraz domyślną wartość progową dla elementu docelowego N1.
 - a Rozwiń listę rozwijaną Targets po lewej stronie ekranu.
 - b Wybierz tylko element docelowy N1, a następnie zwiń listę rozwijaną.
 - c Określ, czy wartość progowa jest zarówno wystarczająco wysoka, by przekraczała szum tła, jak i wystarczająco niska, by uwzględnić wykresy w wykładniczej fazie amplifikacji (zob. **Rycina 30**). Na podstawie tych ustaleń kontynuuj zgodnie ze wskazówkami, które zawiera **Tabela 14**.
- 12 Powtórz **etap 11** dla elementu docelowego N2, a następnie dla elementu docelowego RP.
- 13 Po lewej stronie ekranu, pod opcją **Targets** kliknij opcję **Clear all**, aby usunąć filtrowanie według elementów docelowych.



Rycina 30 Wykresy amplifikacji oprogramowania Design & Analysis dla elementu docelowego N1

Tabela 14 Weryfikowanie optymalnego ustawienia wartości progowej w oprogramowaniu Design & Analysis

Pozycja wartości progowej	Opis	Działanie
Optymalna pozycja	Powyżej szumu tła i obejmująca wszystkie wykresy w wykładniczej fazie amplifikacji	Pozostaw bieżące wartości dla wartości progowych.
Zbyt wysoka	Niektóre wykresy w fazie wykładniczej amplifikacji nie przechodzą przez wartość progową	- Sprawdź, czy występują dołki z wyjątkowo dużym szumem tła. Takie odstające dołki mogą spowodować zbyt wysokie ustawienie wartości progowej przez oprogramowanie. - Wybierz odstający dołek na mapie płytki. - Kliknij przycisk z trzema kropkami na pasku narzędzi znajdującym się bezpośrednio nad mapą płytki. W wyświetlonym menu kliknij opcję Omit Wells. - Kliknij przycisk Analyze. Oprogramowanie obliczy ponownie wartość progową po wykluczeniu wartości odstającej. Można również przeciągnąć ręcznie na wykresie za pomocą myszy linię wartości progowej do nowej pozycji. - Wybierz wszystkie dołki na mapie płytki, aby wyświetlić wszystkie wykresy amplifikacji. Sprawdź, czy nowa wartość progowa znajduje się w optymalnej pozycji. - Ponownie kliknij przycisk z trzema kropkami. W otwartym menu kliknij opcję Unomit Wells, aby ponownie uwzględnić odstający dołek w analizie*. * Jeśli wykres amplifikacji dla odstającego dołka nie wykazuje amplifikacji wykładniczej w żadnym numerze cyklu, sprawdź, czy obniżona wartość progowa nie powoduje przypisania przez oprogramowanie do dołka wartości C_q (ze względu na sygnał tła przekraczający wartość progową). Jeśli tak jest, spróbuj zmodyfikować inne ustawienia analizy dla tego dołka, np. dostosować liczbę cykli Baseline Start i (lub) Baseline End.
Zbyt niska	Niektóre wykresy nie znajdują się powyżej szumu tła.	Zwiększ wartość progową do poziomu nieznacznie przekraczającego szum tła.

Etap 3. Sprawdzenie wyników w dołku NTC

14 W tabeli Well Table odszukaj reakcję z próbką kontrolną niezawierającą matrycy (NTC), znajdującą się w dołku A12.

15 Upewnij się, że w kolumnie C_q dla wszystkich trzech elementów docelowych widoczna jest informacja „Undetermined” lub wartość C_q > 37,00.

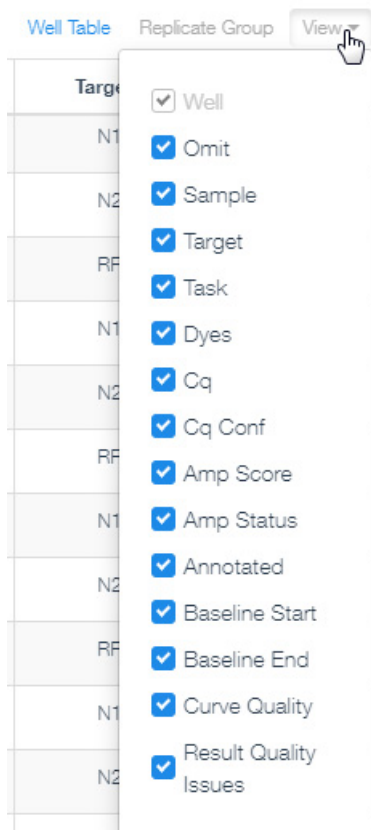
Jeśli wartość C_q dla reakcji NTC w przypadku któregoś elementu docelowego wynosi ≤ 37,00, mogło dojść do zanieczyszczenia próbki. Należy unieważnić serię i powtórzyć oznaczenie, ściśle stosując się do wytycznych.

Eksportowanie danych z tabeli dołków w oprogramowaniu Design & Analysis do pliku CSV

Etap 1. Dostosowanie kolumn uwzględnionych w tabeli dołków

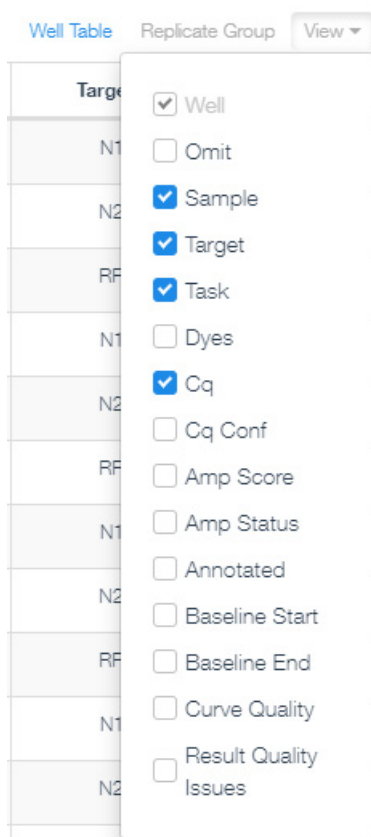
- 1 Kliknij opcję **View** na pasku narzędzi znajdującym się tuż nad tabelą Well Table.

Zostanie otwarte menu, które przedstawia **Rycina 31**, z listą wszystkich dostępnych kolumn tabeli.



Rycina 31 Menu wyświetlania dla tabeli dołków oprogramowania Design & Analysis — wybór domyślnych kolumn

- 2 Dostosuj ustawienia, tak aby do uwzględnienia były zaznaczone tylko kolumny Well, Sample, Target, Task i Cq. Zob. **Rycina 32**.



Zaznaczone kolumny:

Sample

Target

Task

Cq

Rycina 32 Menu wyświetlania dla tabeli dołków oprogramowania Design & Analysis – wybór niestandardowych kolumn

3 Kliknij opcję **View**, aby zwinąć menu.

Etap 2. Eksportowanie danych

4 Kliknij przycisk z trzema kropkami na pasku narzędzi znajdującym się bezpośrednio nad tabelą dołków. ...

5 W wyświetlonym menu kliknij opcję **Export**.

Zostanie otwarte okno dialogowe umożliwiające zapisanie pliku CSV.

6 Wybierz folder dla pliku.

7 W polu File name wpisz nazwę pliku.

8 Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a program wyeksportuje dane do pliku z rozszerzeniem CSV i zapisze go we wskazanym folderze.

9 Otwórz plik i przeanalizuj dane Cq dla każdej z próbek badanych i kontrolnych w celu interpretacji wyników. Zob. [Rozdział 6](#), „Analiza i wyniki”

Wykonywanie reakcji qRT-PCR w systemie Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

W tej części opisano procedurę wykonywania reakcji qRT-PCR w systemie Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

Uruchomienie programu reakcji qRT-PCR w systemie CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

- 1 Sprawdź, czy zasilanie urządzenia CFX96 Touch jest włączone.
- 2 Z poziomu komputera połączanego z urządzeniem otwórz doświadczenie, które zostało wcześniej utworzone w oprogramowaniu CFX Maestro.
- 3 Przejdź do karty Start Run na ekranie Run Setup.
Jeśli urządzenie jest włączone, lecz nie jest widoczne pod opcją **Block Name**, kliknij opcję **Detect Instrument(s)** w lewym górnym rogu ekranu.
- 4 Wybierz z tabeli urządzenie, które zostanie wykorzystane do przeprowadzenia doświadczenia.
- 5 Kliknij opcję **Open Lid**.
Pokrywa urządzenia zostanie otwarta.
- 6 Umieść płytkę reakcyjną na bloku termicznym urządzenia.
- 7 Z poziomu komputera kliknij opcję **Close Lid**.
Pokrywa urządzenia zostanie zamknięta.
- 8 Kliknij opcję **Start Run**.
- 9 Zapisz plik serii oznaczenia w pożądanym folderze. Wprowadź nazwę pliku i kliknij opcję **Save**.
Urządzenie rozpocznie prowadzenie doświadczenia.

Przypisanie ustawień analizy danych dla systemu CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

Etap 1. Wyświetlenie wykresów amplifikacji dla wszystkich elementów docelowych we wszystkich dołkach

- 1 Po zakończeniu serii oznaczenia otwórz doświadczenie w aplikacji CFX Maestro.
Doświadczenie zostanie otwarte w oknie Data Analysis.
- 2 U góry okna kliknij kartę Quantification, jeśli nie została jeszcze wybrana.
W oknie wyświetlane są wykresy amplifikacji, tabela wyników w każdym dołku oraz schemat mapy płytki.

3 Zastosuj funkcję Fluorescence Drift Correction.

- U góry okna Data Analysis kliknij kolejno opcje **Settings > Baseline Settings > Apply Fluorescence Drift Correction**.

Oprogramowanie automatycznie skoryguje każdy dryf sygnału fluorescencji, który może występować w zakresie cykli linii bazowej.

4 Sprawdź wykresy amplifikacji z wczesną amplifikacją (tj. przed cyklem 9). Wyklucz z analizy wszystkie próbki badane z wczesną amplifikacją i oznacz je ponownie z wykorzystaniem mniejszego stężenia.

W próbkach badanych z nietypowo dużymi stężeniami wirusowego RNA amplifikacja wirusowych elementów docelowych może osiągnąć wykrywalne poziomy przy bardzo wczesnym numerze cyklu (< 9). W ramach obliczeń korekty z użyciem linii bazowej oprogramowanie może interpretować takie wczesne sygnały amplifikacji jako szum tła i nie przypisać w takich próbkach wartości C_q do elementów docelowych wirusa.

Należy prowadzić obserwację pod kątem obecności takich próbek badanych, wyświetlając wykresy amplifikacji bez korekty z zastosowaniem linii bazowej (dla opcji **Baseline Setting** wybierz ustawienie **No Baseline Subtraction**). Jeśli któraś z badanych próbek wykazuje cechy amplifikacji przed 9. cyklem, należy usunąć te dołki z analizy z poziomu okna Plate Editor. Następnie należy ponownie przeprowadzić reakcję qRT-PCR dla takiej próbki po rozcieńczeniu kwasu nukleinowego w stosunku 1:100 z użyciem odpowiedniego buforu do elucji.

Etap 2. Ocena wartości progowych

5 Sprawdź wybory dokonane po wybraniu opcji **Settings > Baseline Setting**, aby upewnić się, że wybrano ustawienie **Baseline Subtracted Curve Fit**.

6 Kliknij prawym przyciskiem myszy na wykresie Amplification i wybierz opcję **Show Threshold Values** (jeśli nie została jeszcze zaznaczona).

Linia wartości progowej dla każdego elementu docelowego jest wyświetlana w postaci poziomej linii.

7 Zaznacz pole wyboru Log w pobliżu prawego dolnego rogu wykresu Amplification.

Wyświetlanie wykresów amplifikacji w wartościach logarytmicznych zapewnia lepszy obraz szumu tła sygnału.

8 Ustaw minimalną wartość dla osi Y na 0,0.

- a Kliknij ikonę Chart Settings po prawej stronie wykresu Amplification. 

Zostanie otwarte okno dialogowe Chart Settings.

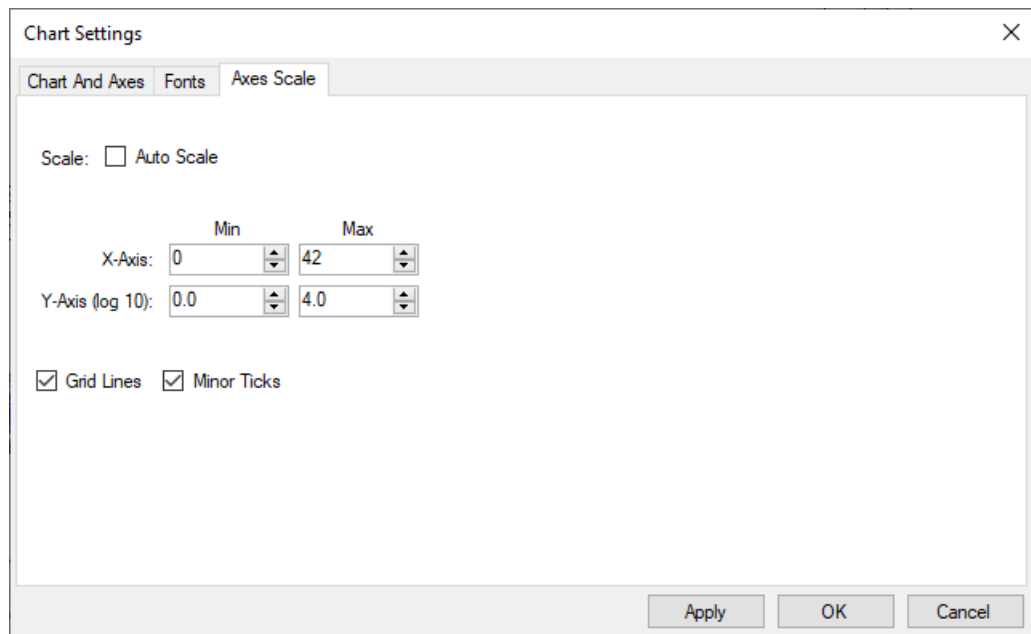
- b Kliknij kartę Axes Scale.

- c Usuń zaznaczenie pola wyboru Auto Scale.

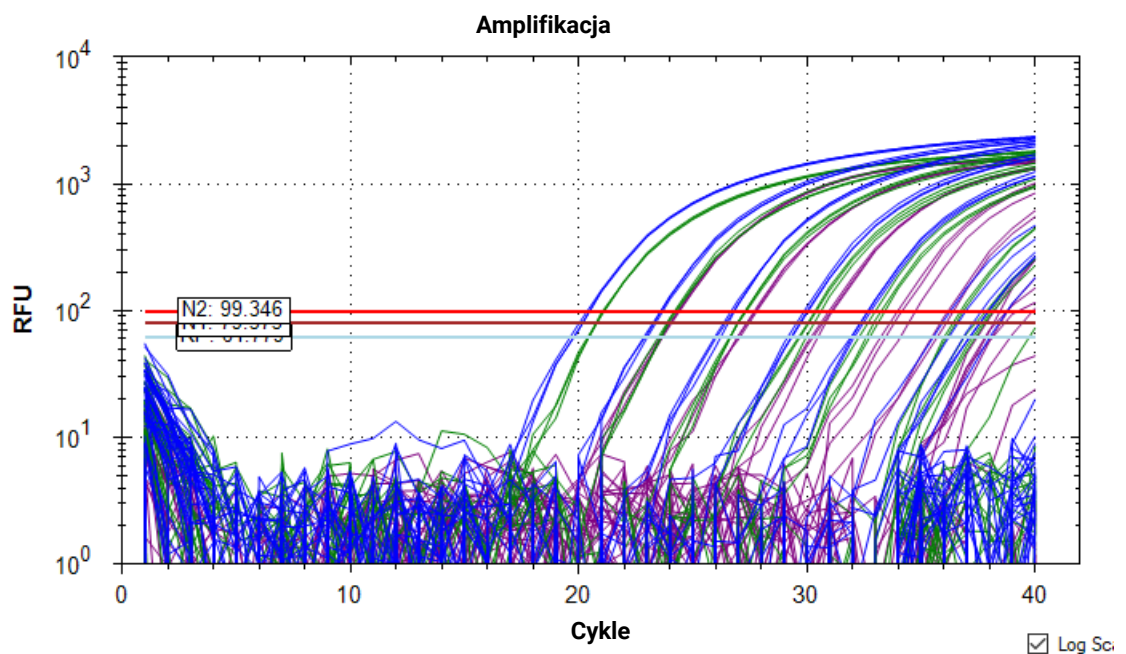
- d W kolumnie **Min** dla opcji **Y-Axis (log 10)** wpisz **0.0** (zob. **Rycina 33**).

- e Kliknij przycisk **OK**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a skala osi Y będzie rozpoczynała się od wartości 0,0, co umożliwi wyświetlenie szumu sygnału na wykresach. Przykład przedstawia **Rycina 34**.



Rycina 33 Okno dialogowe ustawień wykresu oprogramowania Maestro – karta skali osi

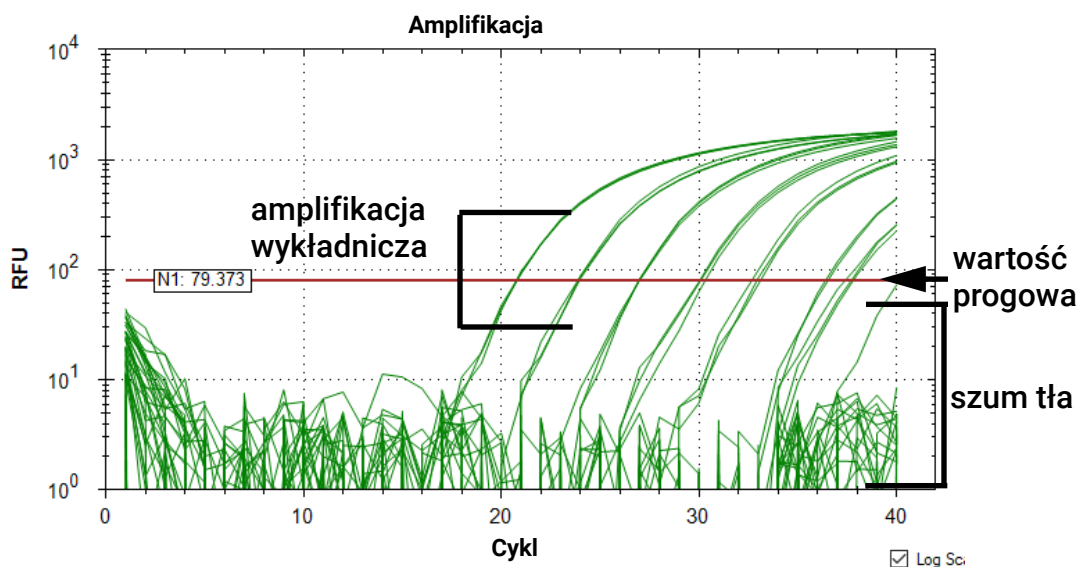


Rycina 34 Wykres amplifikacji oprogramowania Maestro w skali logarytmicznej – wartości progowe elementów docelowych są wyświetlane w postaci poziomych linii

- 9 Oceń wzrokowo wykresy amplifikacji oraz domyślną wartość progową dla elementu docelowego N1.
 - a Skorzystaj z pól wyboru poniżej wykresu Amplification w celu zaznaczenia do wyświetlania wyłącznie elementu docelowego FAM (N1).

- b Określ, czy wartość progowa jest zarówno wystarczająco wysoka, by przekraczała szum tła, jak i wystarczająco niska, by uwzględnić wykresy w wykładniczej fazie amplifikacji (zob. **Rycina 35**). Na podstawie tych ustaleń kontynuuj zgodnie ze wskazówkami, które zawiera **Tabela 15**.

10 Powtórz **etap 11** dla elementu docelowego N2, a następnie dla elementu docelowego RP.



Rycina 35 Wykres amplifikacji oprogramowania Maestro dla elementu docelowego N1

Tabela 15 Weryfikowanie optymalnego ustawienia wartości progowej w oprogramowaniu Design & Analysis

Pozycja wartości progowej	Opis	Działanie
Optymalna pozycja	Powyżej szumu tła i obejmująca wszystkie wykresy w wykładniczej fazie amplifikacji	Pozostaw bieżące wartości dla wartości progowych.
Zbyt wysoka	Niektóre wykresy w fazie wykładniczej amplifikacji nie przechodzą przez wartość progową	- Sprawdź, czy występują dołki z wyjątkowo dużym szumem tła. Takie odstające dołki mogą spowodować zbyt wysokie ustawienie wartości progowej przez oprogramowanie. - Kliknij kolejno opcje Plate Setup > View/Edit Plate, aby otworzyć edytor płytki. - Wybierz odstający dołek na mapie płytki. - W panelu po prawej stronie edytora płytki zaznacz pole wyboru oznaczone jako Exclude Wells in Analysis (znajdujące się u dołu panelu). - Kliknij przycisk OK. Po wyświetleniu zapytania, czy zmiany mają zostać zastosowane, kliknij opcję Yes. Oprogramowanie obliczy ponownie wartość progową po wykluczeniu odstającego dołka. Można również przeciągnąć ręcznie na wykresie za pomocą myszy linię wartości progowej do nowej pozycji. - Kliknij ikonę Baseline Threshold po prawej stronie wykresu Amplification w celu otwarcia okna dialogowego Baseline Threshold. - W przypadku opcji Single Threshold zmień ustawienie z Auto Calculated na User Defined. (Zapobiegnie to ponownemu przeliczeniu wartości progowej przez oprogramowanie po ponownym uwzględnieniu odstającego dołka). Kliknij przycisk OK, aby zamknąć okno dialogowe. - Kliknij kolejno opcje Plate Setup > View/Edit Plate, aby ponownie otworzyć edytor płytki. Wybierz odstający dołek i usuń zaznaczenie pola wyboru Exclude Wells in Analysis. Kliknij przycisk OK, a następnie Yes. - Na mapie płytki pod wykresem Amplification zaznacz wszystkie dołki w celu ponownego uwzględnienia w analizie odstającego dołka. * Jeśli wykres amplifikacji dla odstającego dołka nie wykazuje amplifikacji wykładniczej w żadnym numerze cyklu, sprawdź, czy obniżona wartość progowa nie powoduje przypisania przez oprogramowanie do dołka wartości C_q (ze względu na sygnał tła przekraczający wartość progową). Jeśli tak jest, spróbuj zmodyfikować inne ustawienia analizy dla tego dołka, np. dostosować liczbę cykli Baseline Begin i (lub) Baseline End.
Zbyt niska	Niektóre wykresy nie znajdują się powyżej szumu tła.	Zwiększ wartość progową do poziomu nieznacznie przekraczającego szum tła.

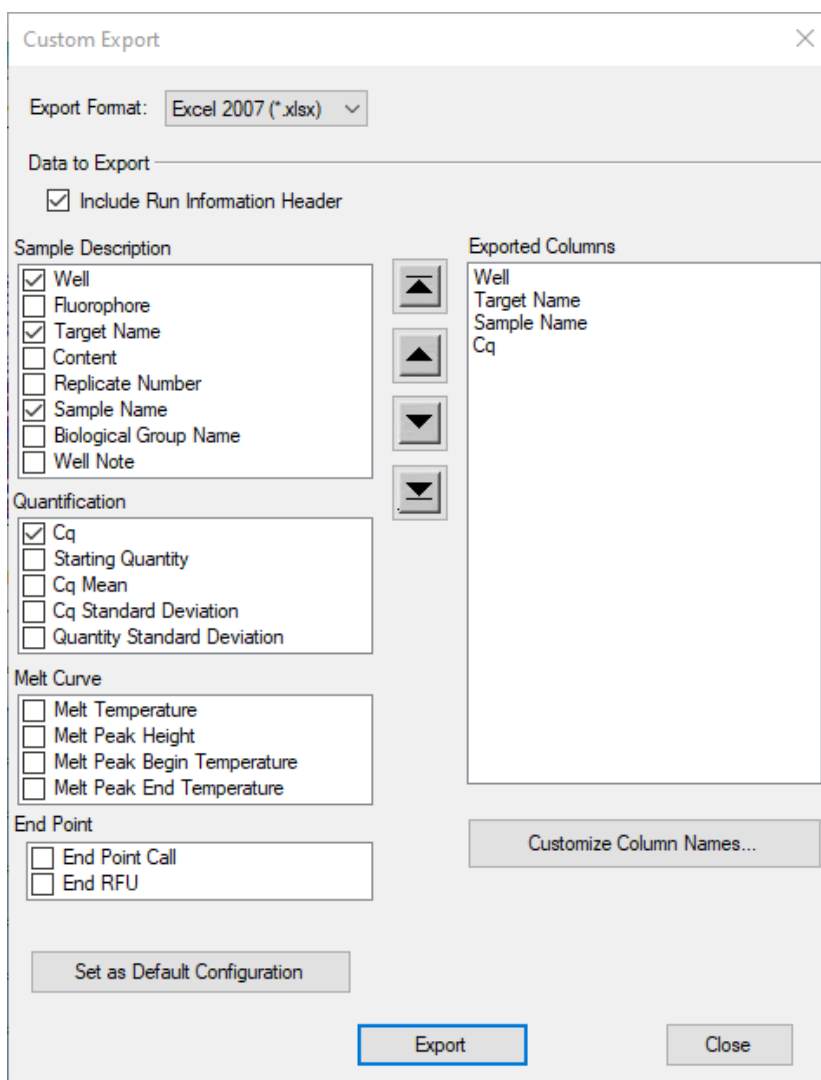
Etap 3. Sprawdzenie wyników w dołku NTC

- 11 W tabeli wyświetlającej wyniki odszukaj reakcję z próbką kontrolną niezawierającą matrycy (NTC), znajdującą się w dołku A12.
- 12 Upewnij się, że w kolumnie C_q dla wszystkich trzech elementów docelowych widoczna jest informacja „N/A” lub wartość C_q > 37,00.

Jeśli wartość C_q dla reakcji NTC w przypadku któregoś elementu docelowego wynosi ≤ 37,00, mogło dojść do zanieczyszczenia próbki. Należy unieważnić serię i powtórzyć oznaczenie, ściśle stosując się do wytycznych.

Eksportowanie danych z oprogramowania CFX Maestro

- 1 W górnej części okna Data Analysis kliknij kolejno opcje **Export > Custom Export**.
Zostanie wyświetlone okno dialogowe Custom Export.
- 2 W polu Export Format wybierz rodzaj pliku dla eksportowanych danych, np. **Excel 2007 (*.xlsx)**.
Upewnij się, że na komputerze znajduje się odpowiednie oprogramowanie do otwarcia wybranego rodzaju pliku.
- 3 W oknie dialogowym zaznacz pola wyboru, które przedstawia **Rycina 36**. Przejrzyj sekcję Exported Columns, aby upewnić się, że znajdują się w niej kolumny o nazwie **Well**, **Target Name**, **Sample Name** i **Cq**.



Rycina 36 Ustawienia niestandardowego eksportu danych dla aplikacji CFX Maestro

4 Kliknij przycisk **Export**.

Zostanie otwarte okno dialogowe Save As.

5 Wybierz folder dla pliku.

6 W polu File name wpisz nazwę pliku lub skorzystaj z nazwy domyślnej.

7 Kliknij opcję **Save**.

Okno dialogowe zostanie zamknięte, a program wyeksportuje dane do pliku o wybranym rodzaju i zapisze go we wskazanym folderze.

8 Otwórz plik i przeanalizuj dane Cq dla każdej z próbek badanych i kontrolnych w celu interpretacji wyników. Zob. [Rozdział 6](#), „Analiza i wyniki”

6 Analiza i wyniki

Interpretacja wyników 69

W niniejszym rozdziale zamieszczono informacje na temat interpretowania wyników oznaczenia na podstawie danych qRT-PCR.

Interpretacja wyników

Wyniki i interpretacja w przypadku próbek kontrolnych

Jeśli żadna z próbek kontrolnych nie wykazuje oczekiwanego działania, którego opis zawiera **Tabela 16**, oznaczenie mogło zostać nieprawidłowo skonfigurowane lub wykonane, lub też mogło dojść do nieprawidłowego działania odczynnika lub sprzętu. W takim przypadku serię należy unieważnić i powtórzyć oznaczenie.

Próbka kontrolna niezawierająca matrycy (ang. No Template Control, NTC)

Próbka NTC to woda niezawierająca nukleazy wykorzystana zamiast RNA w reakcji qRT-PCR. Reakcja NTC nie powinna wykazywać krzywych przyrostu fluorescencji, które przecinają się z linią wartości progowej 37,00 cyklu dla któregośkolwiek z trzech elementów docelowych. Jeśli reakcja NTC wykazuje krzywą przyrostu z wartością Cq wynoszącą $\leq 37,00$, mogło dojść do zanieczyszczenia próbki. Należy unieważnić serię i powtórzyć oznaczenie, ściśle stosując się do wytycznych.

Kontrola dodatnia SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx

Reakcja qRT-PCR dla kontroli dodatniej SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx da wynik dodatni dla elementów docelowych 2019-nCoV_N1 i 2019-nCoV_N2 z wartością Cq nieprzekraczającą 37,00 oraz wynik ujemny (zgłaszany jako niewykrycie Cq lub wartość Cq $> 37,00$) dla genu ludzkiej RNazy P.

Próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (HSC)

Próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (HSC) zawiera niezakaźne komórki ludzkie i jest wykorzystywana jako kontrola procedury ekstrakcji RNA w celu wykazania pomyślnej ekstrakcji RNA i integralności odczynników do ekstrakcji. Reakcja qRT-PCR z użyciem RNA wyizolowanego z próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka powinna dać wynik dodatni dla elementu docelowego RP z wartością Cq nieprzekraczającą 37,00. Elementy docelowe N1 i N2 wirusa SARS-CoV-2 powinny dać wyniki ujemne (zgłaszane jako niewykrycie Cq lub wartość Cq $> 37,00$).

Tabela 16 Oczekiwane działanie próbek kontrolnych

Rodzaj próbki kontrolnej	Nazwa próbki kontrolnej	Wykorzystywana do monitorowania	Wynik dla elementu docelowego N1	Wynik dla elementu docelowego N2	Wynik dla elementu docelowego RP
Kontrola dodatnia	Kontrola dodatnia SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Istotny problem z odczynnikami, w tym z integralnością starterów i sondy	Dodatni (Cq $\leq 37,00$)	Dodatni (Cq $\leq 37,00$)	Ujemny (niewykrycie Cq lub Cq $> 37,00$)
Kontrola ujemna	NTC	Zanieczyszczenie odczynnika i (lub) środowiska	Ujemny (niewykrycie Cq lub Cq $> 37,00$)	Ujemny (niewykrycie Cq lub Cq $> 37,00$)	Ujemny (niewykrycie Cq lub Cq $> 37,00$)
Ekstrakcja	Próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (HSC)	Niepowodzenie procedury lizy i ekstrakcji, możliwe zanieczyszczenie podczas ekstrakcji	Ujemny (niewykrycie Cq lub Cq $> 37,00$)	Ujemny (niewykrycie Cq lub Cq $> 37,00$)	Dodatni (Cq $\leq 37,00$)

Wyniki i interpretacja w przypadku próbek klinicznych

Tabela 17 zawiera listę oczekiwanych wyników oznaczenia. Jeśli laboratorium uzyska nieoczekiwane wyniki dla próbek kontrolnych oznaczenia lub uzyska niejednoznaczne bądź nieprawidłowe wyniki, które się powtarzają po ponownym oznaczeniu, należy się skonsultować z CDC i uzyskać opinię na temat próbek.

Element docelowy w postaci genu ludzkiej RNazy P (RP)

Wszystkie próbki kliniczne powinny wykazywać krzywe przyrostu fluorescencji dla elementu docelowego RP, które przecinają linię wartości progowej w ciągu 37,00 cyklu ($C_q \leq 37,00$), co wskazuje na obecność genu ludzkiej RNazy P. Niewykrycie elementu docelowego RP w żadnej z próbek klinicznych może wskazywać na:

- nieprawidłową ekstrakcję kwasu nukleinowego z materiału klinicznego, skutkującą utratą i (lub) degradacją RNA, bądź przeniesienie substancji hamujących;
- brak wystarczającej ilości ludzkiego materiału komórkowego z powodu niewłaściwego pobrania lub utraty integralności próbki;
- nieprawidłowe skonfigurowanie i wykonanie oznaczenia;
- nieprawidłowe działanie odczynników lub sprzętu.

Interpretacja w przypadku nieuzyskania dodatniego wyniku dla elementu docelowego RP w próbkach klinicznych pobranych od ludzi jest następująca:

- Jeśli wyniki dla elementów docelowych N1 i N2 są dodatnie ($C_q \leq 37,00$), nawet w przypadku braku dodatniego wyniku dla elementu docelowego RP, wynik należy uznać za ważny. Możliwe jest, że w przypadku niektórych próbek nie uda się wykazać krzywych przyrostu dla genu RNazy P ze względu na małą liczbę komórek w oryginalnej próbce klinicznej lub z powodu zmniejszenia wydajności amplifikacji elementu docelowego RP przez elementy docelowe wirusa, zwłaszcza w przypadku próbek z wysoką wiremią. Ujemny sygnał dla elementu docelowego RP nie wyklucza występowania RNA wirusa SARS-CoV-2 w próbce klinicznej.
- Jeśli wynik dla elementu docelowego RP jest ujemny (niewykrycie C_q lub wartość $C_q > 37,00$) i jeśli dla jednego lub obu elementów docelowych N1 oraz N2 uzyskano wynik ujemny (niewykrycie C_q lub wartość $C_q > 37,00$), wynik próbki należy uznać za nieważny. Jeśli dostępna jest pozostałość takiej próbki, należy ponownie przeprowadzić procedurę ekstrakcji i powtórzyć test. Jeśli dla wszystkich elementów docelowych ponownie zostanie uzyskany wynik ujemny, wyniki należy zgłosić jako nieważne i w miarę możliwości pobrać nową próbkę.

Elementy docelowe 2019-nCoV_N1 i 2019-nCoV_N2

- Gdy wszystkie próbki kontrolne zachowują się w oczekiwany sposób, próbkę uznaje się za **dodatnią** w kierunku wirusa SARS-CoV-2 po spełnieniu poniższego warunku.
 - Krzywe przyrostu dla obu elementów docelowych N1 oraz N2 przecinają linię wartości granicznej w ciągu 37,00 cyklu ($C_q \leq 37,00$). Wynik dla elementu docelowego RP nie musi być dodatni (zob. opis powyżej), aby wynik dla wirusa SARS-CoV-2 był nadal ważny.
- Gdy wszystkie próbki kontrolne zachowują się w oczekiwany sposób, próbkę uznaje się za **ujemną** w kierunku wirusa SARS-CoV-2 po spełnieniu OBYDWU poniższych warunków.
 - Krzywe przyrostu dla elementów docelowych N1 oraz N2 NIE przecinają linii wartości granicznej w ciągu 37,00 cyklu (niewykrycie C_q lub $C_q > 37,00$).
 - Krzywa przyrostu dla elementu docelowego RP PRZECINA linię wartości granicznej w ciągu 37,00 cyklu ($C_q \leq 37,00$).

- Gdy wszystkie próbki kontrolne zachowują się w oczekiwany sposób, próbkę uznaje się za **niejednoznaczną** pod kątem obecności wirusa SARS-CoV-2 po spełnieniu CO NAJMNIEJ JEDNEGO z poniższych warunków.
- Krzywa przyrostu dla jednego z elementów docelowych wirusa 2019-nCoV przecina linię wartości progowej w ciągu 37,00 cyklu ($C_q \leq 37,00$), podczas gdy krzywa wzrostu dla drugiego elementu docelowego wirusa 2019-nCoV nie przecina linii wartości progowej w ciągu 37,00 cyklu (niewykrycie C_q lub $C_q > 37,00$). Krzywa przyrostu dla elementu docelowego RP przecina linię wartości granicznej w ciągu 37,00 cyklu ($C_q \leq 37,00$).

W przypadku próbek niejednoznacznych należy ponownie przebadać RNA wyizolowany z próbki. Jeśli nie są dostępne pozostałości RNA, należy ponownie wyizolować RNA z pozostałej próbki i przebadać go ponownie. W przypadku uzyskania takiego samego wyniku należy zgłosić wynik niejednoznaczny.

- Jeśli próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (HSC) daje wynik dodatni dla N1 lub N2 ($C_q \leq 37,00$), mogło dojść do zanieczyszczenia podczas ekstrakcji lub obchodzenia się z próbką. Należy unieważnić wszystkie wyniki dla próbek poddawanych ekstrakcji wraz z próbką kontrolną zawierającą materiał pochodzący od człowieka (HSC). Przeprowadzić ponowną ekstrakcję próbek oraz próbki kontrolnej zawierającej materiał pochodzący od człowieka (HSC) i ponownie wykonać oznaczenie.

Tabela 17 Oczekiwane wyniki oznaczenia qRT-PCR w kierunku wirusa SARS-CoV-2

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Gen ludzkiej RNazy P	Interpretacja wyniku*	Zgłaszany wynik	Działania
Dodatni ($C_q \leq 37,00$)	Dodatni ($C_q \leq 37,00$)	Dodatni LUB ujemny	Wykryto wirusa SARS-CoV-2	Dodatni wynik badania w kierunku wirusa SARS-CoV-2	Przekazać wyniki CDC oraz osobie zlecającej test
Ujemny (niewykrycie C_q lub $C_q > 37,00$)	Ujemny (niewykrycie C_q lub $C_q > 37,00$)	Dodatni ($C_q \leq 37,00$)	Nie wykryto wirusa SARS-CoV-2	Nie wykryto	Przekazać wyniki osobie zlecającej test Rozważyć wykonanie badań w kierunku innych wirusów układu oddechowego [†] .
Dodatni ($C_q \leq 37,00$)	Ujemny (niewykrycie C_q lub $C_q > 37,00$)	Dodatni ($C_q \leq 37,00$)	Wynik niejednoznaczny	Niejednoznaczny	Powtórzyć oznaczenie wyizolowanej próbki i (lub) powtórzyć ekstrakcję oraz reakcję qRT-PCR.
Ujemny (niewykrycie C_q lub $C_q > 37,00$)	Dodatni ($C_q \leq 37,00$)	Dodatni ($C_q \leq 37,00$)	Wynik niejednoznaczny	Niejednoznaczny	Powtórzyć oznaczenie wyizolowanej próbki i (lub) powtórzyć ekstrakcję oraz reakcję qRT-PCR.
Jeśli wynik dla jednego lub obu elementów docelowych wirusa 2019-nCoV jest ujemny (niewykrycie C_q lub $C_q > 37,00$)		Ujemny (niewykrycie C_q lub $C_q > 37,00$)	Wynik nieważny	Nieważny	Powtórzyć ekstrakcję oraz reakcję qRT-PCR. Jeśli wynik powtórnego oznaczenia nadal jest nieważny, rozważyć pobranie nowej próbki od pacjenta.

* Laboratoria powinny zgłaszać wyniki swoich badań diagnostycznych zgodnie z obowiązującym w nich systemem zgłaszania.

[†] Nie ustalono optymalnych rodzajów próbek ani czasu występowania szczytowych ilości wirusa w trakcie zakażenia wywołanego przez wirusa 2019-nCoV. Do wykrycia wirusa może być konieczne pobranie kilku próbek od tego samego pacjenta. Możliwość uzyskania fałszywie ujemnego wyniku powinna być szczególnie brana pod uwagę, jeśli ostatnie narażenie lub obraz kliniczny pacjenta sugeruje zakażenie wirusem 2019-nCoV i jeśli testy diagnostyczne w kierunku innych przyczyn choroby (np. innej choroby układu oddechowego) dały wynik ujemny. Jeśli nadal podejrzewane jest zakażenie wirusem 2019-nCoV, należy rozważyć ponowne wykonanie testu po konsultacji z organami ds. zdrowia publicznego.

7 Kontrola jakości

Kontrola jakości **73**

W niniejszym rozdziale zamieszczono informacje na temat metod kontroli jakości w przypadku oznaczenia.

Kontrola jakości

- Wymagania dotyczące kontroli jakości muszą zostać spełnione zgodnie z lokalnymi, stanowymi i federalnymi przepisami lub wymaganiami akredytacyjnymi oraz standardowymi procedurami kontroli jakości stosowanymi w laboratorium użytkownika.
- Procedury kontroli jakości mają na celu monitorowanie wydajności odczynników i oznaczenia.
- Należy przetestować wszystkie kontrole dodatnie przed oznaczeniem próbek diagnostycznych z każdej nowej serii zestawu, aby potwierdzić, czy wszystkie odczynniki i elementy zestawu działają prawidłowo.
- Dobra praktyka laboratoryjna (cGLP) zaleca włączenie dodatknej kontroli ekstrakcji do każdej partii izolacji kwasów nukleinowych.
- Próbką kontrolną zawierającą materiał pochodzący od człowieka **musi** być przetwarzana w trakcie ekstrakcji kwasów nukleinowych w każdej partii próbek przeznaczonych do oznaczenia.
- Podczas każdej serii amplifikacji i detekcji należy **zawsze** uwzględniać próbkę kontrolną niezawierającą matrycy (ang. No Template Control, NTC) oraz dodatnią próbę kontrolną SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control.
- Zestaw sond/starterów dla genu ludzkiej RNazy P (uwzględniony w mieszaninie 10x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix) pozwala na kontrolę jakości próbki i ekstrakcji.

8 Ograniczenia oznaczenia

Ograniczenia **75**

W niniejszym rozdziale opisano ograniczenia oznaczenia wykonywanego z użyciem zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent

Ograniczenia

- 1 Korzystanie z tego oznaczenia jest ograniczone do personelu, który został przeszkolony w zakresie tej procedury. Nieprzestrzeganie tych instrukcji może skutkować błędnymi wynikami.
- 2 Wiarygodne wyniki zależą od odpowiedniego pobrania, transportu, przechowywania i przetwarzania próbek.
- 3 Należy unikać zanieczyszczenia, przestrzegając dobrych praktyk laboratoryjnych oraz procedur określonych w niniejszej instrukcji użycia.
- 4 Ujemne wyniki nie wykluczają zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie powinny być wykorzystywane jako jedyna podstawa do podejmowania decyzji dotyczących leczenia pacjenta.
- 5 Wynik dodatni wskazuje na wykrycie kwasu nukleinowego z odpowiedniego wirusa. Kwas nukleinowy może się utrzymywać w organizmie nawet po utracie żywotności przez wirusa.
- 6 Wydajność oznaczenia z zastosowaniem zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent określono, wykorzystując próbki wymazu z jamy nosowo-gardłowej pobrane na podłoże transportowe UTM lub VCM. Probki wymazów z jamy ustno-gardłowej, nosa oraz ze środkowej części małżowiny nosowej to akceptowalne rodzaje próbek do stosowania wraz z oznaczeniem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent, jednak wydajność w ich przypadku nie została ustalona. Badanie wymazów z jamy ustno-gardłowej, nosa i ze środkowej części małżowiny nosowej (pobieranych samodzielnie pod nadzorem lub przez pracownika służby zdrowia) jest ograniczone do pacjentów z objawami COVID-19.
- 7 Zestaw SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent nie zawiera próbki do wykorzystania jako próbka kontrolna zawierająca materiał pochodzący od człowieka (ang. Human Specimen Control, HSC). Próbka używana jako kontrolna musi zostać zweryfikowana przez laboratorium.

9 Charakterystyka działania

Charakterystyka działania 77

W niniejszym rozdziale zamieszczono informacje na temat charakterystyki działania zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent.

Charakterystyka działania

Poniżej przedstawiono dane dotyczące charakterystyki działania zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent. We wszystkich procedurach ekstrakcji wykorzystano objętości wejściowe próbek oraz objętości elucji zalecane w części „**Ekstrakcja kwasów nukleinowych**” na **strona 19**.

Czułość analityczna (granica wykrywalności)

Firma Agilent przeprowadziła badanie granicy wykrywalności (ang. Limit of Detection, LoD) w celu ustalenia najmniejszego stężenia wirusa SARS-CoV-2 (wyrażonego jako liczba kopii genomu wirusa), które może zostać wykryte za pomocą zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent co najmniej w 95% przypadków z wykorzystaniem każdej z obsługiwanych procedur ekstrakcji kwasu nukleinowego na każdym z trzech obsługiwanych systemów do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Panele próbek do badania LoD zostały stworzone przez rozcieńczenie dostępnego w handlu, ocenionego ilościowo wzorca SARS-CoV-2 połączonymi ujemnymi próbkami klinicznymi (matrycą ujemną) w celu uzyskania serii pożądanych stężeń docelowych wirusa SARS-CoV-2. Wszystkie próbki kliniczne były wymazami z jamy nosowo-gardłowej uprzednio przebadanymi w kierunku obecności wirusa SARS-CoV-2 przez dostawcę przy użyciu oznaczenia SARS-CoV-2 z autoryzacją do użytku w sytuacjach awaryjnych, potwierdzonymi następnie przez firmę Agilent.

We wstępnym doświadczeniu LoD wykorzystano różne stężenia wirusa z trzema powtórzeniami dla każdego stężenia. Zakres stężeń badanych w doświadczeniu wstępnym obejmował stężenia od 0,75 do 3 kopii/ μ l. Wyniki doświadczenia wstępnego wskazały, że ostateczna wartość LoD będzie się prawdopodobnie mieścić w tym zakresie i różnić w zależności od metody ekstrakcji oraz systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Ostateczne doświadczenie potwierdzające LoD całego oznaczenia zostało przeprowadzone na trzech docelowych poziomach wejściowych: 0,75, 1 i 1,5 kopii/ μ l. Na każdym z trzech docelowych poziomów wejściowych przetestowano 20 poszczególnych powtórzeń ekstrakcji we wszystkich możliwych kombinacjach metody ekstrakcji i systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 18 przedstawia odsetki przypadków pozytywnego wykrycia z tego doświadczenia.

Wskaźnik wykrywalności 20/20 oznacza, że wszystkie 20 powtórzeń ekstrakcji było wykrywalnych przy danej kombinacji metody ekstrakcji i systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 18 Potwierdzenie ostatecznej granicy wykrywalności – odsetki przypadków pozytywnego wykrycia* dla każdej metody ekstrakcji kwasu nukleinowego w każdym systemie do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Agilent AriaMx, ABI 7500 i Bio-Rad CFX96)

Docelowe stężenie wejściowe wirusa SARS-CoV-2 przed ekstrakcją (kopie/ μ l)	Zestaw QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit z systemem QIAAsymphony (ekstrakcja zautomatyzowana)			Zestaw MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit z systemem KingFisher Flex (ekstrakcja zautomatyzowana)		
	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
1,5	19/19 (1)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1	1/10 (10)	20/20	17/18 (2)	19/19 (1)	18/19 (1)	18/18 (2)
0,75	3/13 (7)	15/16 (4)	18/18 (2)	15/16 (4)	19/19 (1)	16/16 (4)

* Wskaźniki wykrywalności są wyrażone jako liczba powtórzeń z dodatnim wynikiem z całkowitej liczby powtórzeń z wynikiem dodatnim i ujemnym. Liczby w nawiasach, jeśli są podane, wskazują liczbę nierozstrzygających powtórzeń. W tych przypadkach całkowita liczba powtórzeń z wynikami dodatnimi i ujemnymi jest mniejsza niż 20.

Tabela 19 podsumowuje ostateczne wartości LoD dla każdej kombinacji metody ekstrakcji i systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Wartości te przedstawiają liczbę kopii wirusa na μ l wyizolowanego kwasu nukleinowego, które mogą zostać wykryte za pomocą zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent w co najmniej 95% przypadków.

Tabela 19 Podsumowanie ostatecznej granicy wykrywalności – LoD dla każdej metody ekstrakcji kwasu nukleinowego w każdym systemie do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Agilent AriaMx, ABI 7500 i Bio-Rad CFX96)

Metoda ekstrakcji kwasu nukleinowego	Limit wykrywalności całego oznaczenia (kopie/ μ l)		
	AriaMx	7500	CFX96
Zestaw QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit z systemem QIAAsymphony (ekstrakcja zautomatyzowana)	1,5	1	1,5
Zestaw MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit z systemem KingFisher Flex (ekstrakcja zautomatyzowana)	1	1,5	1,5

Zakres zastosowania testu

W zestawie SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent sekwencje starterów oligonukleotydowych i sond dla elementów docelowych N1 i N2 wirusa oraz ludzkiego genu RNazy P są identyczne pod względem sekwencji z sekwencjami stosowanymi w panelu diagnostycznym dla zastosowań awaryjnych CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel for Emergency Use Only. Zakres zastosowania tego panelu został ustalony wcześniej.

Reaktywność krzyżowa

W zestawie SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent sekwencje starterów oligonukleotydowych i sond dla elementów docelowych N1 i N2 wirusa oraz ludzkiego genu RNazy P są identyczne pod względem sekwencji z sekwencjami stosowanymi w panelu diagnostycznym dla zastosowań awaryjnych CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel for Emergency Use Only. Reaktywność krzyżowa tego panelu została ustalona wcześniej.

Ocena kliniczna

Zestaw SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent został poddany ocenie klinicznej z wykorzystaniem próbek wymazu z jamy nosowo-gardłowej pobranych od ludzi. Dla każdego warunku przeprowadzono badania na 80 próbkach: 40 ujemnych próbkach wymazu z jamy nosowo-gardłowej i 40 dodatnich próbkach wymazu z jamy nosowo-gardłowej. Dodatni lub ujemny wynik każdej próbki został potwierdzony testem qRT-PCR w kierunku wirusa SARS-CoV-2, przeprowadzonym na podstawie pozwolenia na użytek w sytuacjach awaryjnych (ang. Emergency Use Authorization, EUA). Celem oceny klinicznej była ocena zgodności klinicznej (dodatni/ujemny) wyników oznaczenia uzyskanych za pomocą zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent z wynikami uzyskanymi za pomocą porównawczego oznaczenia EUA qRT-PCR w kierunku wirusa SARS-CoV-2.

Ekstrakcja kwasu nukleinowego została przeprowadzona na każdej próbce przy użyciu obu obsługiwanych automatycznych platform ekstrakcji (QIAGEN QIAasympphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit z systemem QIAasympphony SP i Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit z systemem KingFisher Flex Purification System) z zastosowaniem protokołu producenta i zaleceń podanych w niniejszej instrukcji użycia. Każda wyizolowana próbka była następnie testowana na wszystkich trzech obsługiwanych systemach do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Agilent AriaMx, ABI 7500 i Bio-Rad CFX96), w sposób opisany w niniejszej instrukcji użycia. W związku z tym każda próbka była badana w sześciu (6) różnych warunkach. Kryterium akceptacji była zgodność wyników dodatnich i ujemnych pomiędzy zestawem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent a oznaczeniem porównawczym na poziomie co najmniej 95%. Podsumowanie wyników porównania zawiera **Tabela 20**.

Tabela 20 Procentowa zgodność wyników dodatnich (PPA), procentowa zgodność wyników ujemnych (NPA) i ogólna zgodność (OA) między zestawem SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent a porównawczym oznaczeniem qRT-PCR EUA w kierunku wirusa SARS-CoV-2

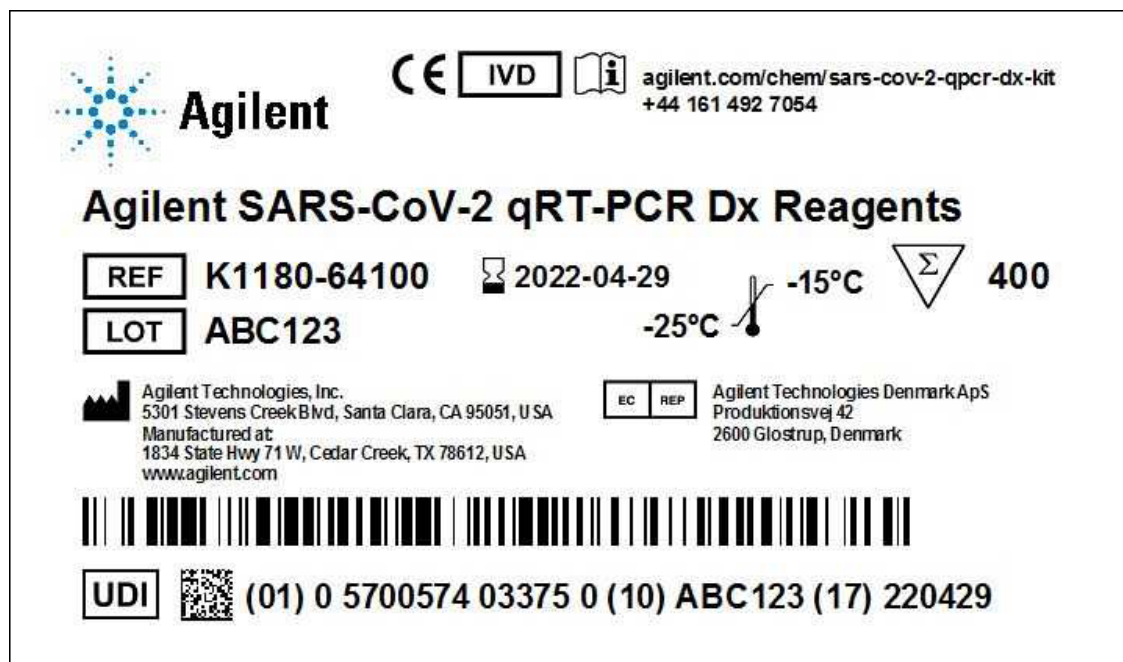
Platforma ekstrakcji:	QIAasympphony	QIAasympphony	QIAasympphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
System do reakcji PCR w czasie rzeczywistym:	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
PPA	97,4%	100,0%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%
NPA	100,0%	97,5%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%
OA	98,7%	98,8%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%

10 Materiały referencyjne

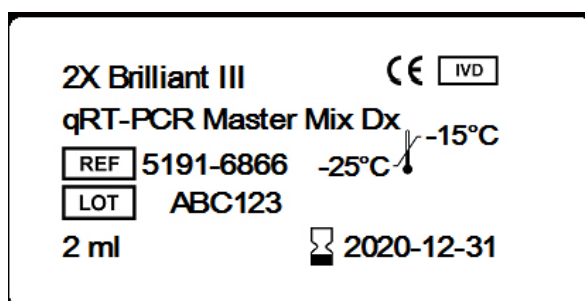
Etykiety produktu **81**

W niniejszym rozdziale zamieszczono kopie etykiet produktu dla zestawu SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit firmy Agilent.

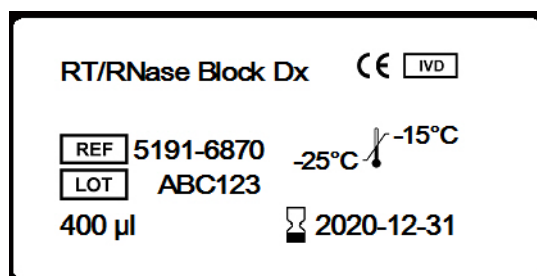
Etykiety produktu



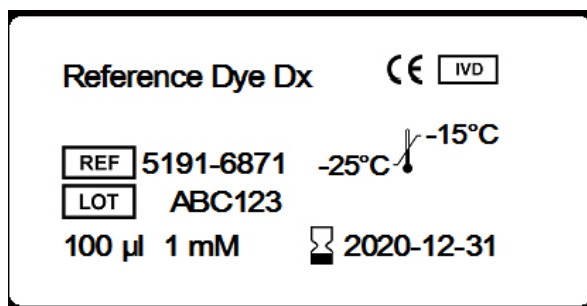
Rycina 37 Etykieta na opakowaniu dla produktu K1180-64100



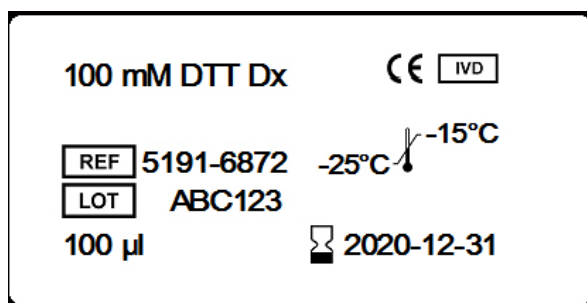
Rycina 38 Etykieta na butelce dla produktu 5191-6866



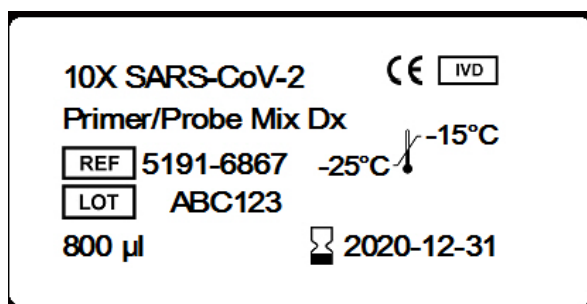
Rycina 39 Etykieta na probówce dla produktu 5191-6870



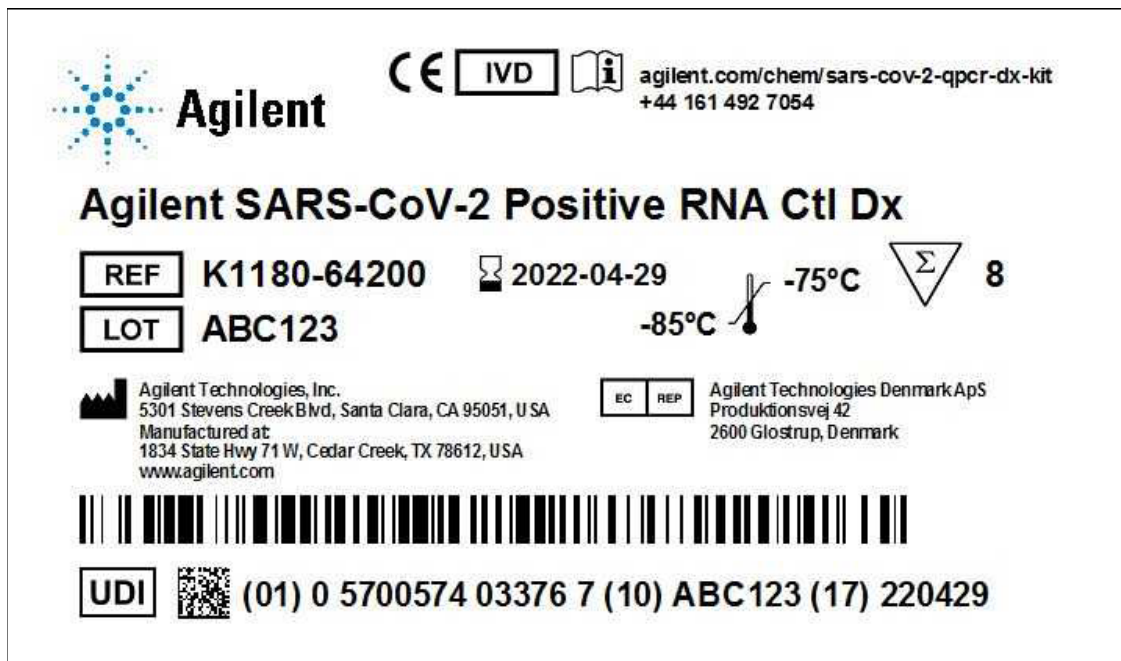
Rycina 40 Etykieta na probówce dla produktu 5191-6871



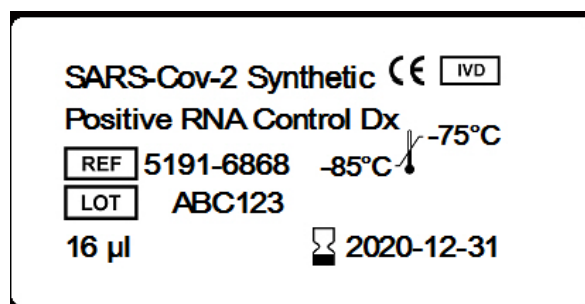
Rycina 41 Etykieta na probówce dla produktu 5191-6872



Rycina 42 Etykieta na probówce dla produktu 5191-6867



Rycina 43 Etykieta na opakowaniu dla produktu K1180-64200



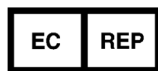
Rycina 44 Etykieta na probówce dla produktu 5191-6868

Wyprodukowane przez



Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA
Wyprodukowano w:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA
www.agilent.com

Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej



Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark

Pomoc techniczna firmy Agilent

Należy odwiedzić stronę www.agilent.com/en/contact-us/page w celu uzyskania numerów telefonów dla danego kraju
lub wysłać wiadomość e-mail na adres covid.support@agilent.com

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Żadna część niniejszej instrukcji nie może być powielana w jakiegokolwiek formie ani w jakikolwiek sposób (w tym poprzez elektroniczne przechowywanie i odzyskiwanie danych lub tłumaczenie na języki obce) bez uprzedniej pisemnej zgody firmy Agilent Technologies, Inc., zgodnie z przepisami Stanów Zjednoczonych i międzynarodowymi przepisami dotyczącymi ochrony praw autorskich.

