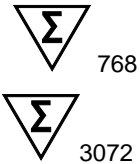


януари 2022 г.

Набор *artus*[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp[™] UM Kit Инструкции за употреба (Ръководство)



Версия 1



За инвитро диагностика на апарати Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM, ABI[®] 7500 Fast Dx, QuantStudio[®] 5 Dx, cobas[®] z 480 or CFX96[™] Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

R4

Съдържание

Предвидена употреба	4
Описание и принцип	5
Информация за патогени	5
Кратко изложение и обяснение	6
Предоставени материали	9
Съдържание на набора	9
Компоненти на набора	10
Платформи и софтуер	11
Необходими, но непредоставени материали	12
Консумативи и оборудване	12
Предупреждения и предпазни мерки	14
Информация за безопасността	14
Предпазни мерки	15
Съхранение и работа с реактиви	16
Транспортиране, съхранение и работа с проби	16
Протокол: Подготовка на аликвотна част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат RGQ MDx 5plex HRM	18
Протокол: Подготовка на аликвотна част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат ABI 7500 Fast Dx	24
Протокол: Подготовка на аликвотна част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат CFX96 Dx	30
Протокол: Подготовка на аликвотна част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат cobas z 480	36

Протокол: Подготовка на аликвотната част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат QuantStudio 5 Dx	42
Резултати	48
Анализ на апарат RGQ MDx 5plex HRM	48
Анализ на ABI 7500 Fast Dx	50
Анализ на апарат CFX96 Dx	50
Анализ на апарат cobas z 480	52
Анализ на QuantStudio 5 Dx	53
Интерпретиране на резултатите	55
Ограничения	57
Производителност	58
Аналитична чувствителност (граница на откриване)	58
Аналитични изследвания на специфичността (инклузивност и ексклузивност/кръстосана реактивност)	59
Прецизност	70
Клинични работни характеристики	71
Цитирани източници	75
Ръководство за отстраняване на проблеми	77
Символи	79
Информация за контакт	81
Информация за поръчка	82
Хронология на редакциите на документа	83

Предвидена употреба

Наборът *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* е real-time RT-PCR тест, предназначен за качествено откриване на нуклеинова киселина от SARS-CoV-2 в назофарингеални тампони (NPS), назални тампони и орофарингеални тампони от лица с признаци и симптоми на инфекция или лица без симптоми, или други причини за съмнения за инфекция с COVID-19. За образци от неразредена слюнка тестът е предназначен за лица с признаци и симптоми на инфекция, или за които се подозира, че са COVID-19.

Той е предназначен да служи като помощно средство при диагностициране на COVID-19 в острата фаза на инфекцията, в комбинация с клинични наблюдения, анамнеза и епидемиологична информация за пациента.

Наборът *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* трябва да се използва в лабораторна среда за молекулярна биология от професионални потребители, като например обучен персонал в клинична лаборатория, специално инструктиран за техниките за real-time RT-PCR и процедурите за *инвитро* диагностика.

Отрицателните резултати не изключват възможността за инфекция със SARS-CoV-2 и не трябва да се използват като единствена основа за вземане на решения за управление на пациента.

Наборът *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* е предназначен да бъде използван с Rotor-Gene Q MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 или CFX96 Dx, като системи за real-time PCR.

Описание и принцип

Информация за патогени

Коронавирусите, род от семейство *Coronaviridae*, са РНК вируси с голяма обвивка, положителна усукана верига, които причиняват високо вирулентно заболяване при хора и домашни животни (1). Известно е, че коронавирусите заразяват хората и са причинители на една трета от инфекциите с обикновена настинка, а също така са добре известна причина за вътреболнични инфекции на горните дихателни пътища при недоносени бебета (2).

Един нов член на семейството на коронавирус предизвика огнище на респираторно заболяване в град Ухан в Китай (1, 3). Наречен първоначално нов коронавирус (2019-nCoV), вирусът SARS-CoV-2 се различава от SARS-CoV (1, 3), определен като причинител на епидемията през 2003 г. и MERS-CoV, циркулиращ в Близкия изток от 2012 г. SARS-CoV-2 е причинителят на COVID-19. РНК на SARS-CoV-2 може да бъде открита по време на ранните и остри фази на инфекцията в различни проби от горните дихателни пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони) и в неразредена слюнка (3).

В комбинация с анамнезата на пациентите и епидемиологията на SARS-CoV-2, real-time RT-PCR анализите се превърнаха в златен стандарт за диагностика на SARS-CoV-2. Европейският център за превенция и контрол на заболяванията (ECDC) предложи да се комбинират анализи на базата на real-time RT-PCR с имуноанализи за проследяване на състоянието на инфекцията и оценка на ефективността на ограничителните мерки, предприети за контрол на епидемията (4, 5).

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit е предназначен да обхване 2 цели (N1 и N2) от ген N, открит със същия флуоресцентен канал. Двете цели не се диференцират и амплификацията на едната или на двете от тях води до флуоресцентен сигнал. Положителните резултати са показателни за наличието на SARS-CoV-2, но не изключват коинфекция с други патогени. От друга страна, отрицателните real-time RT-PCR резултати не изключват възможна инфекция.

Кратко изложение и обяснение

Наборът *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit представлява готова за употреба система с проста стъпка за подготовка на аликвотната част, последвана от откриване на РНК SARS-CoV-2 с помощта на real-time RT-PCR на система RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 или QuantStudio 5 Dx (Фигура 1).

Буферът SARS-CoV-2 UM Amp Buffer съдържа реактиви и ензими за специфичното амплифициране на 72 базови двойки (bp) и 67 bp региона на генома на РНК SARS-CoV-2 и за тяхното директно откриване във флуоресцентен канал „Green“ на апарати RGQ MDx и във флуоресцентния канал „FAM“ на ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 или QuantStudio 5 Dx.

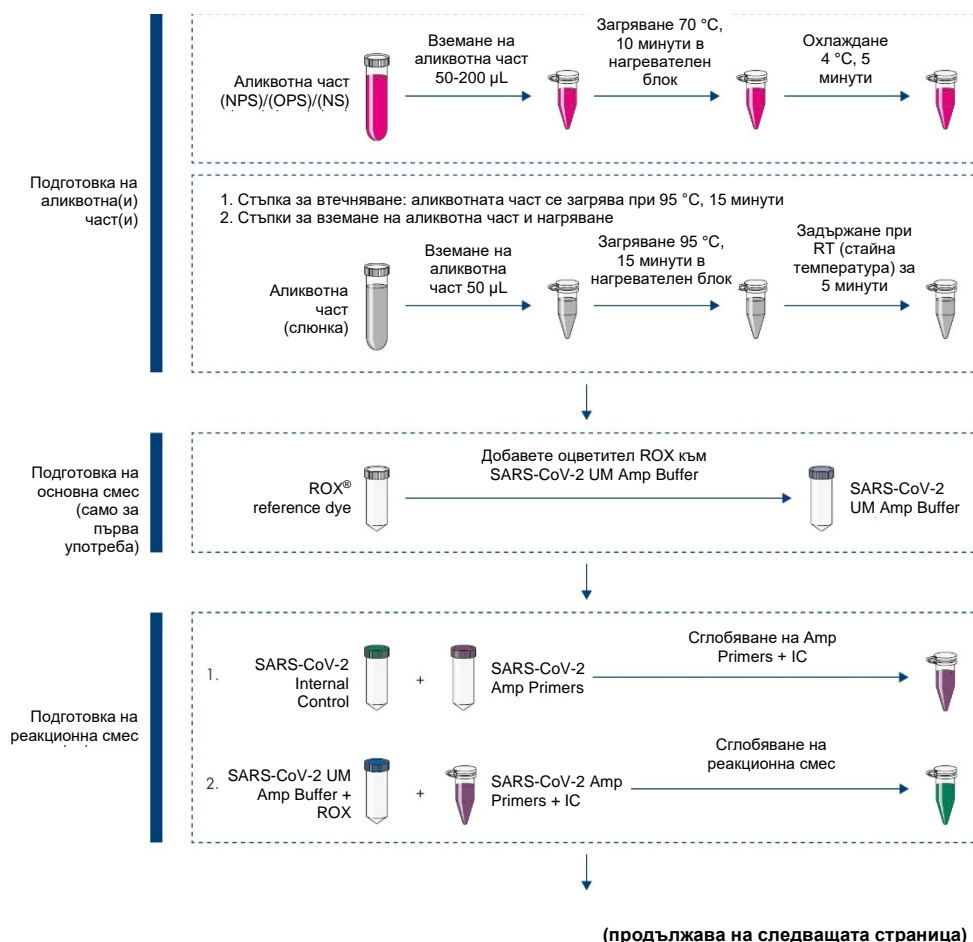
Сместа от праймери и сонди на *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit съдържа също олигонуклеотидите, необходими за амплификации на RNase P. Когато бъдат открити във флуоресцентен канал „Yellow“ на апарата RGQ MDx, във VIC/HEX на ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 или QuantStudio 5 Dx, тези амплификации гарантират, че е събрана достатъчно количество биологична аликвотна част. Този контрол е от решаващо значение, за да се гарантира наличието на биологични аликвотни части в отрицателни аликвотни части SARS-CoV-2. Амплификацията трябва винаги да може да бъде открита; в противен случай се поставя под въпрос качеството на аликвотната част.

Наборът *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit съдържа също и трета хетерологична амплификационна система за разкриване на възможно инхибиране на real-time RT-PCR. Това се открива като вътрешна РНК контрола (IC) във флуоресцентен канал „Red“ на апаратите RGQ MDx или в Cy5/ATTO647N на ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 или QuantStudio 5 Dx. Тъй като IC е включена в сместа SARS-CoV-2 Amp Primers, нейната амплификация трябва да бъде постоянна, освен ако в аликвотната част или в PCR реакцията не присъства инхибитор на real-time RT-PCR, който забавя или възпрепятства амплификацията.

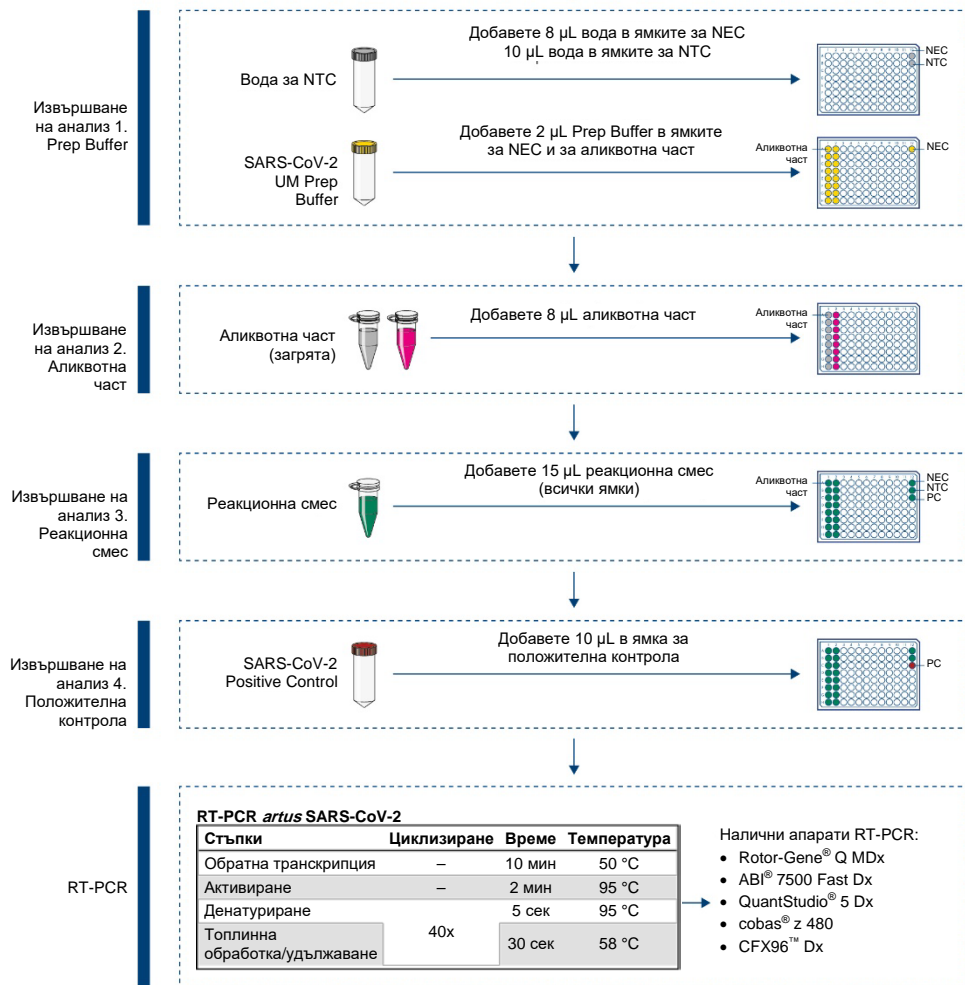
За удостоверяване на ефективността на стъпката PCR в набора *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit са предоставени външни положителни и отрицателни контроли (като NTC се използват съответно SARS-CoV-2 Positive Control и вода без съдържание на нуклеаза).

За проверка за отсъствие в подготвителния буфер на инхибитори на real-time RT-PCR, силно се препоръчва контрола без извличане (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, използван като NEC).

Взети заедно, с тези контроли се проследява, ефективността на обратната транскрипция и стъпките на PCR.



(продължава от предходната страница)



Фигура 1. Работен поток за набор *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Предоставени материали

Съдържание на набора

<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit					
Каталожен №				4511460	4511469
Брой реакции				768	3072
Цвят на епруветката	Цвят на капачето	Идентичност	ID на епруветка	Обем (µL)	Обем (µL)
Бистър	Жълт	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	Подготвен буфер	2 x 930	8 x 930
Бистър	Син	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	Основна смес	4 x 1440	16 x 1440
Бистър	Лилав	SARS-CoV-2 Amp Primers	Праймери и сонди	4 x 1680	16 x 1680
Бистър	Зелен	SARS-CoV-2 Internal Control	Вътрешна контрола (IC)	1 x 1390	4 x 1390
Бистър	Червен	SARS-CoV-2 Positive Control	Положителна контрола	1 x 220	4 x 220
Бистър	Бистър	Вода за NTC	Вода (NTC)	1 x 1900	4 x 1900
Бистър	Бистър	ROX Reference Dye	Оцветител ROX	1 x 210	4 x 210

Компоненти на набора

Реактиви

Във всяка епруветка обемите на реактивите са оптимизирани за 8 партиди от 96 аликвотни части (за набор за 768 реакции) или 32 партиди от 96 реакции (за набор за 3072 реакции), включително положителна контрола (PC), контрола без еталон (NTC) и контрола без извличане (NEC).

Възможна е обработка на по-малък или по-голям брой аликвотни части, но това води до неоптимално използване на реактивите. Препоръчително е да се избягват множество цикли замразяване-размразяване. За избягване на множество цикли замразяване-размразяване, реактивите могат да бъдат разпределени на аликвотни части.

Праймери и сонди

Праймерите и сондите, насочени към секвенциите на SARS-CoV-2, се основават на праймерите и сондите, проектирани от Центровете за контрол и превенция на заболяванията (CDC).

Контроли и калибратори

Анализът съдържа 5 контроли за проследяване на ефективността на real-time RT-PCR.

Вътрешна контрола (IC): Вътрешната контрола е едноверижна IVT РНК, която проверява за наличие на замърсители, които биха могли да инхибират обратната транскрипция. Вътрешната контрола следи също и ефективността на обратната транскрипция в контролата без еталон (NTC) и в контролата без извличане (NEC).

Контрола без еталон (NTC): Контролата без еталон се състои от вода без съдържание на нуклеаза. Тя се добавя към плаката за PCR, за да се провери въвеждане на замърсители по време на подготовката на плаката за PCR, което може да доведе до погрешна интерпретация на целите за SARS-CoV-2.

Положителна контрола (PC): Положителната контрола е двуверижна ДНК, амплифицирана с праймери и сонди SARS-CoV-2 Primers и Probes (смес P&P). Нейното откриване проверява ефективността на реактива, участващ в етапа на PCR амплификация.

Контрола без извличане (NEC): Контролата без извличане е съставена от SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Тя се обработва паралелно с клиничните аликвотни части, за проверка за въвеждане на замърсители по време на подготовката на аликвотната част, което може да доведе до погрешна интерпретация на целите за SARS-CoV-2.

Контрол на взети аликвотни части: Контролът на взетите аликвотни части открива гена RNase P и е от решаващо значение за да се гарантира наличието на биологични аликвотни части в отрицателни аликвотни части SARS-CoV-2. Амплификацията на контрола на взетите аликвотни части трябва винаги да може да бъде открита; в противен случай се поставя под въпрос качеството на аликвотната част.

Платформи и софтуер

Преди употреба на набора се уверете, че апаратите са проверени и калибрирани съгласно препоръките на производителя. Този набор може да се използва в пет работни потока, изискващи използване на следните real-time RT-PCR апарати и техния подходящ софтуер:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Софтуер Rotor-Gene Q версия 2.3.1 или по-нова
- ABI 7500 Fast Dx: SDS софтуер версия 1.4.1 или по-нова
- CFX96 Dx с CFX Manager Dx софтуерна версия 3.1.3090.1022 или по-нова
- cobas z 480 с LightCycler® 480 SW UDF версия 2.0.0 или по-нова
- QuantStudio 5 Dx с QuantStudio 5 Dx IVD софтуерна версия 1.0.1 или по-нова и QuantStudio 5 Dx TD софтуерна версия 1.0.1 или по-нова

Необходими, но непредоставени материали

Консумативи и оборудване

Общи консумативи и оборудване

- Настолна центрофуга с ротор за 2 mL реакционни епруветки
- Пипети (регулируеми)
- Вихров смесител (вортекс)
- Нагревателен блок
- Ръкавици, обезпрашени, за еднократна употреба
- Стерилни накрайници за пипети не съдържащи нуклеаза, с филтри
- 1,5 mL или 2 mL епруветки PCR-free
- Центрофуга за плаки с 96 ямки

Консумативи и оборудване за всяка платформа

Апарат Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

- 0,1 mL епруветки за PCR, за използване с Rotor-Gene Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, кат. № 981103).
- 72-Well Rotor (кат. № 9018903) и Locking Ring 72-Well Rotor (кат. № 9018904)

Апарат ABI 7500 Fast Dx

- 96-Well MicroAmp™ (Thermo Fisher Scientific, кат. № N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4360954)

Апарат CFX96 Dx

- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, нисък профил, тънкостенна, с бордове, бяла/прозрачна (Bio-Rad Laboratories Inc., кат. № HSP9601)
- Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, лепливо, оптично (Bio-Rad Laboratories Inc., кат. № MSB1001).

Апарат cobas z 480

- LightCycler 480 Multiwell Plate, бяла (Roche Group, кат. № 04729692001).
- LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Group, кат. № 04729757001).

Апарат QuantStudio 5 Dx

- MicroAmp EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, кат. № A36924)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4360954)

Предупреждения и предпазни мерки

Обръщаме ви внимание, че може да се наложи да докладвате на производителя и регулаторния орган в страната по местожителство на потребителя и/или пациента за сериозни инциденти, възникнали във връзка с изделието.

Информация за безопасността

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Тези листове са налични онлайн в удобен и компактен PDF формат на адрес www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN и компонент на набора.

Винаги носете подходящи лични предпазни средства – например ръкавици за еднократна употреба без талк, лабораторна престилка и предпазни очила. Пазете кожата, очите и лигавиците си. При работа с аликвотни части често сменяйте ръкавиците си.

Всички аликвотни части трябва да се третират като потенциално опасни. Винаги съблюдавайте предпазните мерки, описани в съответните насоки, като например *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guideline* (M29) на Clinical and Laboratory Standards Institute® (Институт по клинични и лабораторни стандарти, (CLSI)) или други подходящи документи.

Пробите и аликвотните части са потенциално заразни. Изхвърлете аликвотната част и отпадъка от анализа в съответствие с местните процедури за безопасност.

Предпазни мерки

- Спазвайте стандартните лабораторни процедури за поддържане на работното място чисто и стерилно. Определете зона със специфично оборудване за манипулации с РНК.
- Следвайте добрите лабораторни практики, за да сведете до минимум кръстосаното замърсяване.
- По време на експеримента вземете мерки за предотвратяване на замърсяване с RNase и използвайте пластмасови съдове без съдържание на RNase.
- Уверете се, че имате добра проследимост със записите, особено за идентификация на аликвотната част.

Съхранение и работа с реактиви

Трябва да се обърне внимание на срока на годност и условията на съхранение, отпечатани върху кутията и етикетите на всички компоненти. Не използвайте неправилно съхранявани компоненти или такива с изтекъл срок на годност.

Наборът *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit може да се съхранява при температури от -30 °C до -15 °C в продължение на 6 месеца или до изтичане на срока на годност.

Транспортиране, съхранение и работа с проби

Наборът *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit е предназначен за използване с назални, орофарингеални и назофарингеални тампони и проби от неразредена слюнка. Всички аликвотни части трябва да се третират като потенциално опасни. Центровете за контрол и превенция на заболяванията (CDC) и обществено здраве в Англия предоставят насоки за събиране, обработка на аликвотни части и тестване на клинични проби. За допълнителна информация направете справка с тези указания или други съответни национални протоколи на референтни лаборатории.

Събиране, транспортиране и съхранение на назални, орофарингеални и назофарингеални тампони

За събиране, съхранение и транспорт на тампони, вижте препоръките на доставчика. За поддържане на целостта на пробите тампоните трябва да бъдат напълно потопени в транспортната среда. Аликвотните части от назофарингеален тампон остават стабилни и могат да се съхраняват при температура:

- от 4 °C (2 до 8 °C) до 72 часа
- -70 °C за 2 седмици

Аликвотните части от назофарингеален тампон остават стабилни в рамките на 3 цикъла замразяване-размразяване.

Събиране, транспортиране и съхранение на аликвотни части от неразредена слюнка

Аликвотните части от неразредена слюнка трябва да се събират в стерилни контейнери без никакви консерванти, буфери или други добавки.

Инструкции за събиране на неразредена слюнка:

- Избягвайте да кашляте преди събиране на неразредена слюнка.
- Не яжте, не пийте, не пушете обикновени или електронни цигари, не дъвчете дъвка и не мийте зъбите си 30 минути преди събиране на неразредена слюнка.
- 24 часа преди събиране на неразредена слюнка не трябва да се извършват стоматологични работи или стоматологичен преглед.

Неразредени аликвотни части от слюнка остават стабилни и могат да се съхраняват при:

- стайна температура (18 – 26 °C) до 72 часа
- от 4 °C (2 до 8 °C) до 72 часа
- Комбинирано съхранение при RT след това 4°C, последвано от съхранение при –20 °C (–30 до –15 °C) до 12 дни
- –20 °C (–30 до –15 °C) за 1 месец

Аликвотните части от неразредена слюнка остават стабилни през 3 цикъла на замразяване-размразяване.

Ако условията за съхранение на аликвотни части се отклоняват от тази препоръка, е необходимо да валидирате вашите условия за съхранение.

Протокол: Подготовка на аликвотна част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат RGQ MDx 5plex HRM

Този протокол описва подготовката на аликвотна част за real-time RT-PCR за откриване на целеви SARS-CoV-2 в човешки назални, назофарингеални или орофарингеални тампони, съхранявани в транспортни среди и в аликвотни части от неразредена слюнка на апарат RGQ MDx 5plex HRM за real-time RT-PCR, със софтуер Rotor-Gene Q версия 2.3.1.49 (или по-нова).

Важни моменти преди да започнете

- Проверете дали са спазени сроковете на годност и условията на съхранение, отпечатани върху кутията и всички етикети на компоненти. Не използвайте неправилно съхранявани компоненти или такива с изтекъл срок на годност.
- Използвайте добре поддържано и калибрирано оборудване.
- По време на експеримента вземете мерки за предотвратяване на замърсяване с RNases и използвайте пластмасови съдове без съдържание на нуклеаза.

Неща, които да направите, преди да започнете

- По време на етапите на подготовка на реакцията респираторните аликвотни части могат да бъдат съхранявани при стайна температура (15 – 25 °C), но се препоръчва те да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C.
- Аликвотни части от слюнка могат да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C, но по време на етапите на подготовка и настройка на реакцията се препоръчва да се съхраняват при стайна температура (15 – 25 °C).

- Преди употреба, оставете SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, водата за NTC и SARS-CoV-2 Positive Control да се размразят напълно на стайна температура. До момента на използване съхранявайте епруветките при стайна температура и защитени от светлина.
- Преди употреба хомогенизирайте SARS-CoV-2 UM Prep Buffer UM и SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, като ги обърнете 2 – 3 пъти (не разбърквайте с вортекс), последвано от кратко центрофугиране. Всички други отделни реактиви могат да бъдат хомогенизирани чрез импулсно разбъркване с вортекс за 3 – 5 секунди или чрез обърщане 2 – 3 пъти, последвано от кратко центрофугиране.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer инхибира RNases, присъстващи в клиничните аликвотни части за етапа на откриване, но не е разтвор, инактивиращ вируса. Всички аликвотни части трябва да се третират като потенциално опасни.
- Проверете дали условията за циклична обработка на платформата за real-time RT-PCR са такива, като посочените в този протокол.
- За избягване на множество цикли замразяване-размразяване, реактивите могат да бъдат разпределени на аликвотни части.
- Пригответе прясна реакционна смес (< 2 часа преди пускане на плаката за RT-PCR).
- За свеждане на замърсяването до минимум, подготовката на аликвотната част и RT-PCR трябва да се извършва в отделни зони.

Процедура

Подготовка на аликвотни части: За проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони), следвайте стъпка 1. За проби от слюнка преминете към стъпка 2.

1. Проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони):
 - 1а. Разбъркайте енергично с вортекс тампона, съдържащ аликвотната част.

- 1b. Разпределете аликвотна част от 50 – 200 μL проба в 1,5 mL епруветки PCR-free
- 1c. Изпълнете стъпка за нагряване при 70 °C за 10 минути върху нагревателен блок. Охладете аликвотните части върху лед за поне 5 минути, след което съхранявайте аликвотните части върху лед или при 4 °C.
2. Аликвотни части от слюнка:
 - 2a. Втечняване (за улесняване на пипетирането): аликвотната част от слюнка се загрява при 95 °C за 15 минути (неуточнен обем, контейнер или нагревателно устройство).
 - 2b. Хомогенизирайте аликвотната част, като внимателно пипетирате и отпипетирате 8 – 10 пъти.
 - 2c. Разпределете 50 μL от аликвотната част в 1,5 mL епруветка PCR-free.
 - 2d. Изпълнете стъпка за нагряване при 95 °C в продължение на 15 минути върху нагревателен блок, след което аликвотната част се държи поне 5 мин при стайна температура, докато бъде заредена в ямка или епруветка за PCR.
3. При първо използване, завършете SARS-CoV-2 UM Amp Buffer с ROX Reference Dye.
 - 3a. Добавете 32,8 μL от оцветителя ROX в 1 епруветка със SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Затворете капачето на епруветката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и оцветителя ROX и обърнете епруветката 3 пъти.
 - 3c. Центрофугирайте епруветката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, и оцветител ROX в дъното на епруветката.
4. За пълна плака RGQ MDx (72 ямки), пригответе аликвотна смес от SARS-CoV-2 Amp Primers със SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 4a. Прехвърлете необходимите обеми от SARS-CoV-2 Amp Primers и SARS-CoV-2 Internal Control съгласно таблица 1 в нова епруветка PCR-free от 1,5 mL.
 - 4b. Затворете капачето и обърнете епруветката 3 пъти или разбъркайте импулсно с вортекс съдържанието на епруветката за 3 – 5 сек.
 - 4c. Центрофугирайте SARS-CoV-2 Amp Primers, съдържащи IC в долната част на епруветката.

Таблица 1. Подготвяне на смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Реактиви	Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC		Брой реакции Обем (µL)	
	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	72 реакции (+20% допълнителен обем*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	626,4
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µL	10 cp/µL	1,5	129,6
Общо смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	756

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 Amp Primers и на SARS-CoV-2 Internal Control според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

5. Пригответе реакционна смес съгласно Таблица 2 и разбъркайте старателно, като обърнете епруветката 3 пъти.

Таблица 2. Подготовка на реакционна смес

Реактиви	RT-PCR реакционна смес			Брой реакции Обем (µL)
	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	72 реакции (+20% допълнителен обем*)
Смес SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	540
Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	756
Общ реакционен обем		–	15,00	1296

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 Amp Buffer и SARS-CoV-2 Amp Primers според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

- Разпределете 8 µL вода без нуклеаза към PCR епруветката, определена за NEC.
- Заредете 10 µL вода без нуклеаза в PCR епруветката, определена за NTC.
- Разпределете 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer във всяка PCR епруветка, определена за NEC и подготвените аликвотни части.
- Добавете 8 µL от пригответената аликвотна част към PCR епруветка, съдържаща SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.

10. Добавете 15 µL от реакционната смес, подготвена в Стъпка 5, към епруветките, предназначени за аликвотни части и контроли (Фигура 2 е предоставена като пример). Смесете, като пипетирате и отпипетирате 5 пъти, след което затворете капачетата на PCR епруветките, с изключение на тази, запазена за SARS-CoV-2 Positive Control.

Забележка: Проверете дали епруветките са добре затворени, за да предотвратите кръстосано замърсяване.

11. Заредете 10 µL от SARS-CoV-2 Positive Control в съответната PCR епруветка. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.

12. Настройте RT-PCR програмата на аппарата RGQ MDx 5plex HRM съгласно спецификациите в Таблица 3.

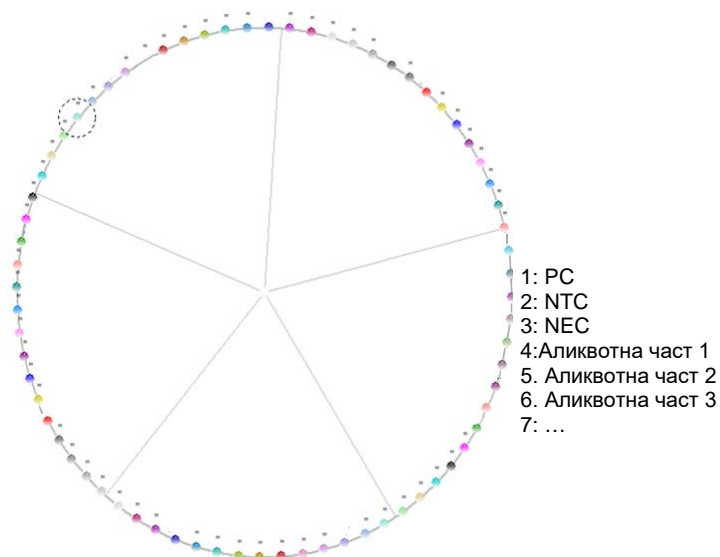
Забележка: Събирането на данни трябва да се извърши по време на етапа на температурна обработка/удължаване.

13. Поставете епруветките в аппарата за циклична обработка в реално време (на Фигура 2 е представен пример за разположението на епруветката) и стартирайте програмата за циклична обработка, както е описано в Таблица 3.

Забележка: Внимавайте да спазвате една и съща позиция на епруветката и ред между задаването на анализа и стъпките за циклична обработка в реално време.

Таблица 3. Програма SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Стъпки	Време	Температура (°C)	Брой цикли	Получаване
Обратна транскрипция	10 мин	50	1	Не
PCR първоначално топлинно активиране	2 мин	95	1	Не
2-стъпкова циклична обработка				
Денатуриране	5 сек	95	40	Не
Топлинна обработка/удължаване	30 сек	58		Green, Yellow и Red



Фигура 2. Пример за разположение на епруветките на платформата RGQ MDx 5plex HRM

14. Щракнете върху Gain optimization (Оптимизация на усилването) в „New Run Wizard“ и отворете Auto-gain Optimization Setup (Задаване на автоматична оптимизация на усилването).
15. Проверете дали каналите за получаване са зададени, както е описано в Таблица 4.

Таблица 4. Конфигурация на RGQ MDx 5plex HRM

Име	Позиция на епруветки PC	Мин. отчитане (FI)	Макс. отчитане (FI)	Мин. усилване	Макс. усилване
Green	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

* **Забележка:** Това трябва да се промени в зависимост от позицията на епруветката за SARS-CoV-2 Positive Control.

16. Преди първото получаване изберете Perform optimization (Извършване на оптимизация).
17. Стартирайте изпълнението на работния цикъл.
18. В края на цикъла анализирайте резултатите (вижте раздела Резултати).

Протокол: Подготовка на алиquotна част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат ABI 7500 Fast Dx

Този протокол е предназначен за подготовка и откриване на SARS-CoV-2 цели в човешки назални, назофарингеални или орофарингеални тампони, съхранявани в транспортна среда и в алиquotни части от неразредена слюнка с real-time RT-PCR на апарат ABI 7500 Fast Dx.

Важни моменти преди да започнете

- Проверете дали са спазени сроковете на годност и условията на съхранение, отпечатани върху кутията и всички етикети на компоненти. Не използвайте неправилно съхранявани компоненти или такива с изтекъл срок на годност.
- Използвайте добре поддържано и калибрирано оборудване.
- По време на експеримента вземете мерки за предотвратяване на замърсяване с RNases и използвайте пластмасови съдове без съдържание на нуклеаза.
- Когато използвате апарат ABI 7500 Fast Dx, преди първа употреба, към епруветката с основна смес трябва да се добави оцветител ROX.

Неща, които да направите, преди да започнете

- По време на етапите на подготовка на реакцията респираторните алиquotни части могат да бъдат съхранявани при стайна температура (15 – 25 °C), но се препоръчва те да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C.
- Алиquotни части от слюнка могат да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C, но по време на етапите на подготовка и настройка на реакцията се препоръчва да се съхраняват при стайна температура (15 – 25 °C).
- При използване на апарат ABI 7500 Fast Dx е необходим оцветител ROX.

- Данните трябва да бъдат получени с настройката за ROX пасивен оцветител.
- Преди употреба оставете напълно да се размразят при стайна температура SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, вода за NTC и SARS-CoV-2 Positive Control. До момента на използване съхранявайте епруветките при стайна температура и защитени от светлина.
- Преди употреба хомогенизирайте SARS-CoV-2 UM Prep Buffer UM и SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, като ги обърнете 2 – 3 пъти (не разбърквайте с вортекс), последвано от кратко центрофугиране. Всички други отделни реактиви могат да бъдат хомогенизирани чрез импулсно разбъркване с вортекс за 3 – 5 секунди или чрез обръщане 2 – 3 пъти, последвано от кратко центрофугиране.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer инхибира RNases, присъстващи в клиничните алиquotни части за етапа на откриване, но не представлява разтвор, инактивиращ вируса. Всички алиquotни части трябва да се третират като потенциално опасни.
- Проверете дали условията за циклична обработка на платформата за real-time RT-PCR са такива, като посочените в този протокол.
- За избягване на множество цикли замразяване-размразяване, реактивите могат да бъдат разпределени на алиquotни части.
- Пригответе прясна реакционна смес (< 2 часа преди пускане на плаката за RT-PCR).
- За свеждане на замърсяването до минимум, подготовката на алиquotната част и RT-PCR трябва да се извършва в отделни зони.

Процедура

Подготовка на алиquotни части: За проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони), следвайте стъпка 1. За проби от слюнка преминете към стъпка 2.

1. Проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони):
 - 1a. Разбъркайте енергично с вортекс тампона, съдържащ алиquotната част.
 - 1b. Разпределете алиquotна част от 50 – 200 μL проба в 1,5 mL епруветки PCR-free.
 - 1c. Изпълнете стъпка за нагряване при 70 °C за 10 минути върху нагревателен блок.
 - 1d. Охладете алиquotните части върху лед за поне 5 минути след което съхранявайте алиquotните части върху лед или при 4 °C.
2. Алиquotни части от слюнка:
 - 2a. Втечняване (за улесняване на пипетирането): алиquotната част от слюнка се загрева при 95 °C за 15 минути (неуточнен обем, контейнер или нагревателно устройство).
 - 2b. Хомогенизирайте алиquotната част, като внимателно пипетирате и отпипетирате 8 – 10 пъти
 - 2c. Разпределете 50 μL от алиquotната част в 1,5 mL епруетка PCR-free.
 - 2d. Изпълнете стъпка за нагряване при 95 °C за 15 минути върху нагревателен блок, след което алиquotната част се държи поне 5 мин при стайна температура, докато бъде заредена в ямка или епруетка за PCR.
3. При първо използване, завършете SARS-CoV-2 UM Amp Buffer с ROX Reference Dye.
 - 3a. Добавете 32,8 μL от оцветителя ROX в епруетка със SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Затворете капачето на епруетката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и оцветителя ROX и обърнете епруетката 3 пъти.
 - 3c. Центрофугирайте епруетката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, и оцветител ROX в дъното на епруетката.
4. За пълна плака ABI 7500 Fast Dx (96 ямки), пригответе алиquotна смес от SARS-CoV-2 Amp Primers със SARS-CoV-2 Internal Control.

- 4а. Прехвърлете необходимите обеми от SARS-CoV-2 Amp Primers и SARS-CoV-2 Internal Control съгласно Таблица 5 в нова епруветка PCR-free от 1,5 mL.
- 4б. Затворете капачето и обърнете епруветката 3 пъти или разбъркайте импулсно с вортекс съдържанието на епруветката за 3 – 5 сек.
- 4с. Центрофугируйте SARS-CoV-2 Amp Primers, съдържащи IC, за да придвижите разтвора на дъното на епруветката.

Таблица 5. Подготовка на смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Брой реакции Обем (µL)	
Реактиви	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	96 реакции (+20% допълнителен обем*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µL	10 cp/µL	1,5	172,8
Общо смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 Amp Primers и на SARS-CoV-2 Internal Control според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

5. Пригответе реакционна смес съгласно Таблица 6 и разбъркайте старателно, като обърнете епруветката 3 пъти.

Таблица 6. Подготовка на реакционна смес

RT-PCR реакционна смес			Брой реакции Обем (µL)	
Реактиви	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	96 реакции (+20% допълнителен обем*)
Смес SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Общ реакционен обем		–	15,00	1728

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и SARS-CoV-2 Amp Primers според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

6. Разпределете 8 µL вода без нуклеаза в ямката, определена за NEC.
7. Заредете 10 µL вода без нуклеаза в ямката, определена за NTC.

8. Разпределете 2 μL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer във всяка ямка, определена за NEC и към подготвените аликвотни части.
9. Добавете 8 μL от приготвената аликвотна част в ямка, съдържаща SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
10. Добавете 15 μL от реакционната смес, приготвена в стъпка 5, към ямките, предназначени за аликвотни части и контроли (вижте примера на Фигура 3). Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
11. Заредете 10 μL от SARS-CoV-2 Positive Control в съответната ямка. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
12. Запечатайте ямката за PCR, за да предотвратите кръстосано замърсяване. Уверете се, че прилагате равномерен натиск върху цялата плака, за да получите плътно запечатване на отделните ямки.
13. Центрофугирайте за кратко плаката за PCR, за да съберете течността в дъното на ямката.
14. Настройте програмата за real-time RT-PCR на апарата ABI 7500 Fast Dx в режим за изпълнение "Standard 7500" Run Mode съгласно Таблица 7.

Забележка: След като щракнете върху **file** (файл) и **new** (нов), проверете дали анализът е **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Стандартна крива (Абсолютно количествено определяне)), а режимът за изпълнение е зададен като **Standard 7500**. Изберете като луминофори FAM, VIC и Cy5, с Quencher, зададен на **None**, и данните трябва да бъдат получени с **ROX** като **passive reference** (пасивен референтен еталон).

Забележка: Събирането на данни трябва да се извърши по време на етапа на температурна обработка/удължаване.

Забележка: За повече подробности вижте *Инструкциите за експлоатация на ABI 7500 Fast Dx*.

15. Поставете плаката в апарата за циклична обработка в реално време (пример за разположението на плаката за PCR е представен на Фигура 3 и стартирайте програмата за циклична обработка, както е описано в Таблица 7).

16. Изберете използваните ямки и приложете репортерите FAM, VIC и Cy5. Данните трябва да бъдат получени с **ВКЛЮЧЕН** ROX пасивен оцветител.
17. Проверете дали стандартната крива на ABI 7500 Fast Dx е конфигурирана за абсолютно количествено определяне.
18. Стартирайте изпълнението на работния цикъл.
19. В края на цикъла анализирайте резултатите (вижте раздела Резултати).

Таблица 7. Програма SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Стъпки	Време	Температура (°C)	Брой цикли	Получаване
Обратна транскрипция	10 мин	50	1	Не
PCR първоначално топлинно активиране	2 мин	95	1	Не
2-стъпкова циклична обработка				
Денатуриране	5 сек	95	40	Не
Топлинна обработка/Удължаване	30 сек	58		

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

Фигура 3. Пример за разположението на плака в ABI 7500 Fast Dx

Протокол: Подготовка на аликвотна част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат CFX96 Dx

Този протокол е за подготовка и откриване на цели на SARS-CoV-2 в човешки назални, назофарингеални, орофарингеални тампони, съхранявани в транспортни среди и в аликвотни части от неразредена слюнка на апарат CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., кат. № 1845097-IVD. (модул за оптична реакция) и 1841000-IVD (модул за термичен цикъл) със софтуер CFX Manager Dx версия 3.1.309001022 или по-нова).

Важни моменти преди да започнете

- Проверете дали са спазени сроковете на годност и условията на съхранение, отпечатани върху кутията и всички етикети на компоненти. Не използвайте неправилно съхранявани компоненти или такива с изтекъл срок на годност.
- Използвайте добре поддържано и калибрирано оборудване.
- По време на експеримента вземете мерки за предотвратяване на замърсяване с RNases и използвайте пластмасови съдове без съдържание на нуклеаза.

Неща, които да направите, преди да започнете

- По време на етапите на подготовка на реакцията респираторните аликвотни части могат да бъдат съхранявани при стайна температура (15 – 25 °C), но се препоръчва те да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C.
- Аликвотни части от слюнка могат да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C, но по време на етапите на подготовка и настройка на реакцията се препоръчва да се съхраняват при стайна температура (15 – 25 °C).

- Преди употреба, оставете SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, водата за NTC и SARS-CoV-2 Positive Control да се размразят напълно на стайна температура. До момента на използване съхранявайте епруветките при стайна температура и защитени от светлина.
- Преди употреба хомогенизирайте SARS-CoV-2 UM Prep Buffer UM и SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, като ги обърнете 2 – 3 пъти (не разбърквайте с вортекс), последвано от кратко центрофугиране. Всички други отделни реактиви могат да бъдат хомогенизирани чрез импулсно разбъркване с вортекс за 3 – 5 секунди или чрез обърщане 2 – 3 пъти, последвано от кратко центрофугиране.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer инхибира RNases, присъстващи в клиничните аликвотни части за етапа на откриване, но не е разтвор, инактивиращ вируса. Всички аликвотни части трябва да се третират като потенциално опасни.
- Проверете дали условията за циклична обработка на платформата за real-time RT-PCR са такива, като посочените в този протокол.
- За избягване на множество цикли замразяване-размразяване, реактивите могат да бъдат разпределени на аликвотни части.
- Пригответе прясна реакционна смес (< 2 часа преди пускане на плаката за PCR).
- За свеждане на замърсяването до минимум, подготовката на аликвотната част и real-time RT-PCR трябва да се извършва в отделни зони.

Процедура:

Подготовка на аликвотни части: За проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони), следвайте стъпка 1. За проби от слюнка преминете към стъпка 2.

1. Проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони):
 - 1а. Разбъркайте енергично с вортекс тампона, съдържащ аликвотната част

- 1b. Разпределете алиquotна част от 50 – 200 μL проба в 1,5 mL епруветки PCR-free
 - 1c. Изпълнете стъпка за нагряване при 70 °C за 10 минути върху нагревателен блок.
 - 1d. Охладете алиquotните части върху лед за поне 5 минути, след което съхранявайте алиquotните части върху лед или при 4 °C.
2. Алиquotни части от слюнка:
- 2a. Втечняване (за улесняване на пипетирането): алиquotната част от слюнка се загрява при 95 °C за 15 минути (неуточнен обем, контейнер или нагревателно устройство).
 - 2b. Хомогенизирайте алиquotната част, като внимателно пипетирате и отпипетирате 8 – 10 пъти.
 - 2c. Разпределете 50 μL от алиquotната част в 1,5 mL епруветка PCR-free.
 - 2d. Изпълнете стъпка за нагряване при 95 °C за 15 минути върху нагревателен блок. След това задръжте алиquotната част при поне 5 мин при стайна температура, докато бъде заредена в ямка или епруветка за PCR.
3. При първо използване, завършете SARS-CoV-2 UM Amp Buffer с ROX Reference Dye.
- 3a. Добавете 32,8 μL от оцветителя ROX в 1 епруветка със SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Затворете капачето на епруветката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и оцветителя ROX и обърнете епруветката 3 пъти.
 - 3c. Центрофугирайте епруветката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, и оцветител ROX в дъното на епруветката.
4. За пълна плака CFX96 Dx (96 ямки), пригответе алиquotна смес от SARS-CoV-2 Amp Primers със SARS-CoV-2 Internal Control.
- 4a. Прехвърлете необходимите обеми от SARS-CoV-2 Amp Primers и SARS-CoV-2 Internal Control съгласно Таблица 8 в нова епруветка PCR-free от 1,5 mL.
 - 4b. Затворете капачето и обърнете епруветката 3 пъти или разбъркайте импулсно с вортекс съдържанието на епруветката за 3 – 5 сек.
 - 4c. Центрофугирайте SARS-CoV-2 Amp Primers, съдържащи IC, за да придвижите разтвора на дъното на епруветката.

Таблица 8. Подготвяне на смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Брой реакции Обем (µL)	
Реактиви	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	96 реакции (+ 20% допълнителен обем*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2	
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µL	10 cp/µL	1,5	172,8	
Общо смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008	

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 Amp Primers и на SARS-CoV-2 Internal Control според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

- Пригответе реакционна смес съгласно Таблица 9 и разбъркайте старателно, като обърнете епруветката 3 пъти.

Таблица 9. Подготовка на реакционна смес

RT-PCR реакционна смес				Брой реакции Обем (µL)	
Реактиви	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	96 реакции (+20% допълнителен обем*)	
Смес SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720	
Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008	
Общ реакционен обем			15,00	1728	

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и SARS-CoV-2 Amp Primers според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

- Разпределете 8 µL вода без нуклеаза в ямката, определена за NEC.
- Заредете 10 µL вода без нуклеаза в ямката, определена за NTC.
- Разпределете 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer във всяка ямка, определена за NEC и към подготвените аликвотни части.
- Добавете 8 µL от приготвената аликвотна част в ямка, съдържаща SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.

10. Добавете 15 µL от реакционната смес, приготвена в Стъпка 5, към ямките, предназначени за аликвотни части и контроли (Фигура 4 е предоставена като пример). Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
11. Заредете 10 µL от SARS-CoV-2 Positive Control в съответната ямка. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
12. Запечатайте ямката за PCR, за да предотвратите кръстосано замърсяване. Уверете се, че прилагате равномерен натиск върху цялата плака, за да получите плътно запечатване на отделните ямки.
13. Центрофугируйте за кратко плаката за PCR, за да съберете течността в дъното на ямката.
14. В софтуера **CFX Manager Dx Software > Startup Wizard** (Съветник за стартиране), под **run type** (тип работен цикъл ()), изберете **user defined** (потребителски дефиниран).
15. Раздел **Protocol** (Протокол): Задайте real-time RT-PCR програма, съгласно Таблица 10, за реактивен обем 25 µL.
Забележка: В прозореца на **Protocol Editor** (Редактор на протоколи) щракнете върху бутона **Step Options** (Опции за стъпка), за да регулирате скоростта на нарастване до 1,6 °C/сек във всяка от 4-те стъпки на програмата RT-PCR.
Забележка: Събирането на данни трябва да се извърши по време на етапа на температурна обработка/удължаване.
Забележка: За повече подробности вижте *Инструкциите за експлоатация на CFX96 Dx*.
16. Раздел **Plate** (Плака): Изберете използваните ямки и приложете репортерите FAM, HEX и Cy5.
17. Поставете плаката в апарата за циклична обработка в реално време (пример за разположението на плаката за PCR е представен на Фигура 4).
18. Раздел **Start Run** (Стартиране на работен цикъл): щракнете върху Start the run (Стартиране на работния цикъл).
19. В края на цикъла анализирайте резултатите (вижте раздел Results).

Таблица 10. Програма SARS-CoV-2 Prep&Amp UM за CFX96 Dx

Стъпки	Време	Температура (°C)	Скорост на изменение (°C/сек)	Брой повторения	Получаване
1. Обратна транскрипция	10 мин	50	1,6	1	Не
2. PCR първоначално топлинно активиране	2 мин	95	1,6	1	Не
2-стъпкова циклична обработка				39*	
Денатуриране	5 сек	95	1,6	1	Не
Топлинна обработка/Удължаване	30 сек	58	1,6	1	FAM, HEX и Cy5

*CFX работи с повторения. За да изпълни програмата 40 цикъла, трябва да бъдат зададени 39 повторения за циклична обработка в две стъпки (като Стъпка 5 "GOTO" на софтуера).

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

Фигура 4. Пример за разположението на плака в CFX96 Dx

Протокол: Подготовка на аликвотна част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат cobas z 480

Този протокол описва подготовката на аликвотна част за real-time RT-PCR за откриване на целеви SARS-CoV-2 в човешки назални, назофарингеални или орофарингеални тампони, съхранявани в транспортни среди и в аликвотни части от неразредена слюнка на апарат cobas z 480 със софтуер LightCycler 480 SW UDF версия 2.0.0 (или по-нова).

Важни моменти преди да започнете.

- Проверете дали са спазени сроковете на годност и условията на съхранение, отпечатани върху кутията и всички етикети на компоненти. Не използвайте неправилно съхранявани компоненти или такива с изтекъл срок на годност.
- Използвайте добре поддържано и калибрирано оборудване.
- По време на експеримента вземете мерки за предотвратяване на замърсяване с RNases и използвайте пластмасови съдове без съдържание на нуклеаза.

Неща, които да направите, преди да започнете.

- По време на етапите на подготовка на реакцията респираторните аликвотни части могат да бъдат съхранявани при стайна температура, но се препоръчва те да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C.
- Аликвотни части от слюнка могат да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C, но по време на етапите на подготовка и настройка на реакцията се препоръчва да се съхраняват при стайна температура (15 – 25 °C).

- Преди употреба, оставете SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, водата за NTC и SARS-CoV-2 Positive Control да се размразят напълно на стайна температура (15 – 25 °C). До момента на използване съхранявайте епруветките при стайна температура и защитени от светлина.
- Преди употреба хомогенизирайте SARS-CoV-2 UM Prep Buffer UM и SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, като ги обърнете 2 – 3 пъти (не разбърквайте с вортекс), последвано от кратко центрофугиране. Всички други отделни реактиви могат да бъдат хомогенизирани чрез импулсно разбъркване с вортекс за 3 – 5 секунди или чрез обърщане 2 – 3 пъти, последвано от кратко центрофугиране.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer инхибира RNases, присъстващи в клиничните аликвотни части за етапа на откриване, но не е разтвор, инактивиращ вируса. Всички аликвотни части трябва да се третират като потенциално опасни.
- Проверете дали условията за циклична обработка на платформата за real-time RT-PCR са такива, като посочените в този протокол.
- За избягване на множество цикли замразяване-размразяване, реактивите могат да бъдат разпределени на аликвотни части.
- Пригответе прясна реакционна смес (< 2 часа преди пускане на плаката за real-time RT-PCR).
- За свеждане на замърсяването до минимум, подготовката на аликвотната част и real-time RT-PCR трябва да се извършва в отделни зони.

Процедура:

Подготовка на аликвотни части: За проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони), следвайте стъпка 1. За проби от слюнка преминете към стъпка 2.

1. Проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони):
 - 1а. Разбъркайте енергично с вортекс тампона, съдържащ аликвотната част.

- 1b. Разпределете аликвотна част от 50 – 200 µL проба в 1,5 mL епруветки PCR-free
 - 1c. Изпълнете стъпка за нагряване при 70 °C за 10 минути върху нагревателен блок.
 - 1d. Охладете аликвотните части върху лед за поне 5 минути, след което съхранявайте аликвотните части върху лед или при 4 °C.
2. Аликвотни части от слюнка:
- 2a. Втечняване (за улесняване на пипетирането): аликвотната част от слюнка се загрява при 95 °C за 15 минути (неуточнен обем, контейнер или нагревателно устройство).
 - 2b. Хомогенизирайте аликвотната част, като внимателно пипетирате и отпипетирате 8 – 10 пъти.
 - 2c. Разпределете аликвотна част от 50 µL проба в 1,5 mL епруветка PCR-free.
 - 2d. Изпълнете стъпка за нагряване при 95 °C за 15 минути върху нагревателен блок, след което аликвотната част се държи поне 5 мин при стайна температура, докато бъде заредена в ямка или епруветка за PCR.
3. При първо използване, завършете SARS-CoV-2 UM Amp Buffer с ROX Reference Dye.
- 3a. Добавете 32,8 µL от оцветителя ROX в 1 епруветка със SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Затворете капачето на епруветката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и оцветителя ROX и обърнете епруветката 3 пъти.
 - 3c. Центрофугирайте епруветката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, и оцветител ROX в дъното на епруветката.
4. За пълна плака sobas z 480 (96 ямки), пригответе аликвотна смес от SARS-CoV-2 Amp Primers със SARS-CoV-2 Internal Control.
- 4a. Прехвърлете необходимите обеми от SARS-CoV-2 Amp Primers и SARS-CoV-2 Internal Control съгласно Таблица 11 в нова епруветка PCR-free от 1,5 mL.
 - 4b. Затворете капачето и обърнете епруветката 3 пъти или разбъркайте импулсно с вортекс съдържанието на епруветката за 3 – 5 сек.
 - 4c. Центрофугирайте SARS-CoV-2 Amp Primers, съдържащи IC, за да придвижите разтвора на дъното на епруветката.

Таблица 11. Подготвяне на смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Брой реакции	Обем (µL)
Реактиви	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	96 реакции	
				(+ 20% допълнителен обем*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2	
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µL	10 cp/µL	1,5	172,8	
Общо смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008	

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 Amp Primers и на SARS-CoV-2 Internal Control според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

- Пригответе реакционна смес съгласно Таблица 12 и разбъркайте старателно, като обърнете епруветката 3 пъти.

Таблица 12. Подготовка на реакционна смес

RT-PCR реакционна смес				Брой реакции	Обем (µL)
Реактиви	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	96 реакции	
				(+20% допълнителен обем*)	
Смес SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720	
Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008	
Общ реакционен обем		–	15,00	1728	

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и SARS-CoV-2 Amp Primers според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

- Разпределете 8 µL вода без нуклеаза в ямката, определена за NEC.
- Заредете 10 µL вода без нуклеаза в ямката, определена за NTC.
- Разпределете 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer във всяка ямка, определена за NEC и към подготвените аликвотни части.
- Добавете 8 µL от приготвената аликвотна част в ямка, съдържаща SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.

10. Добавете 15 µL от реакционната смес, приготвена в Стъпка 5, към ямките, предназначени за алиquotни части и контроли (Фигура 5 е предоставена като пример). Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
11. Заредете 10 µL от SARS-CoV-2 Positive Control в съответната ямка. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
12. Запечатайте ямката за PCR, за да предотвратите кръстосано замърсяване. Уверете се, че прилагате равномерен натиск върху цялата плака, за да получите плътно запечатване на отделните ямки.
13. Центрофугирайте за кратко плаката за PCR, за да съберете течността в дъното на ямката.
14. **Първа употреба:** В софтуера Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0 щракнете върху **open tools** (отваряне на инструменти) и изберете **detection formats**(формати за откриване), за да зададете следните комбинации възбуждане-излъчване: 465 – 510 (FAM), 540 – 580 (HEX) и 610 – 670 (ATTO647N).
15. Задайте real-time RT-PCR програма, съгласно Таблица 13, за реактивен обем 25 µL.
Забележка: В горната част на страницата изберете **detection format** (формат за откриване), за да изберете формата за откриване, създаден в Стъпка 14.
Забележка: Използвайте custom (персонализирана) скорост на изменение от 1,6°C/сек във всяка от 5-те стъпки за real-time RT-PCR програмата.
Забележка: Събирането на данни трябва да се извърши по време на етапа на температурна обработка/удължаване.
Забележка: За повече подробности вижте *Инструкциите за експлоатация на cobas z 480*.
16. Поставете плаката в апарата за циклична обработка в реално време (пример за разположението на плаката за PCR е представен на Фигура 5).
17. Стартирайте изпълнението на работния цикъл.
18. В края на цикъла анализирайте резултатите (вижте раздел Results).

Таблица 13. Програма SARS-CoV-2 Prep&Amp UM за cobas z 480

Стъпки	Време	Температура (°C)	Скорост на изменение (°C/сек)	Брой цикли	Режим за анализ
Обратна транскрипция	10 мин	50	1,6	1	Няма
PCR първоначално топлинно активиране	2 мин	95	1,6	1	Няма
2-стъпкова циклична обработка				40	Количествено определяне
Денатуриране	5 сек	95	1,6		Няма
Топлинна обработка/Удължаване	30 сек	58	1,6		Единичен
Охлаждане	1 мин	37	1,6	1	Няма

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

Фигура 5. Пример за разположение на плаки в cobas z 480

Протокол: Подготовка на алиquotната част и откриване на SARS-CoV-2 на апарат QuantStudio 5 Dx

Този протокол е предназначен за подготовка и откриване на SARS-CoV-2 цели в човешки назални, назофарингеални или орофарингеални тампони, съхранявани в транспортна среда и в алиquotни части от неразредена слюнка с real-time RT-PCR на апарат QuantStudio 5 Dx.

Важни моменти преди да започнете.

- Проверете дали са спазени сроковете на годност и условията на съхранение, отпечатани върху кутията и всички етикети на компоненти. Не използвайте неправилно съхранявани компоненти или такива с изтекъл срок на годност.
- Използвайте добре поддържано и калибрирано оборудване.
- По време на експеримента вземете мерки за предотвратяване на замърсяване с RNases и използвайте пластмасови съдове без съдържание на нуклеаза.
- Когато използвате QuantStudio 5 Dx, преди първата употреба трябва да се добави ROX Dye към основната епруветка за смесване.

Неща, които да направите, преди да започнете

- По време на етапите на подготовка на реакцията респираторните алиquotни части могат да бъдат съхранявани при стайна температура, но се препоръчва те да се съхраняват върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C.
- Алиquotна част от слюнка може да се съхранява върху лед или върху охладителна решетка при 4 °C, но по време на етапите на подготовка и настройка на реакцията се препоръчва да се съхранява при стайна температура (15 – 25 °C).
- При използване на апарат QuantStudio 5 е необходим оцветител ROX.

- Преди употреба, оставете SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, вода за NTC и SARS-CoV-2 Positive Control да се размразят напълно при (15 – 25 °C). До момента на използване съхранявайте епруветките при стайна температура и защитени от светлина.
- Преди употреба хомогенизирайте SARS-CoV-2 UM Prep Buffer UM и SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, като ги обърнете 2 – 3 пъти (не разбърквайте с вортекс), последвано от кратко центрофугиране. Всички други отделни реактиви могат да бъдат хомогенизирани чрез импулсно разбъркване с вортекс за 3 – 5 секунди или чрез обръщане 2 – 3 пъти, последвано от кратко центрофугиране.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer инхибира RNases, присъстващи в клиничните аликвотни части за етапа на откриване, но не представлява разтвор, инактивиращ вируса. Всички аликвотни части трябва да се третират като потенциално опасни.
- Проверете дали условията за циклична обработка на платформата за real-time RT-PCR са такива, като посочените в този протокол.
- За избягване на множество цикли замразяване-размразяване, реактивите могат да бъдат разпределени на аликвотни части.
- Пригответе прясна реакционна смес (< 2 часа преди пускане на плаката за real-time RT-PCR).
- За свеждане на замърсяването до минимум, подготовката на аликвотната част и real-time RT-PCR трябва да се извършва в отделни зони.

Процедура

Подготовка на аликвотни части: За проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони), следвайте стъпка 1. За проби от слюнка преминете към стъпка 2.

1. Проби от дихателните пътища (назални, орофарингеални и назофарингеални тампони):
 - 1а. Разбъркайте енергично с вортекс тампона, съдържащ аликвотната част.

- 1b. Разпределете аликвотна част от 50 – 200 μL проба в 1,5 mL епруветки PCR-free
 - 1c. Изпълнете стъпка за нагряване при 70 °C за 10 минути върху нагревателен блок.
 - 1d. Охладете аликвотните части върху лед за поне 5 минути, след което съхранявайте аликвотните части върху лед или при 4 °C.
2. Аликвотни части от слюнка:
- 2a. Втечняване (за улесняване на пипетирането): аликвотната част от слюнка се загрява при 95 °C за 15 минути (неуточен обем, контейнер или нагревателно устройство).
 - 2b. Хомогенизирайте аликвотната част, като внимателно пипетирате и отпипетирате 8 – 10 пъти.
 - 2c. Разпределете аликвотна част от 50 μL проба в 1,5 mL епруетка PCR-free.
 - 2d. Изпълнете стъпка за нагряване при 95 °C за 15 минути върху нагревателен блок, след което аликвотната част се държи поне 5 мин при стайна температура, докато бъде заредена в ямка или епруетка за PCR.
3. При първо използване, завършете SARS-CoV-2 UM Amp Buffer с ROX Reference Dye.
- 3a. Добавете 32,8 μL от оцветителя ROX в епруетка със SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Затворете капачето на епруетката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и оцветителя ROX и обърнете епруетката 3 пъти.
 - 3c. Центрофугирайте епруетката, съдържаща SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, и оцветител ROX в дъното на епруетката.
4. За пълна плака QuantStudio 5 Dx (96 ямки), пригответе аликвотна смес от SARS-CoV-2 Amp Primers със SARS-CoV-2 Internal Control.
- 4a. Прехвърлете необходимите обеми от SARS-CoV-2 Amp Primers и SARS-CoV-2 Internal Control съгласно Таблица 14 в нова епруетка PCR-free от 1,5 mL.
 - 4b. Затворете капачето и обърнете епруетката 3 пъти или разбъркайте импулсно с вортекс съдържанието на епруетката за 3 – 5 сек.
 - 4c. Центрофугирайте SARS-CoV-2 Amp Primers, съдържащи IC, за да придвижите разтвора на дъното на епруетката.

Таблица 14. Подготвяне на смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Брой реакции Обем (µL)	
Реактиви	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	96 реакции (+ 20% допълнителен обем*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2	
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µL	10 cp/µL	1,5	172,8	
Общо смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008	

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 Amp Primers и на SARS-CoV-2 Internal Control според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

- Пригответе реакционна смес съгласно Таблица 15 и разбъркайте старателно, като обърнете епруветката 3 пъти.

Таблица 15. Подготовка на реакционна смес

RT-PCR реакционна смес				Брой реакции Обем (µL)	
Реактиви	Начална концентрация	Крайна концентрация	1 реакция	96 реакции (+20% допълнителен обем*)	
Смес SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720	
Смес SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008	
Общ реакционен обем		–	15,00	1728	

* **Забележка:** Коригирайте обема на SARS-CoV-2 UM Amp Buffer и SARS-CoV-2 Amp Primers според броя аликвотни части, които ще бъдат тествани. Предвидете допълнителен обем, за да компенсирате мъртвия обем.

- Разпределете 8 µL вода без нуклеаза в ямката, определена за NEC.
- Заредете 10 µL вода без нуклеаза в ямката, определена за NTC.
- Разпределете 2 µL SARS-CoV-2 UM Prep Buffer във всяка ямка, определена за NEC и към подготвените аликвотни части.
- Добавете 8 µL от приготвената аликвотна част в ямка, съдържаща SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.

10. Добавете 15 μL от реакционната смес, приготвена в Стъпка 5, към ямките, предназначени за алиquotни части и контроли (Фигура 6 е предоставена като пример). Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
11. Заредете 10 μL от SARS-CoV-2 Positive Control в съответната ямка. Смесете чрез пипетиране/отпипетиране 5 пъти.
12. Запечатайте ямката за PCR, за да предотвратите кръстосано замърсяване. Уверете се, че прилагате равномерен натиск върху цялата плака, за да получите плътно запечатване на отделните ямки.
13. Центрофугируйте за кратко плаката за PCR, за да съберете течността в дъното на ямката.
14. **Първа употреба:** Преди започване на работния цикъл в софтуера QuantStudio 5 Dx IVD, еталонът трябва да бъде генериран в софтуер QuantStudio 5 Dx TD версия 1.0.1 или по-висока. Задайте еталона по следния начин:
 - Забележка:** В раздела **Properties** (Свойства), конфигурирайте **Experiment type** (Вид експеримент) на **Standard Curve** (Стандартна крива) и **Run mode** (Режим на изпълнение) като **Standard** (Стандартен).
 - Забележка:** В раздела **Method** (Метод) задайте програма за real-time RT-PCR за реакционен обем от 25 μL (Таблица 16).
 - Забележка:** Събирането на данни трябва да се извърши по време на етапа на температурна обработка/удължаване.
 - Забележка:** В раздела **Plate** (Плака) изберете **ROX** като **Passive Reference** (Пасивен референтен еталон) и задайте FAM, VIC и Cy5 като цели без гасител (изберете **None** (Няма)).
 - Забележка:** За повече подробности вижте *Инструкциите за експлоатация на QuantStudio 5 Dx*.
15. В софтуера QuantStudio 5 Dx IVD, заредете еталона, създаден по-рано в стъпка 14. Изберете използваните ямки и приложете целите FAM, VIC и Cy5.
16. Поставете плаката в апарата за циклична обработка в реално време (пример за разположението на плаката за PCR е представен на Фигура 6).
17. Стартирайте изпълнението на работния цикъл.
18. В края на цикъла анализирайте резултатите (вижте раздел Results).

Таблица 16. Програма SARS-CoV-2 Prep&Amp UM за апарат QuantStudio 5 Dx

Етап	Стъпка	Време	Температура (°C)	Брой цикли	Получаване
Hold (Задържане)	1. Обратна транскрипция	10 мин	50	1	Не
	2. PCR първоначално топлинно активиране	2 мин	95	1	Не
PCR	2-стъпкова циклична обработка			40	
	Денатуриране	5 сек	95	1	Не
	Топлинна обработка/Удължаване	30 сек	58	1	FAM, VIC и Cy5

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

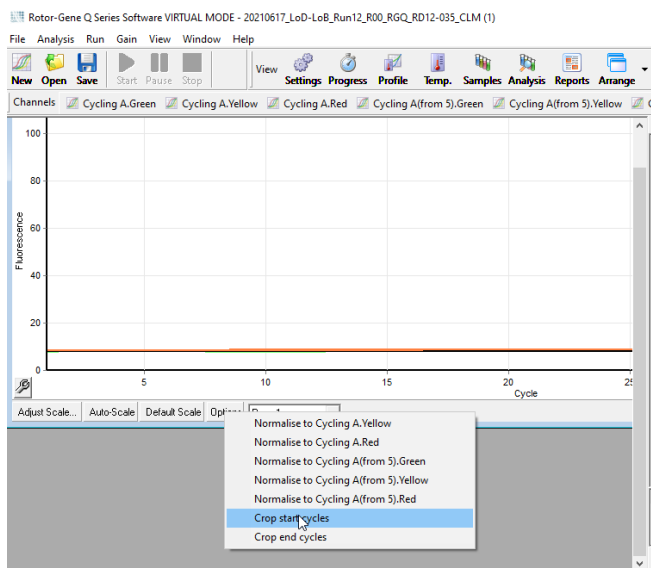
Фигура 6. Пример за разположението на плака в апарат QuantStudio 5 Dx

Резултати

Анализ на апарат RGQ MDx 5plex HRM

На апарат RGQ MDx 5plex HRM данните се анализират със софтуер Rotor-Gene Q версия 2.3.1 (или по-нова) в съответствие с инструкциите на производителя (Ръководство за потребителя на Rotor-Gene Q MDx, Редакция 7, септември 2018 г.).

За анализ на данните трябва да се използва т.нар. **stop cycles** (цикъл за култури) (Фигура 7): Отворете необработения канал **Cycling A. Green**. Отидете на **Options** (Опции) > **Crop Start Cycles** (Стартови цикли за култури) и въведете **5** в диалоговия прозорец. Ще бъде генериран нов канал, наречен **Cycling A** (от **5**).**Green**. Същото трябва да се направи за необработените канали Red и Yellow за генериране на канали **Cycling A(from 5).Red** и **Cycling A(from 5).Yellow**.



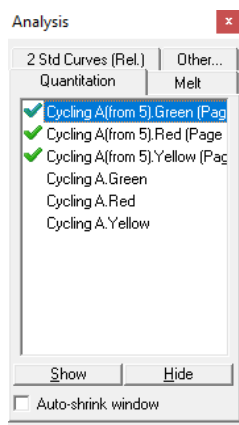
Фигура 7. Екранна снимка на настройка на **stop cycles** (цикли за култури) за анализи на апарат RGQ MDx 5plex HRM

Отворете менюто за анализ (Фигура 8) и за всеки генериран канал Cycling A(from 5) приложете следните параметри за анализ, за да поддържате съгласуваност между различните анализи (Таблица 17).

Таблица 17. Параметри за анализ на апарат RGQ MDx 5plex HRM

Канали	Green	Red	Yellow
Праг на флуоресценция	0,03	0,03	0,03
Корекция на наклона	Да	Да	Да
Dynamic tube	Да	Да	Да
Отправна точка	Не	10 – 20	10 – 20
Отстраняване на рязко отклоняващи се стойности: Праг на реакционна ефективност	Да Активен 0%	Не	Не
Цикли със съкратен старт	5	5	5
Гранични цикли	Ct > 38,00 се приема като 40,00	Не	Ct > 35,00 се приема като 40,00

В софтуера RGQ, резултатите от изпълнението са представени в таблица с количествени резултати, отворена по време на анализа. Данните могат да бъдат експортирани в текстов формат (.csv) стойности с разделяне със запетая: За целта в прозореца RGQ Software изберете **File** (Файл) > **save as** (Запазване) > **Excel analysis sheet** (Запазване като аналитична таблица Excel). Преди да експортирате резултатите се уверете, че са избрани всички аликувотни части (Фигура 8).



Фигура 8. Екранна снимка на избрани канали за прилагане на параметрите за анализ и експортиране на резултати (анализ на работен цикъл на RGQ MDx 5plex HRM).

Анализ на ABI 7500 Fast Dx

На ABI 7500 Fast Dx данните се анализират със софтуер 7500 Fast System Software версия 1.4.1 (или по-нова) съгласно инструкциите на производителя. В раздела **setup** (настройка) изберете група ямки или цялата налична плака в анализа и щракнете с десния бутон, за да отворите прозорците за инспектор на ямка. Трябва да бъдат избрани 3-те флуорофора (FAM, VIC и Cy5), а **ROX** трябва да бъде избран като **Passive reference** (Пасивен референтен еталон). За съгласуваност между различните анализи са необходими следните параметри (Таблица 18).

Таблица 18. Параметри за анализ на апарат ABI 7500 Fast Dx

Канали	FAM	Cy5	VIC
Пасивен оцветител	ROX	ROX	ROX
Праг на флуоресценция	0,13	0,025	0,05
Зададено базово ниво	Авто	Авто	Авто
Гранични цикли	Ct > 39,00 се приема като 40,00	Не	Ct > 35,00 се приема като 40,00

В софтуера ABI SDS стойностите на Ct за избрана група ямки или цялата плака се представят в таблицата с **data** (данни) в основния раздел **Results** (Резултати). Данните могат да бъдат експортирани в текстов формат (.csv) стойности с разделяне със запетая: В прозореца на софтуера SDS изберете **File** (Файл) > **Export** (Експорт) > **Results** (Резултати) (възможно е да бъде избран и елемента **Ct** от менюто). Изберете формата на експортирания файл като .csv.

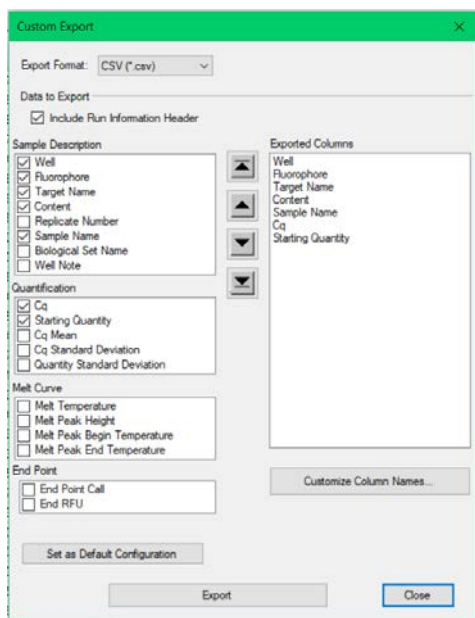
Анализ на апарат CFX96 Dx

На апарата CFX96 Dx данните се анализират със софтуера CFX Manager Dx версия 3.1.3090.1022 (или по-нова) съгласно инструкциите на производителя. За всички ямки, използвани в експеримента трябва да бъдат избрани FAM, HEX и Cy5. За съгласуваност между различните анализи са необходими следните параметри (Таблица 19).

Таблица 19. Параметри за анализ на апарат CFX96 Dx

Канали	FAM	HEX	Sy5
Режим на определяне на Cq: Единичен праг	Да	Да	Да
Зададено базово ниво:			
• съответствие на извадена крива	Да	Да	Да
• Прилагане на корекция за отклонение във флуоресценцията	Да	Да	Да
Праг (RFU)	250	300	100
Гранични цикли	Ct > 39,00 се приема като 40,00	Ct > 35,00 се приема като 40,00	Не

В софтуера CFX manager Dx стойностите на Ct (наречени **Cq** в софтуера) на избрана група ямки или на цялата плака са представени в електронна таблица с данни в раздела **Quantification Data** (Данни за количествено определяне). Данните могат да бъдат експортирани в текстов формат (.csv) със стойности, разделени със запетая, като изберете **Export** (Експорт) > **Custom Export** (Персонализирано експортиране) и зададете параметри в съответствие с Фигура 9.



Фигура 9. Параметри на файл с необработени данни за CFX96 Dx

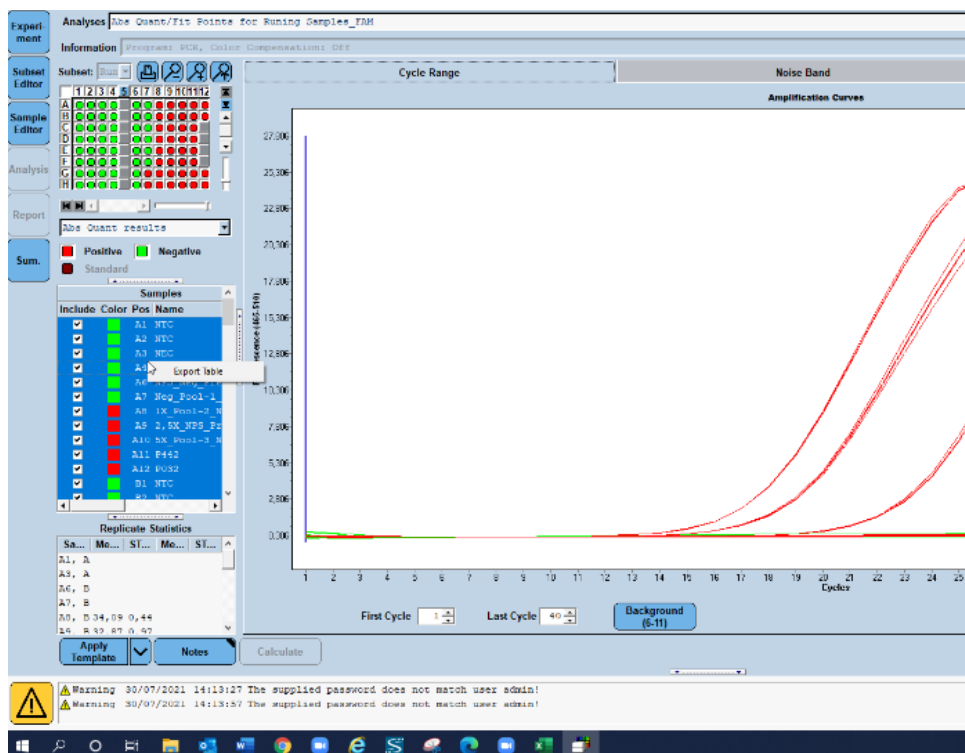
Анализ на апарат cobas z 480

На апарата cobas z 480 данните се анализират със софтуер LightCycler 480 SW UDF версия 2.0.0 (или по-нова) съгласно инструкциите на производителя. Създайте подмножество от алиquotни части, само с ямките, използвани в експеримента. За всеки канал създайте страница за абсолютно количествено определение/възлови точки **Abs Quant/Fit Points Analysis** и използвайте следните параметри за съгласуваност между различните експерименти (Таблица 20).

Таблица 20. Параметри за анализ на апарат cobas z 480

Канали	FAM (465 – 510)	HEX (540 – 580)	ATTO647N (610 – 670)
Поле за диапазон на цикъла	1 – 40	1 – 40	6 – 40
• Първи-последен цикъл			
• Фон	5/10	5/10	6/11
Раздел Лента на шума			
• Метод	STD Multiplier	STD Multiplier	STD Multiplier
• Стойност STD Multiplier	50	40	25
Раздел Анализ	2	2	2
• Възлови точки			
• Метод за определяне на прага	Авто	Авто	Авто
Граничен цикъл	Ct > 39,00 се приема като 40,00	Ct > 35,00 се приема като 40,00	Не

В LightCycler 480 SW UDF версия 2.0.0 (или по-нова), стойностите на Ct (наричани **Cp** в софтуера) на избрана група ямки или цялата плака са налични в раздел **analysis** (анализ) (Фигура 10). Данните могат да бъдат експортирани в текстов файл (.txt) за всеки канал, като щракнете с десния бутон върху таблицата с резултати и изберете **Export table** (Експортиране на таблица).



Фигура 10. Екранна снимка на експортирани данни в LightCycler 480 SW UDF версия 2.0.0 (или по-нова).

Анализ на QuantStudio 5 Dx

На QuantStudio 5 Dx данните се анализират с QuantStudio 5 Dx IVD софтуер версия 1.0.1 (или по-нова) съгласно инструкциите на производителя. В прозореца **Assign Targets and Samples** (Присвояване на цели и аликвотни части) трите флуорофора (FAM, VIC и Cy5) трябва да бъдат избрани за всички ямки, използвани в експеримента, а **ROX** трябва да бъде избран като **Passive reference** (Пасивен референтен еталон). За съгласуваност между различните анализи са необходими следните параметри (Таблица 21).

Таблица 21. Параметри за анализ за QuantStudio 5 Dx

Канали	FAM	VIC	Cy5
Пасивен оцветител	ROX	ROX	ROX
Праг на флуоресценция	0,21	0,062	0,04
Зададено базово ниво	Авто	Авто	Авто
Гранични цикли	Ct > 39,00 се приема като 40,00	Ct > 35,00 се приема като 40,00	Не

Данните могат да бъдат експортирани като електронна таблица или текст (.xls, .xlsx, .txt). В раздела **Export** (Експорт) на прозореца на софтуера QuantStudio 5 Dx IVD изберете всички опции в раздела **content** (съдържание) и изберете опцията **unify the above content into one file** (обединяване на горното съдържание в един файл).

Интерпретиране на резултатите

Положителната контрола (PC), гените N1 и N2 се откриват във флуоресцентния канал Green с RGQ MDx 5plex HRM или във флуоресцентния канал FAM на ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 и QuantStudio 5 Dx.

Контролът за вземане на аликвотни части, съставен от RNase P, се открива в жълтия флуоресцентен канал с RGQ MDx 5plex HRM или във флуоресцентната VIC/HEX с ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 и QuantStudio 5 Dx. Всяка клинична аликвотна част трябва да показва контролно амплификация на аликвотната част. В положителната контрола (PC) може да се види амплификация Yellow въпреки отсъствието на човешки секвенции. В този случай сигнал в канал Yellow на положителна контрола (PC) може да бъде пренебрегнат, тъй като силният флуоресцентен сигнал в канал Green може да кърви в канал Yellow. Вътрешната контрола (IC) е включен в SARS-CoV-2 Amp Primers. Той се открива в контрола без еталон (NTC), контрола без извличане (NEC), положителната контрола (PC) и клиничните аликвотни части с флуоресцентен канал Red с RGQ MDx 5plex HRM или във флуоресцентния канал Cy5/ATTO647N с ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 и QuantStudio 5 Dx. За да бъде валидно изпълнението на real-time RT-PCR, положителните контроли (Positive Control, PC), контролите без еталон (No Template Control, NTC) и контролите без екстракция (No Extraction Control, NEC) трябва да работят, както е показано в Таблица 22 и Таблица 23.

Таблица 22. Изпълнение на критерии за валидиране и интерпретиране на резултатите за RGQ MDx 5plex HRM

Контрола	Откриване в канал Green	Откриване в канал Yellow	Откриване в канал Red	Интерпретация
Положителна контрола (PC)	Ct ≤ 38,00	Индиферентно	Индиферентно	PC е валидна.
	Ct > 38,00 или без Ct	Индиферентно	Индиферентно	PC е невалидна.
Контрола без еталон (NTC) или	Ct > 38,00 или без Ct	Ct > 35,00 или без Ct	Да	NTC/NEC е валидна.
Контрола без извличане (NEC)	Всички други комбинации с амплификация в Green или Yellow		Индиферентно	NTC/NEC е невалидна.

Таблица 23. Изпълнение на критерии за валидиране и интерпретиране на резултатите за ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 и QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR

Контрола	Откриване в оцветител FAM*	Откриване в оцветител VIC/HEX*	Откриване в оцветител Cy5/ATTO647N*	Интерпретация
Положителна контрола (PC)	Ct ≤ 39,00	Индиферентно	Индиферентно	PC е валидна.
	Ct > 39,00 или без Ct	Индиферентно	Индиферентно	PC е невалидна.
Контрола без еталон (NTC) или	Ct > 39,00 или без Ct	Ct > 35,00 или без Ct	Да	NTC/NEC е валидна.
Контрола без извличане (NEC)	Всички други комбинации с амплификация във FAM или VIC/HEX		Индиферентно	NTC/NEC е невалидна.

За да се валидират тестваните аликвотни части, аликвотните части трябва да бъдат амплифицирани и открити според очакванията.

Таблица 24. Примерни критерии за валидност и интерпретация на резултатите за RGQ MDx 5plex HRM

Откриване в канал Green	Откриване в канал Yellow	Откриване в канал Red	Интерпретация
Ct ≤ 38,00	Индиферентно	Индиферентно	Аликвотната част е положителна за SARS-CoV-2 RNA.
Ct > 38,00 или без Ct	Ct ≤ 35,00	Индиферентно	Аликвотната част е отрицателна, SARS-CoV-2 RNA не е открита.
Ct > 38,00 или без Ct	Ct > 35,00 или без Ct	Да	Невалидна аликвотна част. Няма или не е открит достатъчно човешки материал. Изисква се повторно вземане на аликвотна част.
Ct > 38,00 или без Ct	Ct > 35,00 или без Ct	Не	Невалидна аликвотна част. Реакцията real-time RT-PCR е инхибирана. Изисква се повторен тест.

Таблица 25. Критерии за валидиране и интерпретиране на резултатите на аликвотна част за апаратите за real-time RT-PCR ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480, и QuantStudio 5 Dx.

Откриване в оцветител FAM*	Откриване в оцветител VIC/HEX*	Откриване в оцветител Cy5/ATTO647N*	Интерпретация
Ct ≤ 39,00	Индиферентно	Индиферентно	Аликвотната част е положителна.
Ct > 39,00 или без Ct	Ct ≤ 35,00	Индиферентно	Аликвотната част е отрицателна, SARS-CoV-2 не е открит.
Ct > 39,00 или без Ct	Ct > 35,00 или без Ct	Да	Невалидна аликвотна част. Не е открит човешки материал. Изисква се повторно вземане на аликвотна част.
Ct > 39,00 или без Ct	Ct > 35,00 или без Ct	Не	Невалидна аликвотна част. Реакцията real-time RT-PCR се инхибира. Изисква се повторен тест.

Ограничения

- Само за диагностика *инвитро*.
- Резултатите от *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* не са предназначени да се използват като единствена основа за диагностика, лечение или други решения за управление на пациента. Отрицателните резултати не изключват инфекцията със SARS-CoV-2 и не трябва да бъдат единствената основа за решение на пациента за лечение.
- Продуктът трябва да се използва от персонал, специално инструктиран и обучен в процедурите за *инвитро* диагностика.
- Стриктно спазване на ръководството за потребителя на real-time RT-PCR платформата (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 или QuantStudio 5 Dx) е необходимо за оптимални резултати от PCR.
- Трябва да се проверяват датите на изтичане на сроковете на годност, отпечатани на опаковката и етикетите на всички компоненти. Не използвайте компоненти с изтекъл срок на годност.
- Ефективността на този тест не е установена за проби от слюнка от пациенти без признаци и симптоми на респираторна инфекция.
- За да се избегне рискът от фалшиво отрицателен резултат в случай на ниско положителна клинична аликуотна част, когато се наблюдават следи от кръв в епруветката, това трябва да се запише и ако аликуотната част върне отрицателен резултат при използване на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*, аликуотната част трябва да бъде събрана отново от пациента и трябва да бъде тествана отново с *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*.

Производителност

Аналитична чувствителност (граница на откриване)

Аналитичната чувствителност (или границата на откриване) се определя като най-ниската концентрация, при която $\geq 95\%$ от тестваните аликвотни части генерират положителен сигнал. LoD се оценява чрез анализ на серийни разреждания на отрицателни назофарингеални аликвотни части и втечени аликвотни части от неразредена слюнка, приготвени с високо титърни запаси от инактивирани вирусни частици, получени от търговски доставчици (ZeptoMetrix®). За всяка проба бяха използвани две групи аликвотни части за експериментите с LoD. За да се потвърди установената концентрация на LoD, процентът на откриване на всички репликати трябва да бъде $\geq 95\%$ (поне 19/20 репликата трябва да генерират положителен сигнал).

Концентрацията на LoD се проверява върху назофарингеални проби и проби от неразредена слюнка на заявените real-time RT-PCR платформи (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx и cobas z 480).

Назални, орофарингеални и назофарингеални аликвотни части

LoD е заявен при 950 cp/mL за RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx и QuantStudio 5 Dx и 475 cp/mL за cobas z 480 (виж Таблица 26)

Неразредени аликвотни части от слюнка

LoD е заявен при 950 cp/mL за RGQ MDx и 1200 cp/mL за ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx и CFX96 Dx (виж Таблица 26).

Таблица 26. Обобщени резултати за LoD за всяка платформа с real-time RT-PCR

Платформа	Тип проба	LoD проверена (cp/mL)
RGQ MDx	NPS	950
	Неразредена слюнка	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Неразредена слюнка	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Неразредена слюнка	1200
cobas z 480	NPS	475
	Неразредена слюнка	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Неразредена слюнка	1200

Аналитични изследвания на специфичността (инклузивност и ексклузивност/кръстосана реактивност)

Инклузивност

Инклузивността на *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers и Probes е оценено с *компютърен* анализ на секвенции, налични в базата данни на GISAID (www.gisaid.org). Общо 722 488 секвенции (налични на 23.03.2021 г.) бяха анализирани на COVID CG (<https://covidcg.org>), допълнени с метаданни на GISAID. Секвенциите бяха подравнени с референтната последователност на WIV04 (100% идентична с Wuhan-Hu-1/NC_045512.2, с изключение на дължината на поли-А опашката) и единичните нуклеотидни вариации (SNVs) бяха анализирани в геномната област, насочена от праймерите и сондите на *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Primers и Probes. Разпространението на идентифицираните SNVs остава под 1%, както и честотата на съпътстващите мутации. Нямаше SNV, разположен в последните 1 до 3 нуклеотида от края 3' в съответните олигонуклеотиди, което се очаква да повлияе на производителността. Счита се, че *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit може да открие 100% от публикуваните секвенции.

Ексклузивност/кръстосана реактивност

Компютърен анализ

Ексклузивността на *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers и Probes е оценена с *компютърен* анализ на секвенции, съхранявани в банката данни на NCBI. *Компютърният* анализ показва, че някои от тестваните патогени имат повече от 80% хомология с един от праймерите или сондите на *artus* SARS-CoV-2. Сред тях са *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* има по-малко от 80% хомология с един от праймерите/сондите от анализа за SARS-CoV-2. Въпреки това, праймерите и сондите на *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers и Probes не показват възможно амплифициране с различните секвенции, съхранявани в базата данни nr/nt на NCBI.

Общо 36 бактериални, вирусни и гъбични щама (Таблица 27) са анализирани чрез PCR симулация на *компютър* с ограничен потенциален размер на ампликон от 500 bp. Патогенните секвенции са събрани от базата данни NCBI, но никой от тези патогени не показва амплификация при *компютърен* анализ. Таблица 27 показва списъка с патогени, тествани с компютърен анализ.

Таблица 27. Списък с патогени, тествани с *компютърен* анализ.

Патогени	Щам/Тип	Таксономичен ID	Резултати от <i>компютърен</i> анализ на PCR
Аденовирус тип 3	Тип 3	45659	Няма съвпадение
Аденовирус тип 4	Тип 4	28280	Няма съвпадение
Аденовирус тип 5	Тип 5	28285	Няма съвпадение
Аденовирус тип 7A	Тип 7A	85755	Няма съвпадение
Аденовирус тип 14	Тип 14	10521	Няма съвпадение
Аденовирус тип 31	Тип 31	10529	Няма съвпадение
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Няма съвпадение
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Няма възможна амплификация*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Няма съвпадение
Ентеровирус	Тип 68	42789	Няма съвпадение

* Съответствието на последователността с един от праймерите/сондите показва < 80% хомология.

† Съответствието на последователността с един от праймерите/сондите показва ≥ 80% хомология.

(продължава на следващата страница)

Таблица 27. (Продължава от предходната страница)

Патогени	Щам/Тип	Таксономичен ID	Резултати от <i>компютърен анализ на PCR</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Няма съвпадение
Човешки коронавирус	229E	11137	Няма съвпадение
Човешки коронавирус	NL63	277944	Няма съвпадение
Човешки коронавирус	HKU-1	290028	Няма съвпадение
Човешки коронавирус OC43	OC43	31631	Няма съвпадение
Човешки коронавирус	MERS-CoV	1335626	Няма съвпадение
Човешки метапневмовирус	Неприложимо	162145	Няма съвпадение
Грип А	H1N1	114727	Няма съвпадение
Грип А	H3N2	119210	Няма съвпадение
Грип В	Неприложимо	11520	Няма съвпадение
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Няма съвпадение
Парагрипен вирус	Тип 1	12730	Няма съвпадение
Парагрипен вирус	Тип 2	2560525	Няма съвпадение
Парагрипен вирус	Тип 3	11216	Няма съвпадение
Парагрипен вирус	Тип 4	2560526	Няма съвпадение
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Няма съвпадение
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Няма възможна амплификация*
Респираторен синцитиален вирус	Тип А (RSV-A)	208893	Няма съвпадение
Респираторен синцитиален вирус	Тип В (RSV-B)	208895	Няма съвпадение
Риновирус	Тип А	147711	Няма съвпадение
Риновирус	Тип В	147712	Няма съвпадение
SARS-коронавирус	Tor2	694009	Няма възможна амплификация†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Неприложимо	1282	Няма съвпадение
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Неприложимо	1314	Няма възможна амплификация†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Няма възможна амплификация†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Няма съвпадение

* Съответствието на последователността с един от праймерите/сондите показва < 80% хомология.

† Съответствието на последователността с един от праймерите/сондите показва ≥ 80% хомология.

Инвайтро анализ

Кръстосаната реактивност е проверена *инвайтро* с патогени, показващи $\geq 80\%$ хомология със SARS-CoV-2 Amp Primers в компютърния анализ. Аликвотните части бяха приготвени чрез добавяне на потенциално кръстосано реактивни организми в матрицата на назофарингеалния тампон при 10^6 ср/mL, с изключение на SARS-CoV-1, който беше тестван неразреден съгласно препоръката на доставчика. Нито един от тези патогени не показва кръстосана реактивност *инвайтро*.

Микробната намеса на *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit анализ е оценена *инвайтро* върху панел от препоръчани патогени (Таблица 28). Аликвотните части бяха приготвени чрез добавяне на максимум 5 патогена - при 105 TCID₅₀/mL за вирусни мишени, 10^6 ср/mL за бактериални и гъбични мишени, или при възможно най-високата концентрация въз основа на основната концентрация - в отрицателни назофарингеални тампони, набрани при $2,87 \times$ LoD с инактивирани частици SARS-CoV-2 (Zeptomatrix). Панелите NATtrol™ и SARS-CoV-1 бяха добавени директно с инактивирани вирусни частици SARS-CoV-2 (Zeptomatrix) при $2,87 \times$ LoD. Резултатите за всеки група от тествани микроорганизми и съответните концентрации са обобщени по -долу.

Таблица 28 показва списъка на тестваните патогени при микробна интерференция.

Таблица 28. Списък на *инвайтро* тествани патогени при микробна интерференция.

ID на група / ID на аликвотна част	Микроорганизъм	Източник	Крайна концентрация	Единица	Резултат
Група 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	ср/mL	Няма интерференция
	Човешки коронавирус 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1.43E+05	TCID ₅₀ /mL	
	Човешки коронавирус OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5.86E+04	TCID ₅₀ /mL	
	Човешки коронавирус NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2.84E+04	TCID ₅₀ /mL	
	Аденовирус Т3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1.43E+05	TCID ₅₀ /mL	
	Парагрипен вирус 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9.14E+06	TCID ₅₀ /mL	
Група 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	ср/mL	Няма интерференция
	Аденовирус Т31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1.67E+04	TCID ₅₀ /mL	
	Парагрипен вирус 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4.29E+04	TCID ₅₀ /mL	
	Грип В Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1.43E+05	TCID ₅₀ /mL	
	Риновирус Т 1А	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2.86E+04	TCID ₅₀ /mL	

(продължава на следващата страница)

Таблица 28 (продължава от предходната страница)

ID на група / ID на алиquotна част	Микроорганизъм	Източник	Крайна концентрация	Единица	Резултат
Група 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	cp/mL	Няма интерференция
	Парагрипен вирус Т3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1.43E+07	TCID50/mL	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1.00E+06	CFU/mL	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3.30E+06	CFU/mL	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1.00E+06	CFU/mL	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4.60E+06	CFU/mL	
Група 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/mL	Няма интерференция
	Аденовирус Т7А	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1.02E+06	TCID50/mL	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1.00E+07	CFU/mL	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1.00E+08	CFU/mL	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1.00E+07	CFU/mL	
Група 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	cp/mL	Няма интерференция
	Респираторен синцитиален вирус RSV A	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7.14E+04	TCID50/mL	
	Грип А H1N1 California	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1.43E+04	TCID50/mL	
	Ентеровирус тип 68 Основна група	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1.43E+05	TCID50/mL	
	Аденовирус Т14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2.86E+04	TCID50/mL	
Група 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/mL	Няма интерференция
	MERS-коронавирус	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1.43E+04	TCID50/mL	
	Аденовирус Т4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1.43E+05	TCID50/mL	
	Човешки метапневмовирус (hMPV) тип В	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7.14E+03	TCID50/mL	
	Респираторен синцитиален вирус тип В (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1.43E+03	TCID50/mL	

(продължава на следващата страница)

Таблица 28 (продължава от предходната страница)

ID на група / ID на алиquotна част	Микроорганизъм	Източник	Крайна концентрация	Единица	Резултат
Група 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV 2)-ERC)	2.73E+03	cp/mL	Няма интерференция
	Аденовирус Т5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6.43E+05	TCID50/mL	
	Парагрипен вирус 4В	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7.14E+04	TCID50/mL	
	Грип А H3N2 Switzerland/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2.86E+04	TCID50/mL	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1.00E+06	CFU/mL	
Група 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS (COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/mL	Няма интерференция
	NATrol Panel RP1 (грип А H3N2 (Brisbane/10/07), грип А H1N1 (NY/02/2009), риновирус (тип 1А), Adenovirus Т3, парагрипен вирус Т1, парагрипен вирус Т4, метапневмовирус (Pegu 6-2003) <i>S. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Коксакивирус (тип А1))	Zeptomatrix (MDZ001)	Неизвестно*	Неприложимо	
Група 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV 2)-ERC)	2.73E+03	cp/mL	Няма интерференция
	NATrol Panel RP2 (грип А H1 (New Caledonia/20/99), грип В (Florida/02/06), RSV-А, парагрипен вирус Т2, парагрипен вирус Т3, коронавирус НКУ рекомбинант, коронавируси (OC43, NL63, 229Е), <i>Bordetella pertussis</i> (A639))	Zeptomatrix (MDZ001)	Неизвестно*	Неприложимо	
Група 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV 2)-ERC)	2.73E+03	cp/mL	Няма интерференция
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Неизвестно*	Неприложимо	

* Концентрацията не е съобщена от доставчика.

Интерфериращи вещества

Аликвотни части от назален, орофарингеален и назофарингеален тампон

Ефектът на предполагаемите интерфериращи вещества (за веществата, изброени в Таблица 29) е оценен върху производителността на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*. Тестовите бяха проведени в 3 групи отрицателни назофарингеални тампони и в 3 пула положителни назофарингеални тампони, набраздени при 4 x LoD с инактивирани вирусни частици SARS-CoV-2 (Zeptomatrix). Експериментите бяха проведени на платформата RGQ MDx 5plex HRM (на 4 апарата) от 1 оператор с 1 пилотен набор.

Всяка група се разделя на 2, за да се тества или интерфериращото вещество, разтворено в разтворител (аликвотна част за тест), или само разтворителя (контролна аликвотна част). Извършено е сравнение между тестовата аликвотна част и съответните ѝ контроли по проценти на съвпадение във флуоресцентни канали Green и Red. При липса на интерференция, тестовата аликвотна част и съответните ѝ контрол имат еднакъв процент на съвпадение.

Таблица 29 показва, че нито едно от тестваните вещества не пречи на работата на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* във флуоресцентен канал Green.

Таблица 29. Списък на интерфериращи вещества и проценти на съвпадение, получени от канал Green.

Интерфериращи вещества	Функция	Тестова концентрация	Проценти на съвпадение при отрицателен назофарингеален тампон	Проценти на съвпадение при положителен (4 x LoD) назофарингеален тампон
Тобрамицин	Системни антибиотици	1 mg/mL	Няма интерференция 0/15	Няма интерференция 15/15
Мупироцин	Назален антибиотичен мехлем	6,6 mg/mL	Няма интерференция 0/15	Няма интерференция 15/15
Fluticasone	Назален кортикостероид	5% (v/v)	Няма интерференция 0/15	Няма интерференция 15/15
Ментол (Таблетки за гърло)	Орален анестетик и аналгетик	0,5 mg/mL	Няма интерференция 0/15	Няма интерференция 15/15
Охymetazoline	Назален спрей	10% (v/v)	Няма интерференция 0/15	Няма интерференция 15/15

Продължава на следващата страница

Таблица 29 (продължава от предходната страница)

Интерфериращи вещества	Функция	Тестова концентрация	Проценти на съвпадение при отрицателен назофарингеален тампон	Проценти на съвпадение при положителен (4 x LoD) назофарингеален тампон
Озелтамивир	Антивирусно лекарство	3,3 mg/mL	Няма интерференция 0/15	Няма интерференция 15/15
Муцин (Говежда подчелюстна жлеза тип I-S)		2,5 mg/mL	Няма интерференция 0/15	Няма интерференция 15/15
Пълна кръв		4% (v/v)	Няма интерференция 1/15*	Няма интерференция 15/15

* Открита е амплификация, съответна на артефакт.

Неразредени аликвотни части от слюнка

Ефектът на осемте предполагаеми интерфериращи вещества (за веществата, изброени в Таблица 30) е оценен върху производителността на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*. Тестовите са извършени в една група от отрицателна неразредена аликвотна част от слюнка, разделена на две, за да се извършат две нива на разреждане: (1) отрицателни неразредени аликвотни части от слюнка, и (2) изкуствени положителни неразредени аликвотни части от слюнка (взети чрез добавяне при 3 x LoD (3600 cp/mL) с инактивирани вирусни частици на SARS-CoV-2 (Zeptomatrix) в отрицателната група). Неразредените аликвотни части от слюнка са тествани на платформа *sobas z 480* от 3 оператори с един комплект, наличен в търговската мрежа.

За всяко интерфериращо вещество, репликатите на аликвотната част са разделени на две, за да се тества или интерфериращото вещество, разрежено в разтворител (тестова аликвотна част), или самият разтворител (контрола). Извършено е сравнение между тестовата аликвотна част и съответните ѝ контроли по проценти на съвпадение във флуоресцентни канали Green, Red и Yellow. При липса на интерференция, тестовата аликвотна част и съответните ѝ контроли имат еднакъв процент на съвпадение.

По отношение на качествения анализ (състояние на аликвотните части), осемте тествани интерфериращи вещества (вижте Table 30) не влияят на резултатите от *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit за положителни и отрицателни аликвотни части от слюнка.

Таблица 30 показва, че нито едно от тестваните вещества не пречи на работата на *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit във флуоресцентен канал Green.

Таблица 30. Списък на интерфериращи вещества и проценти на съвпадение, получени от канал Green.

Интерфериращо вещество*	Функция	Тестова концентрация	Проценти на съвпадение при отрицателни неразредени аликвотни части от слюнка	Проценти на съвпадение при положителни (3 до 5 x LoD) неразредени аликвотни части от слюнка
Пълна кръв	Ендогенно вещество: Човешка геномна ДНК, левкоцити, еритроцити	1% v/v	Няма интерференция* 0/8	Няма интерференция* 8/8
Altoids®	Бонбони	2% w/v	Няма интерференция 0/8	Няма интерференция 8/8
Аспирин	Противовъзпалително лекарство	1% w/v	Няма интерференция 0/8	Няма интерференция 8/8
Listerine®	Антисептична вода за уста	1% v/v	Няма интерференция 0/8	Няма интерференция 8/8
Ricola®	Бонбони	1% w/v	Няма интерференция 0/8	Няма интерференция 8/8
Colgate® Total SF Whitening™ Toothpaste	Избелваща паста за зъби	0,1% w/v	Няма интерференция 0/8	Няма интерференция 8/8
Tussidane® Sirop	Сироп за суха кашлица	1% v/v	Няма интерференция 0/8	Няма интерференция 8/8
Pulmofluide®	Сироп за влажна кашлица	1% v/v	Няма интерференция 0/8	Няма интерференция 8/8

* За цялата кръв се наблюдава смущаващ ефект за откриване на IC в канал Red (10 – 40% от инхибирането), без това да повлияе на валидността на аликвотната част. На канала Green, състоянието на аликвотната част не е повлияно от цялата кръв, но се наблюдава леко отклонение на Ct (средно 1,35 Ct по-късно с пълна кръв в сравнение с контролната аликвотна част).

За да се избегне рискът от фалшиво отрицателен резултат при ниско положителна клинична аликвотна част, ако се наблюдават следи от кръв в епруветката, това трябва да се запише и ако аликвотната част върне отрицателен резултат при използване на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*, неразредена слюнка трябва да се събере отново от пациента и аликвотната част трябва да се тества отново с *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*.

Проучване за стабилност на аликвотните части

Проучването на стабилността на аликвотните части беше извършено, за да се оцени въздействието на различните условия на съхранение на аликвотните части върху качествените (анализ на процентите на съвпадение) и количествените (анализ на тенденция на Ct) на наборите за подготовка и амплификация на *artus SARS-CoV-2 UM*. Експериментите бяха извършени чрез анализ на две нива на разреждане: (1) отрицателни аликвотни части и (2) измислени положителни аликвотни части, получени чрез добавяне на инактивирани вирусни частици SARS-CoV-2 (Zeptomatrix). За да се потвърди стабилността на аликвотните части (слюнка и NPS), беше необходимо $\geq 95\%$ от репликатите да дават един и същ процент на съвпадение и тенденция на Ct $\leq 10\%$ от времевата точка 0 за всяко състояние на стабилност.

Назални, орофарингеални и назофарингеални аликвотни части:

От резултатите от качествения и количествения анализ, тестваните условия за съхранение на аликвотни части от назофарингеален тампон не повлияха на процентите на съвпадение (същото състояние, установено според очакванията) и не доведоха до значима тенденция в Ct при резултатите от набора *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*. По този начин работата на набора е стабилна въпреки всички различни условия на съхранение на тестваните аликвотни части от назофарингеален тампон (вижте таблица 31).

Таблица 31 показва условията за стабилност на назофарингеалните аликвотните части

Таблица 31. Условия за стабилност на назофарингеалната аликвотна част.

Условия	Твърдение за стабилност на аликвотните части
F/T	3 F/T
4 °C (2 °C до 8 °C)	72 ч
-70 °C	2 седмици

Неразредени аликвотни части от слюнка

Различните тествани условия на стабилност са изброени в таблица 32. Тестовите бяха проведени с помощта на 2 групи аликвотни части. Отрицателни аликвотни части от неразредена слюнка и 3 x LoD (3600 cp/mL) от измислени положителни аликвотни части от неразредена слюнка бяха тествани с платформа ABI 7500 Fast Dx.

От резултатите от качествения и количествения анализ, тестваните условия за съхранение не повлияха на процентите на съвпадение (същото състояние, установено според очакванията) и не доведоха до значима тенденция в Ct при резултатите от набора *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*. Следователно, работните характеристики на набора бяха стабилни въпреки различните условия на съхранение на тестваните неразредени аликвотни части от слюнка.

Таблица 32 показва условията за стабилност на неразредена слюнка.

Таблица 32. Условия за стабилност на аликвотните части от неразредена слюнка

Условия	Твърдение за стабилност на аликвотните части
F/T	3 F/T
RT (18 °C до 26 °C)	72 ч
4 °C (2 °C до 8 °C)	72 ч
Комбинирано условие: (6 ч при RT, комбинирано с 72 ч при 4 °C (2 до 8 °C) комбинирано с 8 дни при –20 °C (–30 °C до –15 °C))	6h RT след това 72 ч при 4 °C (2 до 8 °C) и след това 7 дни –20 °C (–30 °C до –15 °C)
–20 °C (–30 °C до –15 °C)	1 месец (30,5 дни)

Прецизност

Проучването Precision оценява възпроизводимостта (една и съща аликвотна част се повтаря при различни цикли и условия: 5 дни, 3 набора партиди, 3 оператора и 2 апарата) и повторяемостта (една и съща аликвотна част се повтаря в същия цикъл и състояние). Бяха проведени тестове върху отрицателни назофарингеални аликвотни части и отрицателни назофарингеални аликвотни части, набрани при 5 x LoD върху RGQ MDx.

За всяко ниво на разреждане бяха събрани 204 точки от данни. Данните за повторяемост и възпроизводимост бяха използвани за определяне на стандартното отклонение (SD) и коефициента на вариация (%CV) за целите на SARS-CoV-2 в канали Green, Yellow и Red. Таблица 33 показва, че *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit има обща прецизност от 0,63 SD (2,03 %CV) в канал Green, 0,54 SD (2,22 %CV) в канал Yellow и от 1,28 SD (4,10 %CV) в канал Red.

Таблица 33. Стандартно отклонение и коефициент на вариация на *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Аликвотни части и канал за откриване	Общо	Между дните	Между партидите	Между операторите	Между инструментите	Между циклите	В една серия
Стандартно отклонение (SD) (Коефициент на вариация (% CV))							
Отрицателен NPS Канал Yellow	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
Отрицателен NPS Канал Red	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)0	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
Добавен NPS Канал Green	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
Добавен NPS Канал Yellow	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
Добавен NPS Канал Red	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

Клинични работни характеристики

Назофарингеални тампони

Клиничните работни характеристики на анализ *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp се оценяват с помощта на ретроспективни проби с назофарингеален тампон в транспортна среда, състоящи се от 150 клинични проби.

Всички проби бяха събрани от пациенти с признаци и симптоми на инфекция с COVID-19 и бяха съхранявани замразени до употреба.

Клиничната валидация е извършена на ABI 7500 Fast Dx. Таблица 34 отчита работата на *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit спрямо еталонния метод.

Таблица 34. Клинични работни характеристики на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* спрямо еталонния метод.

Състояние на аликвотната част	Брой	% на положителни	95% ДИ	% на отрицателни	95% ДИ
Положителни	52	98,1 (51/52)	89,9 – 99,7	1,9 (1/52)	-
Отрицателни	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7 – 97,8

Несъответстващите резултати бяха оценени по трети метод и повторно анализирани с таблица за непредвидени ситуации. Общите резултати от клиничното представяне са изразени като процентно съвпадение на положителните резултати (PPA) и процентно съвпадение на отрицателните резултати (NPA) и са показани в таблица 35.

Таблица 35. Клинични работни характеристики на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* след анализ на несъответстващи резултати.

Състояние на аликвотната част	Брой	% на положителни	95% ДИ	% на отрицателни	95% ДИ
Положителни	52	98,1 (51/52)	89,9 – 99,7	1,9 (1/52)	-
Отрицателни	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7 – 97,8

По-долу са изброени частта от аликвотните части в съгласие и процентното съвпадение на положителни и отрицателни резултати (съответно PPA и NPA) с очакваните статуси на аликвотните части:

Процентно съвпадение на положителните резултати (Positive Percent Agreement, PPA): $51/52 = 98,1\%$ (95% CI: 89,9% - 99,7%)

Процентно съвпадение на отрицателните резултати (Negative Percent Agreement, NPA): $93/98 = 94,9\%$ (95% CI: 88,6% - 97,8%)

Назофарингеални тампони, включително асимптоматични индивиди

Клиничните работни характеристики на анализ *artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp* се оценяват с помощта на ретроспективни проби с назофарингеален тампон в транспортна среда, състоящи се от 153 клинични проби.

Всички проби са взети от пациенти без симптоми или други причини да подозират инфекция с COVID-19.

Клиничната валидация е извършена на ABI 7500 Fast Dx. Шестнадесет аликвотни части бяха изключени от анализ след тестване с *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* поради невалиден статус според критериите за валидност на аликвотната част (Таблица 23).

Таблица 36 отчита работата на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* спрямо еталонния метод, който се изразява като процентно съвпадение на положителните резултати (PPA) и процентно съвпадение на отрицателните резултати (NPA).

Таблица 36. Клинични работни характеристики на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* спрямо еталонния метод

Състояние на аликвотната част	Брой	% на положителни	95% ДИ	% на отрицателни	95% ДИ
Положителни	50	64,0 (32/50)	50,1 – 75,9	36,0 (18/50)	–
Отрицателни	87	1,15 (1/87)	–	98,85 (86/87)	93,8 – 99,8

Деветнадесет противоречиви резултати бяха оценени по трети метод и повторно анализирани с таблица за непредвидени ситуации. Общите резултати от клиничното представяне са изразени като процентно съвпадение на положителните резултати (PPA) и процентно съвпадение на отрицателните резултати (NPA) и са показани в Таблица 37.

Таблица 37. Клинични работни характеристики на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* след анализ на несъответстващи резултати.

Състояние на аликвотната част	Брой	% на положителни	95% ДИ	% на отрицателни	95% ДИ
Положителни	32	100,0 (32/32)	89,3 – 100,0	0 (0/32)	-
Отрицателни	105	0,95 (1/105)	-	99,05 (104/105)	94,8 – 99,8

Осемнадесет фалшиво отрицателни аликвотни части бяха прекласифицирани като истински отрицателни, докато една фалшиво положителна остана фалшиво положителна.

По-долу са изброени частта от аликвотните части в съгласие и процентното съвпадение на положителни и отрицателни резултати (съответно PPA и NPA) с очакваните статуси на аликвотните части:

Процентно съвпадение на положителните резултати (Positive Percent Agreement, PPA): $32/32 = 100,0\%$ (95% CI: 89,3% - 100,0%)

Процентно съвпадение на отрицателните резултати (Negative Percent Agreement, NPA): $104/105 = 99,05\%$ (95% CI: 94,8% - 99,8%)

Неразредени аликвотни части от слюнка

Клиничните работни характеристики на анализ *artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp* се оценяват с помощта на проби от неразредена слюнка, състоящи се от 142 проби от слюнка.

Всички проби бяха събрани от пациенти с признаци и симптоми на инфекция с COVID-19. Клиничната валидация е извършена на ABI 7500 Fast Dx. Дванадесет аликвотни части бяха изключени от анализ след тестване с *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* и също с еталонния метод поради получаване и на двата теста на невалиден статус според критериите за валидност на аликвотната част.

Таблица 38 отчита работата на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* спрямо еталонния метод.

Таблица 38. Клинични работни характеристики на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* спрямо еталонния метод.

Състояние на аликвотната част	Брой	% на положителни	95% ДИ	% на отрицателни	95% ДИ
Положителни	45	93,33 (42/45)	82,14 – 97,71	6,67 (3/45)	--
Отрицателни	85	0 (0/85)	-	100 (85/85)	95,68 – 100,00

Три противоречиви резултата бяха оценени по трети метод и повторно анализирани с таблица за непредвидени ситуации. Общите резултати от клиничните работни характеристики са изразени като процентно съвпадение на положителните резултати (Positive Percent Agreement, PPA) и процентно съвпадение на отрицателните резултати (Negative Percent Agreement, NPA) и са показани в таблица 39.

Таблица 39. Клинични работни характеристики на *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* след анализ на несъответстващи резултати.

Състояние на аликвотната част	Брой	% на положителни	95% ДИ	% на отрицателни	95% ДИ
Положителни	43	97,67 (42/43)	87,94 – 99,59	2,32 (1/43)	--
Отрицателни	87	0 (0/87)	-	100 (87/87)	95,77 – 100,00

Два фалшиво отрицателни резултата бяха прекласифицирани като истински отрицателни, докато един фалшиво отрицателен остана фалшиво отрицателен.

По-долу са изброени частта от аликвотните части в съгласие и процентното съвпадение на положителни и отрицателни резултати (съответно PPA и NPA) с очакваните статуси на аликвотните части:

Процентно съвпадение на положителните резултати

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

Процентно съвпадение на отрицателните резултати

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

Цитирани източници

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

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация вижте и страницата „Често задавани въпроси“ (Frequently Asked Questions, FAQ) в нашия Център за техническа поддръжка: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Коментари и предложения

Слаб или няма сигнал Green (FAM) в положителна контрола (PC)

- | | |
|--|--|
| a) Избраният флуоресцентен канал за анализ на данните от RT-PCR не е в съответствие с протокола. | За анализ на данни изберете флуоресцентен канал FAM (Green) за аналитичните SARS-CoV-2 RT-PCR мишени, флуоресцентен канал HEX/VIC/JOE (Yellow) за контрола за вземане на аликвотни части и Cy5/Atto (Red) за вътрешен контрол. |
| b) Неправилно програмиране на температурния профил. | Сравнете RT-PCR програмата с протокола. |
| c) Неправилна конфигурация на PCR реакцията | Проверете работните си стъпки чрез схемата за пипетиране и повторете PCR, ако е необходимо. |
| d) Условието за съхранение на един или повече компоненти на набора не отговарят на инструкциите или наборът artus SARS-CoV-2 RT-PCR е изтекъл. | Следвайте условията за съхранение и проверете срока на годност на реактивите и използвайте нов набор, ако е необходимо. |
| e) Неправилна конфигурация на real-time RT-PCR платформата по време на конфигурирането на данните. | Приложете препоръчаните конфигурации, свързани с вашата real-time RT-PCR платформа, описани в това ръководство. |
| f) PCR се инхибира. | Следвайте добрите практики в лабораторията по молекулярна биология, за да избегнете въвеждането на замърсители. Уверете се, че работното пространство и апаратите се обеззаразяват на редовни интервали. Следвайте протокола, споменат в това ръководство. Проверете срока на годност на реактива и използвайте нов набор, ако е необходимо. Повторете анализа с друга аликвотна част. |

Зелен сигнал (FAM) в Контролата без еталон или в Контролата без извличане

Замърсяване със SARS-CoV-2 секвенции се случи по време на подготовката на RT-плаката за PCR.

Повторете RT-PCR с нови реактиви. Следвайте добрите практики в лабораторията по молекулярна биология, за да избегнете въвеждането на замърсители. Следвайте протокола, споменат в този наръчник. Уверете се, че работното пространство и апаратите се обеззаразяват на редовни интервали.

Коментари и предложения

Слаб или липсва сигнал Red (Cy5/Atto) от вътрешната контрола











- a) В реакцията RT-PCR е въведен интерферент. PCR се инхибира.
- Следвайте добрите практики в лабораторията по молекулярна биология, за да избегнете въвеждането на замърсители. Уверете се, че работното пространство и апаратите се обеззаразяват на редовни интервали. Следвайте протокола, споменат в това ръководство. Повторете експеримента с новосъбрана аликвотна част.
- b) Вътрешната контрола е влошен.
- Следвайте добрите практики в лабораторията по молекулярна биология, за да избегнете въвеждането на RNases. Следвайте препоръките, споменати в това ръководство. Уверете се, че работното пространство и апаратите се обеззаразяват на редовни интервали. Следвайте условията за съхранение и проверете срока на годност на реактивите и използвайте нов набор, ако е необходимо.
- c) Неправилна конфигурация на real-time RT-PCR платформата по време на конфигурирането на данните.
- Приложете препоръчаните конфигурации, свързани с вашата real-time RT-PCR платформа, описани в това ръководство.





Слаб или липсва сигнал Yellow (VIC/HEX) на контрола за вземане на аликвотни части

- a) Клиничната аликвотна част се разгражда.
- Следвайте препоръките, предоставени от доставчика на устройства за събиране, за тяхното съхранение, манипулиране и транспортиране. Следвайте протокола, споменат в това ръководство, включително стъпките за подготовка на аликвотната част на SARS-CoV-2 UM Prep buffer. Следвайте условията за съхранение и проверете срока на годност на реактивите, като например SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, и използвайте нов набор, ако е необходимо.
- b) Пробата не е правилно събрана. Не бяха събрани достатъчно човешки клетки върху тампона или прехвърлени в транспортната среда.
- Следвайте препоръките, предоставени от доставчика на устройства, за събиране на проби и обработка на проби.
- c) Неправилна конфигурация на real-time RT-PCR платформата по време на конфигурирането на данни.
- Приложете конфигурациите, свързани с вашата real-time RT-PCR платформа, описани в това ръководство.

СИМВОЛИ

Следните символи могат да се появят в инструкциите за употреба или върху опаковката и етикета:

Символ	Описание на символа
	Съдържа достатъчно реактиви за 768 или 3072 реакции
	Използвайте до
	Медицинско изделие за инвитро диагностика
	Каталожен номер
	Номер на партида
	Компоненти
	Съдържа
	Номер
	Глобален номер на търговска единица
R _n	„R“ означава редакция на Инструкциите за употреба, а „n“ е номерът на редакцията
	Температурни ограничения

Символ	Описание на символа
	Производител
	Направете справка с инструкциите за употреба
	Пазете от слънчева светлина
	Предупреждение/внимание

Информация за контакт

За техническо съдействие и допълнителна информация, моля, свържете се с отдела за техническо обслужване на QIAGEN на **support.qiagen.com**.

Информация за поръчка

Продукт	Съдържание	Кат. №
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	За 768 реакции: Буфер за приготвяне, оцветител ROX, Master Mix, праймери и сонди, вътрешен контрол, вода (NTC) и положителен контрол	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	За 3072 реакции: Буфер за приготвяне, оцветител ROX, Master Mix, праймери и сонди, вътрешен контрол, вода (NTC) и положителен контрол	4511469
Апарат и аксесоари		
PCR tubes, 0.1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	За използване с ротор с 72 ямки, тръбни ленти и капачки	981103
Rotor-Gene Q software	Софтуер на Rotor-Gene Q версия 2.3.1 (или по-нова)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Апарат за цикли на real-time PCR и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 5 канала, софтуер, лаптоп и принадлежности; 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране	9002032
72-Well Rotor	За съхранение на Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, с реакционен обем 10 – 50 µL	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	За фиксиране на Strip Tubes and Caps, 0.1 ml в 72-Well Rotor	9018904

За актуална информация относно лицензирането и заявления за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на набора QIAGEN. Наръчниците и ръководствата за потребителя на набора QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за техническо обслужване на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Хронология на редакциите на документа

Редакция	Описание
R1, април 2021 г.	Първа редакция.
R2, юли 2021 г.	Разширение на искането: Установен е тест за безсимптомни индивиди. Предназначението е актуализирано, за да включва лица без симптоми или други причини да подозират инфекция с COVID-19. Към данните за ефективността е добавен раздел за клиничните работни характеристики, включително асимптоматични индивиди.
R3, септември 2021 г.	Разширение на искането: <ol style="list-style-type: none">1. Добавяне на тестване с помощта на проби от слюнка.2. Промяна на работния процес.3. За използване с 3 допълнителни платформи и съответния им софтуер: CFX96 Dx с CFX Manager Dx Софтуерна версия 3.1.3090.1022 (или по-нова), cobas z 480 с LightCycler 480 SW UDF версия 2.0.0 (или по-нова) и QuantStudio 5 Dx с QuantStudio 5 Dx IVD софтуерна версия 1.0.1 (или по-нова).4. Границата на откриване на трите допълнителни платформи (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) беше добавена в раздела за ефективност за назофарингеалните, назалните и орофарингеалните аликутни части.5. Разделът с техническите характеристики е актуализиран.6. За апарата RGQ бяха запазени само флуоресцентни канали (Green, Red, Yellow) (имената на цветителите в скоби бяха изтрети).7. Запазени са само имена на цветители за CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 и QuantStudio 5 Dx.8. За ABI7500 Fast Dx флуоресцентните филтри A/1, B/2 и E/5 бяха заличени. Запазени са само имената на цветители (Fam, Vic и Cy5).9. Промени в таблици 34 – 37 в раздела за клинични работни характеристики, за да се изясни представянето.
R4, януари 2022 г.	Корекция на печатна грешка в Таблица 39.

Ограничено лицензно споразумение за *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Употребата на този продукт означава, че всеки купувач или потребител на продукта приема следните условия:

1. Продуктът може да се използва само по протоколите, предоставени с продукта и този наръчник, и само с компонентите, съдържащи се в набора. QIAGEN не предоставя лиценз по никакви права върху своята интелектуална собственост за употребата или включването на приложените компоненти на този набор с компоненти, които не са включени в този набор, освен както е описано в протоколите, предоставени с продукта, този наръчник и допълнителните протоколи, които могат да се изтеглят от адрес www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са щателно тествани или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти се лицензират за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично се освобождава от отговорност за всякакви други лицензи – явни или подразбиращи се – освен изрично посочените.
5. Купувачът и потребителят на набора се съгласяват да не предприемат и да не позволяват на други лица да предприемат стъпки, които могат да улеснят или да доведат до някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да прилага забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всички свои разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатските хонорари, при всяко действие за прилагане на настоящото Ограничено лицензно споразумение или упражняване на всяко от своите права върху интелектуална собственост във връзка с набора и/или неговите компоненти.

За актуалните условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Prep&Amp™, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™, Hard-Shell® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); ZepTometrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Colgate®, Total SF Whitening™ (Colgate-Palmolive Company); Listerine® (Johnson & Johnson); Tusssidane® (Laboratoires Des Realisations Therapeutiques Elerte); PulmoFluide® (Laboratoires Gerda); Excel® (Microsoft Corporation); Ricola® (Ricola Group); cobas®, LightCycler® (Roche Group); ABI®, MicroAmp™, EnduraPlate™, QuantStudio®, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific or its Subsidiaries); Altoids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Регистрираните наименования, търговски марки и пр., използвани в този документ, дори да не са изрично обозначени като такива, не следва да се считат за незащитени от закона.

01.2022 г. R4 HB-2850-004 © 2021 QIAGEN, всички права запазени.

Поръчки: www.qiagen.com/shop | Техническа поддръжка: support.qiagen.com |
Уебсайт www.qiagen.com