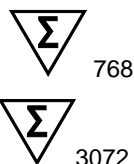


Styczeń 2022 r.

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



Wersja 1



Przeznaczony do celów diagnostyki in vitro w aparatach Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM, ABI<sup>®</sup> 7500 Fast Dx, QuantStudio<sup>®</sup> 5 Dx, cobas<sup>®</sup> z 480 oraz CFX96<sup>™</sup> Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R4

# Spis treści

Przeznaczenie.....	4
Opis i zasada procedury.....	5
Informacje o patogenie.....	5
Podsumowanie i objaśnienie.....	6
Dostarczone materiały.....	10
Zawartość zestawu .....	10
Składniki zestawu.....	11
Platformy i oprogramowanie.....	12
Materiały wymagane, ale niedostarczone.....	14
Materiały eksploatacyjne i wyposażenie.....	14
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	16
Informacje dotyczące bezpieczeństwa .....	16
Środki ostrożności.....	17
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami.....	18
Transport i przechowywanie próbek oraz sposób postępowania z próbkami .....	18
Protokół: przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie RGQ MDx 5plex HRM .....	20
Protokół: przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie ABI 7500 Fast Dx.....	26
Protokół: Przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie CFX96 Dx.....	33
Protokół: Przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie cobas z 480 ..	39

---

Protokół: Przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie QuantStudio 5 Dx.....	45
Wyniki.....	51
Analiza wykonywana w aparacie RGQ MDx 5plex HRM.....	51
Analiza wykonywana w aparacie ABI 7500 Fast Dx.....	53
Analiza wykonywana w aparacie CFX96 Dx .....	54
Analiza wykonywana w aparacie cobas z 480 .....	55
Analiza wykonywana w aparacie QuantStudio 5 Dx .....	57
Interpretacja wyników .....	59
Ograniczenia .....	62
Skuteczność .....	63
Czułość analityczna (granica wykrywalności).....	63
Badania swoistości analitycznej (testy zróżnicowania i wykluczenia/reaktywność krzyżowa).....	64
Precyzja .....	77
Skuteczność kliniczna .....	78
Literatura .....	82
Rozwiązywanie problemów .....	84
Symbole .....	86
Informacje kontaktowe.....	88
Dane do zamówień.....	89
Historia zmian dokumentu .....	90

---

# Przeznaczenie

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

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

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

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

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest przeznaczony do użytku z systemami Rotor-Gene Q MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 oraz CFX96 D umożliwiającymi wykonanie reakcji real-time PCR.

# Opis i zasada procedury

## Informacje o patogenie

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

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

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

---

Oznaczenie wykonywane za pomocą zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest ukierunkowane na 2 sekwencje docelowe (N1 i N2) genu N wykrywane w tym samym kanale fluorescencyjnym. Te dwie sekwencje docelowe nie są rozróżniane, a amplifikacja jednej lub obu z nich prowadzi do wygenerowania sygnału fluorescencyjnego. Wyniki pozytywne wskazują na obecność wirusa SARS-CoV-2, ale nie wykluczają koinfekcji innymi patogenami. Negatywne wyniki reakcji real-time RT-PCR nie wykluczają jednak zakażenia.

## Podsumowanie i objaśnienie

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest gotowym do użycia systemem umożliwiającym proste przygotowanie próbki, a następnie detekcję RNA wirusa SARS-CoV-2 przy użyciu reakcji real-time RT-PCR wykonywanej w systemie RGQ MDx system lub aparatach ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 lub QuantStudio 5 Dx (ryc. 1).

Bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer zawiera odczynniki i enzymy przeznaczone do swoistej amplifikacji regionów w genomie RNA wirusa SARS-CoV-2 o długości 72 par zasad (pz) i 67 pz i bezpośredniej detekcji tych regionów w kanale fluorescencyjnym „Green” aparatu RGQ MDx oraz kanale fluorescencyjnym „FAM” aparatu ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 lub QuantStudio 5 Dx.

Mieszanina starterów i sond dostarczana w zestawie *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zawiera również oligonukleotydy wymagane do amplifikacji genu RNazy P. Detekcja w kanale fluorescencyjnym „Yellow” aparatu RGQ MDx lub kanale fluorescencyjnym barwnika VIC/HEX aparatu ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 lub QuantStudio 5 Dx oznacza, że amplifikacja tych regionów była wystarczająca i pobrano wystarczającą ilość materiału biologicznego. Kontrola ta ma kluczowe znaczenie, gdyż umożliwia potwierdzenie, że w próbkach negatywnych względem wirusa SARS-CoV-2 obecny był materiał biologiczny. Amplifikacja powinna być zawsze wykrywalna; w przeciwnym razie jakość próbki jest wątpliwa.

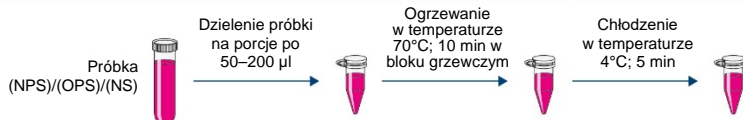
---

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zawiera również trzeci, heterologiczny system amplifikacji służący do detekcji potencjalnej inhibicji reakcji real-time RT-PCR. Do tego celu przeznaczona jest kontrola wewnętrzna (Internal Control, IC) RNA wykrywana w kanale fluorescencyjnym „Red” aparatu RGQ MDx lub w kanale fluorescencyjnym barwnika Cy5/ATTO647N aparatu ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 lub QuantStudio 5 Dx. Ze względu na to, że kontrola IC jest zawarta w mieszaninie SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, amplifikacja tej kontroli powinna zachodzić ze stałą wydajnością, o ile w próbce lub podczas reakcji real-time RT-PCR nie jest obecny inhibitor reakcji PCR, który opóźnia lub uniemożliwia zajście amplifikacji.

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

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

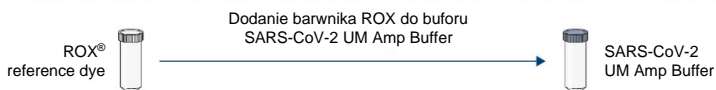
Przygotowanie próbek



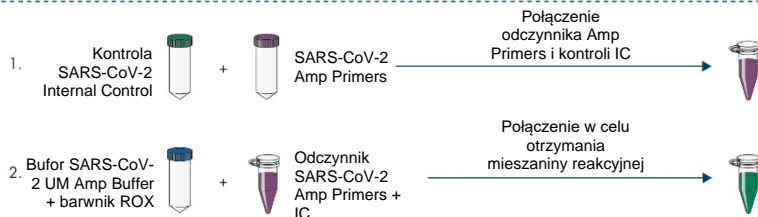
1. Etap upłyniania: ogrzewanie próbki w temperaturze 95°C; 15 min
2. Kroki dzielenia próbki na porcje i ogrzewania



Przygotowanie mieszaniny Master Mix (tylko przy pierwszym użyciu)



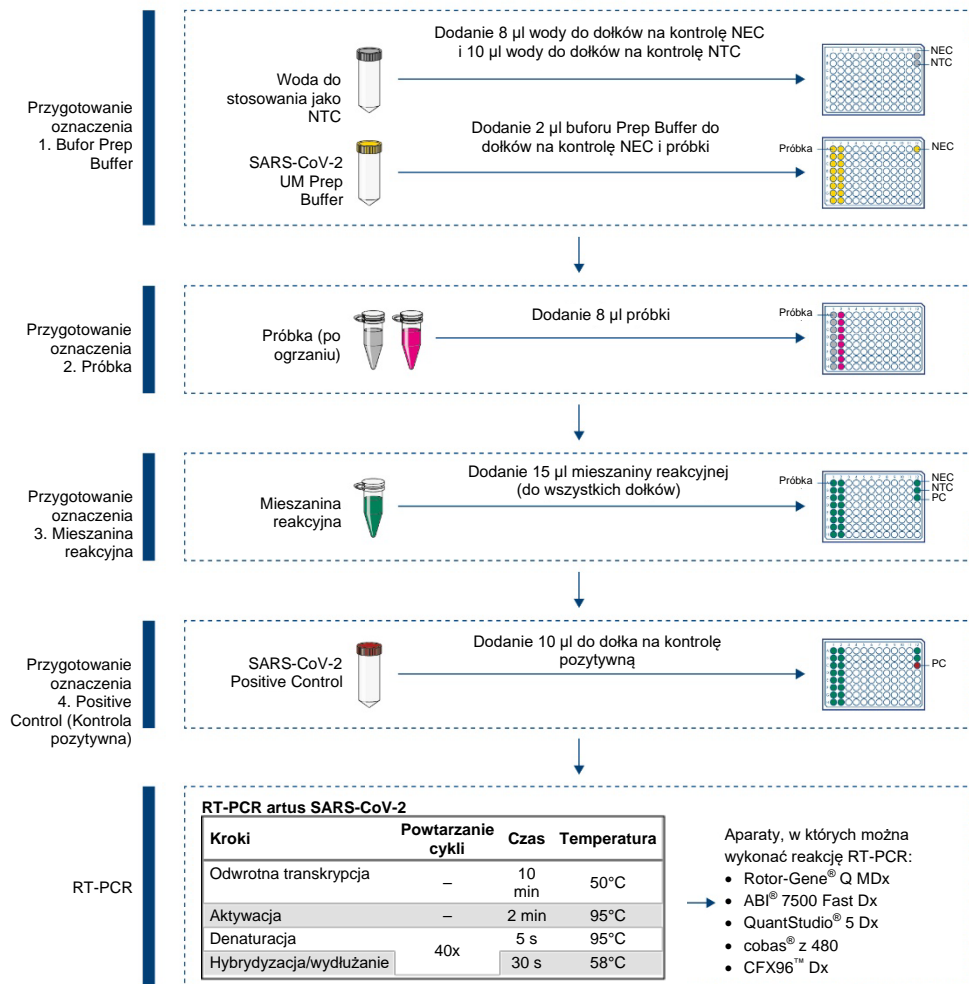
Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej



(ciąg dalszy na następnej stronie)



(ciąg dalszy z poprzedniej strony)



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

# Dostarczone materiały

## Zawartość zestawu

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

---

## Składniki zestawu

### Odczynniki

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

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

### Startery i sondy

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

### Kontrole i kalibratory

Oznaczenie zawiera 5 kontroli przeznaczonych do monitorowania wydajności reakcji real-time RT-PCR.

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

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

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

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

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

## Platformy i oprogramowanie

Przed użyciem upewnić się, że aparaty zostały poddane konserwacji i kalibracji zgodnie z zaleceniami producenta. Zestaw może być używany do wykonywania pięciu procedur; procedury te wymagają użycia wymienionych niżej aparatów przeznaczonych do przeprowadzania reakcji real-time RT-PCR w połączeniu z odpowiednim oprogramowaniem:

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

- 
- aparat CFX96 Dx z oprogramowaniem CFX Manager Dx Software w wersji 3.1.3090.1022 lub wyższej;
  - aparat cobas z 480 z oprogramowaniem LightCycler® 480 SW UDF w wersji 2.0.0 lub wyższej;
  - aparat QuantStudio 5 Dx z oprogramowaniem QuantStudio 5 Dx IVD Software w wersji 1.0.1 lub wyższej albo oprogramowaniem QuantStudio 5 Dx TD w wersji 1.0.1 lub wyższej.

# Materiały wymagane, ale niedostarczone

## Materiały eksploatacyjne i wyposażenie

Materiały eksploatacyjne i wyposażenie do użytku na wszystkich platformach

- Wirówka laboratoryjna z rotorem dla probówek reakcyjnych o pojemności 2 ml
- Pipety (z regulacją)
- Wytrząsarka
- Blok grzewczy
- Rękawiczki jednorazowe bezpudrowe
- Jałowe końcówki do pipet, wolne od nukleaz, z filtrami
- Probówki wolne od składników reakcji PCR, pojemność 1,5 ml lub 2 ml
- Wirówka na płytki 96-dołkowe

Materiały eksploatacyjne i wyposażenie wymagane dla poszczególnych platform

### **Aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM**

- Probówki do reakcji PCR o pojemności 0,1 ml do użytku z aparatem Rotor-Gene Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, nr kat. 981103)
- Rotor 72-Well Rotor (nr kat. 9018903) i rotor Locking Ring 72-Well Rotor (nr kat. 9018904)

### **Aparat ABI 7500 Fast Dx**

- Płytki 96-Well MicroAmp™ (Thermo Fisher Scientific, nr kat. N8010560)
- Folia MicroAmp Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4360954)

### **Aparat CFX96 Dx**

- Płytki Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, niskoprofilowa, cienkościenna, z białym/przezroczystym kołnierzem (Bio-Rad Laboratories Inc., nr kat. HSP9601)
- Folia Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, samoprzylepna, optyczna (Bio-Rad Laboratories Inc., nr kat. MSB1001)

---

### **Aparat cobas z 480**

- Płytki LightCycler 480 Multiwell Plate, biała (Roche Group, nr kat. 04729692001).
- Folia LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Group, nr kat. 04729757001).

### **Aparat QuantStudio 5 Dx**

- Płytki MicroAmp EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, nr kat. A36924)
- Folia MicroAmp Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 4360954)

# Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

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

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

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

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



---

## Środki ostrożności

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

---

# Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

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

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

## Transport i przechowywanie próbek oraz sposób postępowania z próbkami

Zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest przeznaczony do użytku z próbkami wymazów z nosogardzieli, nosa i ustnej części gardła oraz czystymi próbkami śliny. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny. Centra Kontroli i Prewencji Chorób (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) oraz agencja Public Health England opracowały wytyczne dotyczące pobierania próbek, postępowania z próbkami oraz wykonywania testów na próbkach klinicznych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z tymi wytycznymi lub innymi stosownymi protokołami opracowanymi przez krajowe laboratorium referencyjne.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek wymazów z nosogardzieli, nosa i ustnej części gardła

W celu uzyskania informacji na temat pobierania, przechowywania i transportu próbek wymazów należy zapoznać się z zaleceniami dostawcy odpowiedniego wyrobu. Wymazówki muszą być całkowicie zanurzone w podłożu transportowym, aby zachować integralność próbki. Probki wymazów z nosogardzieli pozostają stabilne i mogą być przechowywane:

- w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  (od  $2$  do  $8^{\circ}\text{C}$ ) przez maksymalnie 72 godziny;

- w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  przez 2 tygodnie.

Próbki wymazów z nosogardzieli pozostają stabilne przez 3 cykle zamrażania-rozmrażania.

### Pobieranie, transport i przechowywanie czystych próbek śliny

Czyste próbki śliny muszą być pobierane do jałowych pojemników bez środków konserwujących, buforów lub innych dodatków.

Sposób pobierania czystych próbek śliny:

- Przed pobraniem czystej próbki śliny pacjent nie powinien kaszleć.
- Przez 30 minut przed pobraniem czystej próbki śliny pacjent nie powinien spożywać pokarmów lub płynów, palić tytoniu lub używać papierosów elektronicznych, żuć gumy ani myć zębów.
- Przez 24 godziny przed pobraniem czystej próbki śliny pacjent nie powinien mieć wykonywanych żadnych zabiegów stomatologicznych ani badań stomatologicznych.

Czyste próbki śliny pozostają stabilne i mogą być przechowywane:

- w temperaturze pokojowej ( $18-26^{\circ}\text{C}$ ) przez maksymalnie 72 godziny;
- w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  (od  $2$  do  $8^{\circ}\text{C}$ ) przez maksymalnie 72 godziny;
- w różnych temperaturach: najpierw w temperaturze pokojowej, następnie w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ , a następnie w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  (od  $-30$  do  $-15^{\circ}\text{C}$ ) — w ten sposób próbki mogą być przechowywane przez maksymalnie 12 dni;
- w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  (od  $-30$  do  $-15^{\circ}\text{C}$ ) przez 1 miesiąc.

Czyste próbki śliny pozostają stabilne przez 3 cykle zamrażania-rozmrażania.

Jeśli warunki przechowywania próbek w laboratorium użytkownika odbiegają od wymienionych wytycznych, użytkownik powinien zwalidować te warunki przechowywania.

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

Ten protokół określa sposób przygotowywania próbek i reakcji real-time RT-PCR w celu detekcji docelowych sekwencji wirusa SARS-CoV-2 w przechowywanych w podłożu transportowym ludzkich próbkach wymazów z nosa, nosogardzieli lub ustnej części gardła oraz w czystych próbkach śliny przy użyciu aparatu RGQ MDx 5plex HRM przeznaczonego do przeprowadzania reakcji real-time RT-PCR w połączeniu z oprogramowaniem Rotor-Gene Q w wersji 2.3.1.49 (lub wyższej).

## Ważne informacje przed rozpoczęciem procedury

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

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury

- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki pobrane z dróg oddechowych mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej (15–25°C); zalecane jest jednak trzymanie próbek na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym.
- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki śliny mogą być przechowywane na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym; zalecane jest jednak, aby próbki przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).

- Przed użyciem pozostawić odczynniki SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, SARS-CoV-2 Positive Control i wodę do stosowania jako NTC do całkowitego rozmrożenia w temperaturze pokojowej. Do momentu użycia przechowywać próbki w temperaturze pokojowej i chronić je przed światłem.
- Przed użyciem buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer oraz buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer należy każdy z nich wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny poprzez odwrócenie próbek 2–3 razy (nie wytrząsać), a następnie krótko je odwirować. W przypadku każdego z pozostałych odczynników jednorodną mieszaninę można otrzymać poprzez pulsacyjne wytrząsanie przez 3–5 sekund lub poprzez odwrócenie próbek 2–3 razy, a następnie ich krótkie odwirowanie.
- Bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer powoduje inhibicję obecnych w próbkach klinicznych RNaz na potrzeby etapu detekcji; nie jest to jednak roztwór inaktywujący wirusa. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.
- Upewnić się, że warunki określone dla cykli na platformie do reakcji real-time RT-PCR są takie same jak warunki przedstawione w niniejszym protokole.
- W celu uniknięcia wielu cykli zamrażania-rozmrażania można podzielić odczynniki na porcje.
- Przygotować świeżą mieszaninę reakcyjną (<2 godz. przed rozpoczęciem reakcji RT-PCR na płytce).
- W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia próbkę i reakcję RT-PCR należy przygotowywać w odrębnych strefach.

## Procedura

**Przygotowanie próbki:** W przypadku próbek pobranych z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli) należy wykonać krok 1. W przypadku próbek śliny należy przejść do kroku 2.

1. Próbki pobrane z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli):

- 1a. Energicznie wytrząsać wymazówkę zawierającą próbkę.
  - 1b. Przenieść porcje próbki o objętości 50–200 µl do wolnych od składników reakcji PCR probówek o pojemności 1,5 ml.
  - 1c. Przeprowadzić etap podgrzewania w bloku grzewczym w temperaturze 70°C przez 10 min. Chłodzić próbki na lodzie przez co najmniej 5 min, po czym trzymać próbki na lodzie lub w temperaturze 4°C.
2. Próbki śliny:
- 2a. Upłynnić (w celu ułatwienia pipetowania): ogrzewać próbkę śliny w temperaturze 95°C przez 15 minut (objętość, pojemnik i urządzenie do ogrzewania można dobrać dowolnie).
  - 2b. Uzyskać jednorodną mieszaninę z próbki, delikatnie pipetując w górę i w dół 8–10 razy.
  - 2c. Przenieść porcję próbki o objętości 50 µl do wolnej od składników reakcji PCR probówki o pojemności 1,5 ml.
  - 2d. Wykonać etap ogrzewania w temperaturze 95°C przez 15 minut w bloku grzewczym, następnie pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej na co najmniej 5 min do momentu przeniesienia próbki do dołka płytki lub probówki w celu wykonania reakcji PCR.
3. Podczas pierwszego użycia zestawu uzupełnić bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer roztworem barwnika ROX Reference Dye.
- 3a. Dodać 32,8 µl barwnika ROX do 1 probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zamknąć wieczko probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX i odwrócić probówkę 3 razy.
  - 3c. Odwirować probówkę z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX, aby zebrać roztwór na dnie probówki.
4. W przypadku analizy pełnej płytki w aparacie RGQ MDx (72 dołki) przygotować porcje mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control.
- 4a. Przenieść wymagane objętości odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control zgodnie z Tabelą 1 do nowej, wolnej od składników reakcji PCR probówki o pojemności 1,5 ml.

- 4b. Zamknąć wieczko i odwrócić probówkę 3 razy lub wytrząsać probówkę pulsacyjnie przez 3–5 s.
- 4c. Odwirować probówkę z odczynnikami SARS-CoV-2 Amp Primers i kontrolą IC, aby zebrać roztwór na dnie probówki.

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

Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli IC				Liczba reakcji Objętość (μl)
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	72 reakcje (+ nadwyżka 20%*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	626,4
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopii/μl	10 kopii/μl	1,5	129,6
Łączna objętość mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	756

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

5. Przygotować mieszaninę reakcyjną zgodnie z Tabelą 2 i dokładnie ją wymieszać, odwracając probówkę 3 razy.

**Tabela 2. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

Mieszanina reakcyjna do reakcji RT-PCR				Liczba reakcji Objętość (μl)
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	72 reakcje (+ nadwyżka 20%*)
Mieszanina buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnika ROX	4x	1x	6,25	540
Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	756
Łączna objętość mieszaniny reakcyjnej		–	15,00	1296

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

6. Dodać 8 μl wody wolnej od nukleaz do probówki do reakcji PCR przypisanej do kontroli NEC.

7. Dodać 10 µl wody wolnej od nukleaz do próbki do reakcji PCR przypisanej do kontroli NTC.
8. Dodać 2 µl buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer do każdej próbki do reakcji PCR przypisanej do kontroli NEC i przygotowanych próbek.
9. Dodać 8 µl przygotowanej próbki do próbki PCR z buforem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
10. Dodać 15 µl mieszaniny reakcyjnej przygotowanej w kroku 5 do próbek przeznaczonych na próbki i kontrole (patrz przykład na Ryc. 2). Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy, a następnie zamknąć wieczka wszystkich próbek PCR, z wyjątkiem próbki przeznaczonej na kontrolę SARS-CoV-2 Positive Control.

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

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

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

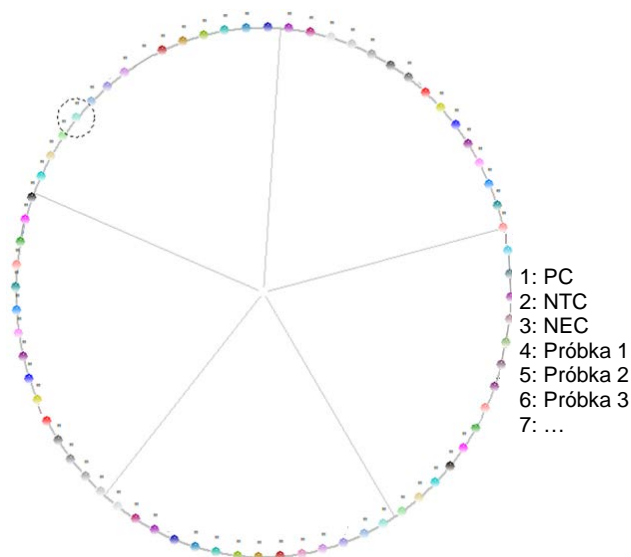
13. Umieścić próbki w cyklerze do reakcji real-time (przykładowy układ próbek przedstawiono na Ryc. 2) i uruchomić program wykonywania cykli o parametrach zgodnych z opisem w Tabeli 3.

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

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

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





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

14. Kliknąć przycisk Gain optimization (Optymalizacja wzmacnienia) w obszarze „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu), aby otworzyć obszar Auto-gain Optimization Setup (Konfiguracja optymalizacji wzmacnienia automatycznego).
15. Upewnić się, że kanały rejestracji zostały ustawione zgodnie z danymi podanymi w Tabeli 4.

Tabela 4. Konfiguracja aparatu RGQ MDx 5plex HRM

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

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

16. Wybrać opcję Perform optimization before the first acquisition (Wykonaj optymalizację przed pierwszą rejestracją).
17. Rozpocząć reakcję.
18. Po zakończeniu cyklu przeanalizować wyniki (patrz część Wyniki).

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

Ten protokół określa sposób przygotowywania próbek i detekcji docelowych sekwencji wirusa SARS-CoV-2 w przechowywanych w podłożu transportowym ludzkich próbkach wymazów z nosa, nosogardzieli lub ustnej części gardła oraz w czystych próbkach śliny przy użyciu aparatu ABI 7500 Fast Dx przeznaczonego do przeprowadzania reakcji real-time RT-PCR.

## Ważne informacje przed rozpoczęciem procedury

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

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury

- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki pobrane z dróg oddechowych mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej (15–25°C); zalecane jest jednak trzymanie próbek na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym.
- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki śliny mogą być przechowywane na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym; zalecane jest jednak, aby próbki przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- W przypadku korzystania z aparatu ABI 7500 Fast Dx należy używać barwnika ROX.

- Dane należy rejestrować przy ustawieniu pasywnego barwnika (ROX).
- Przed użyciem pozostawić odczynniki SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, SARS-CoV-2 Positive Control i wodę do stosowania jako NTC do całkowitego rozmrożenia w temperaturze pokojowej. Do momentu użycia przechowywać próbki w temperaturze pokojowej i chronić je przed światłem.
- Przed użyciem buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer oraz buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer należy każdy z nich wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny poprzez odwrócenie próbek 2–3 razy (nie wytrząsać), a następnie krótko je odwirować. W przypadku każdego z pozostałych odczynników jednorodną mieszaninę można otrzymać poprzez pulsacyjne wytrząsanie przez 3–5 sekund lub poprzez odwrócenie próbek 2–3 razy, a następnie ich krótkie odwirowanie.
- Bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer powoduje inhibicję obecnych w próbkach klinicznych RNaz na potrzeby etapu detekcji; nie jest to jednak roztwór inaktywujący wirusa. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.
- Upewnić się, że warunki określone dla cykli na platformie do reakcji real-time RT-PCR są takie same jak warunki przedstawione w niniejszym protokole.
- W celu uniknięcia wielu cykli zamrażania-rozmrażania można podzielić odczynniki na porcje.
- Przygotować świeżą mieszaninę reakcyjną (<2 godz. przed rozpoczęciem reakcji RT-PCR na płytce).
- W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia próbkę i reakcję RT-PCR należy przygotowywać w odrębnych strefach.

## Procedura

**Przygotowanie próbki:** W przypadku próbek pobranych z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli) należy wykonać krok 1. W przypadku próbek śliny należy przejść do kroku 2.

1. Próbki pobrane z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli):
  - 1a. Energicznie wytrząsać wymazówkę zawierającą próbkę.
  - 1b. Przenieść porcje próbki o objętości 50–200  $\mu$ l do wolnych od składników reakcji PCR probówek o pojemności 1,5 ml.
  - 1c. Przeprowadzić etap podgrzewania w bloku grzewczym w temperaturze 70°C przez 10 min.
  - 1d. Chłodzić próbki na lodzie przez co najmniej 5 min po czym trzymać próbki na lodzie lub w temperaturze 4°C.
2. Próbki śliny:
  - 2a. Uptynnianie (w celu ułatwienia pipetowania): ogrzewać próbkę śliny w temperaturze 95°C przez 15 minut (objętość, pojemnik i urządzenie do ogrzewania można dobrać dowolnie).
  - 2b. Uzyskać jednorodną mieszaninę z próbki, delikatnie pipetując w górę i w dół 8–10 razy
  - 2c. Przenieść porcję próbki o objętości 50  $\mu$ l do wolnej od składników reakcji PCR probówki o pojemności 1,5 ml.
  - 2d. Wykonać etap ogrzewania w temperaturze 95°C przez 15 minut w bloku grzewczym, następnie pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej na co najmniej 5 min do momentu przeniesienia próbki do dołka płytki lub probówki w celu wykonania reakcji PCR.
3. Podczas pierwszego użycia zestawu uzupełnić bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer roztworem barwnika ROX Reference Dye.
  - 3a. Dodać 32,8  $\mu$ l barwnika ROX do probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zamknąć wieczko probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX i odwrócić probówkę 3 razy.
  - 3c. Odwirować probówkę z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX, aby zebrać roztwór na dnie probówki.
4. W przypadku analizy pełnej płytki w aparacie ABI 7500 Fast Dx (96 dołków) przygotować porcje mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control.

- 4a. Przenieść wymaganą objętość odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control zgodnie z Tabelą 5 do nowej, wolnej od składników reakcji PCR próbki o pojemności 1,5 ml.
- 4b. Zamknąć wieczko i odwrócić probówkę 3 razy lub wytrząsać probówkę pulsacyjnie przez 3–5 s.
- 4c. Odwirować probówkę z odczynnikami SARS-CoV-2 Amp Primers i kontrolą IC, aby zebrać roztwór na dnie próbki.

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

Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Liczba reakcji Objętość (μl)	
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	96 reakcji (+ nadwyżka 20%*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopii/μl	10 kopii/μl	1,5	172,8
Łączna objętość mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

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

5. Przygotować mieszaninę reakcyjną zgodnie z Tabelą 6 i dokładnie ją wymieszać, odwracając probówkę 3 razy.

**Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

Mieszanina reakcyjna do reakcji RT-PCR			Liczba reakcji Objętość (µl)	
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	96 reakcji (+ nadwyżka 20%*)
Mieszanina buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnika ROX	4x	1x	6,25	720
Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Łączna objętość mieszaniny reakcyjnej	–		15,00	1728

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

- Dodać 8 µl wody wolnej od nukleaz do dołka przypisanego do kontroli NEC.
- Dodać 10 µl wody wolnej od nukleaz do dołka przypisanego do kontroli NTC.
- Dodać 2 µl buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer do każdego dołka przypisanego do kontroli NEC i przygotowanych próbek.
- Dodać 8 µl przygotowanej próbki do dołka z buforem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
- Dodać 15 µl mieszaniny reakcyjnej przygotowanej w kroku 5 do dołków przeznaczonych na próbki i kontrole (patrz przykład na Ryc. 3). Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
- Dodać 10 µl kontroli SARS-CoV-2 Positive Control do odpowiedniego dołka. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
- Dobrze zakleić płytkę do reakcji PCR folią, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu. Przyłożyć równomierny nacisk na całą płytkę, aby dobrze uszczelnić wszystkie pojedyncze dołki.
- Krótko odwirować płytkę do reakcji PCR, aby zebrać płyn na dnie dołków.
- Ustawić program reakcji real-time RT-PCR na tryb reakcji „Standard 7500” w aparacie ABI 7500 Fast Dx zgodnie z danymi podanymi w Tabeli 7.

**Uwaga:** Po kliknięciu opcji **file** (Plik) i **new** (Nowy) sprawdzić czy dla oznaczenia ustawiono opcję **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Krzywa wzorcowa (Bezwzględne oznaczenie ilościowe)), a dla trybu reakcji ustawiono opcję **Standard 7500**. Wybrać FAM, VIC i Cy5 jako barwniki reporterowe, a dla opcji Quencher (Wygaszacz) ustawić wartość **None** (Brak). Dane muszą być rejestrowane z barwnikiem **ROX** ustawionym jako **referencyjny barwnik pasywny**.

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

**Uwaga:** Szczegółowe informacje przedstawiono w dokumencie *ABI 7500 Fast Dx — Instrukcja użycia*.

15. Umieścić płytkę w cyklerze do reakcji real-time (przykładowy układ płytki do reakcji PCR przedstawiono na Ryc. 3) i uruchomić program wykonywania cykli o parametrach zgodnych z opisem w Tabeli 7.
16. Wybrać używane dołki i zastosować barwniki reporterowe FAM, VIC i Cy5. Dane należy rejestrować przy ustawieniu **ON** (WŁ.) dla pasywnego barwnika ROX.
17. Upewnić się, że dla opcji Standard Curve (Krzywa wzorcowa) aparatu ABI 7500 Fast Dx skonfigurowano ustawienie Absolute Quantitation (Bezwzględne oznaczenie ilościowe).
18. Rozpocząć reakcję.
19. Po zakończeniu cyklu przeanalizować wyniki (patrz część Wyniki).

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

Kroki	Czas	Temperatura (°C)	Liczba cykli	Rejestracja
Odwrotna transkrypcja	10 min	50	1	Nie
Początkowa aktywacja cieplna reakcji PCR	2 min	95	1	Nie
Cykl 2-etapowy				
Denaturacja	5 s	95	40	Nie
Hybrydyzacja/wydłużanie	30 s	58		FAM, VIC i Cy5

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

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



# Protokół: Przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie CFX96 Dx

Ten protokół jest przeznaczony do przygotowywania próbek i detekcji sekwencji docelowych wirusa SARS-CoV-2 w przechowywanych w podłożu transportowym ludzkich próbkach wymazów z nosa, nosogardzieli i ustnej części gardła oraz w czystych próbkach śliny przy użyciu aparatu CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., nr kat. 1845097-IVD (moduł do optycznego monitorowania reakcji) oraz 1841000-IVD (moduł z termocyklerem)) w połączeniu z oprogramowaniem CFX Manager Dx Software w wersji 3.1.309001022 lub wyższej.

## Ważne informacje przed rozpoczęciem procedury

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

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury

- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki pobrane z dróg oddechowych mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej (15–25°C); zalecane jest jednak trzymanie próbek na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym.
- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki śliny mogą być przechowywane na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym; zalecane jest jednak, aby próbki przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).

- Przed użyciem pozostawić odczynniki SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, SARS-CoV-2 Positive Control i wodę do stosowania jako NTC do całkowitego rozmrożenia w temperaturze pokojowej. Do momentu użycia przechowywać próbki w temperaturze pokojowej i chronić je przed światłem.
- Przed użyciem buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer oraz buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer należy każdy z nich wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy (nie wytrząsać), a następnie krótko je odwirować. W przypadku każdego z pozostałych odczynników jednorodną mieszaninę można otrzymać poprzez pulsacyjne wytrząsanie przez 3–5 sekund lub poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy, a następnie ich krótkie odwirowanie.
- Bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer powoduje inhibicję obecnych w próbkach klinicznych RNaz na potrzeby etapu detekcji; nie jest to jednak roztwór inaktywujący wirusa. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.
- Upewnić się, że warunki określone dla cykli na platformie do reakcji real-time RT-PCR są takie same jak warunki przedstawione w niniejszym protokole.
- W celu uniknięcia wielu cykli zamrażania-rozmrażania można podzielić odczynniki na porcje.
- Przygotować świeżą mieszaninę reakcyjną (<2 godz. przed rozpoczęciem reakcji PCR na płytce).
- W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia próbkę i reakcję real-time RT-PCR należy przygotowywać w odrębnych strefach.

## Procedura:

**Przygotowanie próbek:** W przypadku próbek pobranych z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli) należy wykonać krok 1. W przypadku próbek śliny należy przejść do kroku 2.

1. Próbki pobrane z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli):

- 1a. Energicznie wytrząsać wymazówkę zawierającą próbkę.
  - 1b. Przenieść porcje próbki o objętości 50–200 µl do wolnych od składników reakcji PCR probówek o pojemności 1,5 ml.
  - 1c. Przeprowadzić etap podgrzewania w bloku grzewczym w temperaturze 70°C przez 10 min.
  - 1d. Chłodzić próbki na lodzie przez co najmniej 5 min, po czym trzymać próbki na lodzie lub w temperaturze 4°C.
2. Próbki śliny:
- 2a. Uptynianie (w celu ułatwienia pipetowania): ogrzewać próbkę śliny w temperaturze 95°C przez 15 minut (objętość, pojemnik i urządzenie do ogrzewania można dobrać dowolnie).
  - 2b. Uzyskać jednorodną mieszaninę z próbki, delikatnie pipetując w górę i w dół 8–10 razy.
  - 2c. Przenieść porcję próbki o objętości 50 µl do wolnej od składników reakcji PCR probówki o pojemności 1,5 ml.
  - 2d. Przeprowadzić etap podgrzewania w bloku grzewczym w temperaturze 95°C przez 15 min. Następnie pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej na co najmniej 5 min do momentu przeniesienia próbki do dołka płytki lub probówki w celu wykonania reakcji PCR.
3. Podczas pierwszego użycia zestawu uzupełnić bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer roztworem barwnika ROX Reference Dye.
- 3a. Dodać 32,8 µl barwnika ROX do 1 probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zamknąć wieczko probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX i odwrócić probówkę 3 razy.
  - 3c. Odwirować probówkę z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX, aby zebrać roztwór na dnie probówki.
4. W przypadku analizy pełnej płytki w aparacie CFX96 Dx (96 dołków) przygotować porcje mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control.

- 4a. Przenieść wymaganą objętość odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control zgodnie z Tabelą 8 do nowej, wolnej od składników reakcji PCR probówki o pojemności 1,5 ml.
- 4b. Zamknąć wieczko i odwrócić probówkę 3 razy lub wytrząsać probówkę pulsacyjnie przez 3–5 s.
- 4c. Odwirować probówkę z odczynnikami SARS-CoV-2 Amp Primers i kontrolą IC, aby zebrać roztwór na dnie probówki.

**Tabela 8. Przygotowanie mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC**

Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Liczba reakcji Objętość (µl)	
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	96 reakcji (+ nadwyżka 20%*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2	
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopii/µl	10 kopii/µl	1,5	172,8	
Łączna objętość mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008	

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

5. Przygotować mieszaninę reakcyjną zgodnie z Tabelą 9 i dokładnie ją wymieszać, odwracając probówkę 3 razy.

**Tabela 9. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

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

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

6. Dodać 8 µl wody wolnej od nukleaz do dołka przypisanego do kontroli NEC.
7. Dodać 10 µl wody wolnej od nukleaz do dołka przypisanego do kontroli NTC.

8. Dodać 2 µl buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer do każdego dołka przypisanego do kontroli NEC i przygotowanych próbek.
9. Dodać 8 µl przygotowanej próbki do dołka z buforem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
10. Dodać 15 µl mieszaniny reakcyjnej przygotowanej w kroku 5 do dołków przeznaczonych na próbki i kontrole (patrz przykład na Ryc. 4). Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
11. Dodać 10 µl kontroli SARS-CoV-2 Positive Control do odpowiedniego dołka. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
12. Dobrze zakleić płytkę do reakcji PCR folią, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu. Przyłożyć równomierny nacisk na całą płytkę, aby dobrze uszczelnić wszystkie pojedyncze dołki.
13. Krótко odwirować płytkę do reakcji PCR, aby zebrać płyn na dnie dołków.
14. Przejść do obszaru **CFX Manager Dx Software** (Oprogramowanie CFX Manager Dx Software) > **Startup Wizard** (Kreator uruchamiania) i dla opcji **Run type** (Typ reakcji) wybrać wartość **User defined** (Definiowany przez użytkownika).
15. Karta **Protocol** (Protokół): Ustawić program reakcji real-time RT-PCR dla reakcji o objętości 25 µl zgodnie z danymi podanymi w Tabeli 10.

**Uwaga:** W oknie **Protocol Editor** (Edytor protokołów) kliknąć przycisk **Step Options** (Opcje kroków) w celu ustawienia tempa zmiany o wartości 1,6°C/s w każdym z 4 kroków programu reakcji RT-PCR.

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

**Uwaga:** Szczegółowe informacje przedstawiono w dokumencie *CFX96 Dx — Instrukcja użycia*.
16. Karta **Plate** (Płytką): Wybrać używane dołki i zastosować barwniki reporterowe FAM, HEX i Cy5.
17. Umieścić płytkę w cyklerze do reakcji real-time (przykładowy układ płytki do reakcji PCR przedstawiono na Ryc. 4).

18. Karta **Start Run** (Rozpoczynanie reakcji): kliknąć przycisk Start the run (Rozpocznij reakcję), aby rozpocząć reakcję.
19. Po zakończeniu reakcji przeanalizować wyniki (patrz część Wyniki).

**Tabela 10. Program reakcji SARS-CoV-2 Prep&Amp UM wykonywanej w aparacie CFX96 Dx**

Kroki	Czas	Temperatura (°C)	Tempo zmiany (°C/sekundę)	Liczba powtórzeń	Rejestracja
1. Odwrotna transkrypcja	10 min	50	1,6	1	Nie
2. Początkowa aktywacja cieplna reakcji PCR	2 min	95	1,6	1	Nie
Cykl 2-etapowy				39*	
Denaturacja	5 s	95	1,6	1	Nie
Hybrydyzacja/wydłużanie	30 s	58	1,6	1	FAM, HEX i Cy5

\* Aparat CFX pracuje na zasadzie wykonywania powtórzeń. Aby program wykonał 40 cykli, dla cyklu 2-etapowego należy ustawić 39 powtórzeń (krok 5 „GOTO” (Przejdź do) w oprogramowaniu).

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

**Ryc. 4. Przykładowy układ płytki w aparacie CFX96 Dx**

# Protokół: Przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie cobas z 480

Ten protokół określa sposób przygotowania próbek i reakcji real-time RT-PCR w celu detekcji docelowych sekwencji wirusa SARS-CoV-2 w przechowywanych w podłożu transportowym ludzkich próbkach wymazów z nosa, nosogardzieli lub ustnej części gardła oraz w czystych próbkach śliny przy użyciu aparatu cobas z 480 w połączeniu z oprogramowaniem LightCycler 480 SW UDF w wersji 2.0.0 (lub wyższej).

Ważne informacje przed rozpoczęciem procedury.

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

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury.

- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki pobrane z dróg oddechowych mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej; zalecane jest jednak trzymanie próbek na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym.
- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki śliny mogą być przechowywane na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym; zalecane jest jednak, aby próbki przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).

- Przed użyciem pozostawić odczynniki SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, SARS-CoV-2 Positive Control i wodę do stosowania jako NTC do całkowitego rozmrożenia w temperaturze pokojowej (15–25°C). Do momentu użycia przechowywać próbki w temperaturze pokojowej i chronić je przed światłem.
- Przed użyciem buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer oraz buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer należy każdy z nich wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy (nie wytrząsać), a następnie krótko je odwirować. W przypadku każdego z pozostałych odczynników jednorodną mieszaninę można otrzymać poprzez pulsacyjne wytrząsanie przez 3–5 sekund lub poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy, a następnie ich krótkie odwirowanie.
- Bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer powoduje inhibicję obecnych w próbkach klinicznych RNaz na potrzeby etapu detekcji; nie jest to jednak roztwór inaktywujący wirusa. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.
- Upewnić się, że warunki określone dla cykli na platformie do reakcji real-time RT-PCR są takie same jak warunki przedstawione w niniejszym protokole.
- W celu uniknięcia wielu cykli zamrażania-rozmrażania można podzielić odczynniki na porcje.
- Przygotować świeżą mieszaninę reakcyjną (<2 godz. przed rozpoczęciem reakcji real-time RT-PCR na płytce).
- W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia próbkę i reakcję real-time RT-PCR należy przygotowywać w odrębnych strefach.

## Procedura:

**Przygotowanie próbki:** W przypadku próbek pobranych z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli) należy wykonać krok 1. W przypadku próbek śliny należy przejść do kroku 2.

1. Próbki pobrane z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli):



- 1a. Energicznie wytrząsać wymazówkę zawierającą próbkę.
  - 1b. Przenieść porcje próbki o objętości 50–200 µl do wolnych od składników reakcji PCR probówek o pojemności 1,5 ml.
  - 1c. Przeprowadzić etap podgrzewania w bloku grzewczym w temperaturze 70°C przez 10 min.
  - 1d. Chłodzić próbki na lodzie przez co najmniej 5 min, po czym trzymać próbki na lodzie lub w temperaturze 4°C.
2. Próbki śliny:
- 2a. Uptynianie (w celu ułatwienia pipetowania): ogrzewać próbkę śliny w temperaturze 95°C przez 15 minut (objętość, pojemnik i urządzenie do ogrzewania można dobrać dowolnie).
  - 2b. Uzyskać jednorodną mieszaninę z próbki, delikatnie pipetując w górę i w dół 8–10 razy.
  - 2c. Przenieść porcję próbki o objętości 50 µl do wolnej od składników reakcji PCR probówki o pojemności 1,5 ml.
  - 2d. Wykonać etap ogrzewania w temperaturze 95°C przez 15 minut w bloku grzewczym, następnie pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej na co najmniej 5 min do momentu przeniesienia próbki do dołka płytki lub probówki w celu wykonania reakcji PCR.
3. Podczas pierwszego użycia zestawu uzupełnić bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer roztworem barwnika ROX Reference Dye.
- 3a. Dodać 32,8 µl barwnika ROX do 1 probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zamknąć wieczko probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX i odwrócić probówkę 3 razy.
  - 3c. Odwirować probówkę z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX, aby zebrać roztwór na dnie probówki.
4. W przypadku analizy pełnej płytki w aparacie cobas z 480 (96 dołków) przygotować porcje mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control.

- 4a. Przenieść wymaganą objętość odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control zgodnie z Tabelą 11 do nowej, wolnej od składników reakcji PCR probówki o pojemności 1,5 ml.
- 4b. Zamknąć wieczko i odwrócić probówkę 3 razy lub wytrząsać probówkę pulsacyjnie przez 3–5 s.
- 4c. Odwirować probówkę z odczynnikami SARS-CoV-2 Amp Primers i kontrolą IC, aby zebrać roztwór na dnie probówki.

**Tabela 11. Przygotowanie mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC**

Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Liczba reakcji Objętość (µl)
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	96 reakcji (+ nadwyżka 20%*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopii/µl	10 kopii/µl	1,5	172,8
Łączna objętość mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

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

5. Przygotować mieszaninę reakcyjną zgodnie z Tabelą 12 i dokładnie ją wymieszać, odwracając probówkę 3 razy.

**Tabela 12. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

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

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

6. Dodać 8 µl wody wolnej od nukleaz do dołka przypisanego do kontroli NEC.

7. Dodać 10 µl wody wolnej od nukleaz do dołka przypisanego do kontroli NTC.
8. Dodać 2 µl buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer do każdego dołka przypisanego do kontroli NEC i przygotowanych próbek.
9. Dodać 8 µl przygotowanej próbki do dołka z buforem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
10. Dodać 15 µl mieszaniny reakcyjnej przygotowanej w kroku 5 do dołków przeznaczonych na próbki i kontrole (patrz przykład na Ryc. 5). Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
11. Dodać 10 µl kontroli SARS-CoV-2 Positive Control do odpowiedniego dołka. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
12. Dobrze zakleić płytkę do reakcji PCR folią, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu. Przyłożyć równomierny nacisk na całą płytkę, aby dobrze uszczelnić wszystkie pojedyncze dołki.
13. Krótко odwirować płytkę do reakcji PCR, aby zebrać płyn na dnie dołków.
14. **Pierwsze użycie:** W oprogramowaniu Light Cycler 480 SW UDF w wersji 2.0.0 kliknąć opcję **Open tools** (Otwórz narzędzia), a następnie wybrać opcję **Detection formats** (Formaty detekcji) w celu ustawienia następujących kombinacji wzbudzenie-emisja: 465-510 (FAM), 540-580 (HEX) i 610-670 (ATTO647N).
15. Ustawić program reakcji real-time RT-PCR dla reakcji o objętości 25 µl zgodnie z danymi podanymi w Tabeli 13.

**Uwaga:** U góry strony wybrać opcję **Detection format** (Format detekcji), a następnie wybrać format detekcji utworzony w kroku 14.

**Uwaga:** Ustawić niestandardową wartość tempa zmiany wynoszącą 1,6°C/sekundę w każdym z 5 kroków programu reakcji real-time RT-PCR.

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

**Uwaga:** Szczegółowe informacje przedstawiono w dokumencie *cobas z 480 — Instrukcja użycia*.

16. Umieścić płytkę w cyklerze do reakcji real-time (przykładowy układ płytki do reakcji PCR przedstawiono na Ryc. 5).
17. Rozpocząć reakcję.
18. Po zakończeniu reakcji przeanalizować wyniki (patrz część Wyniki).

**Tabela 13. Program reakcji SARS-CoV-2 Prep&Amp UM wykonywanej w aparacie cobas z 480**

Kroki	Czas	Temperatura (°C)	Tempo zmiany (°C/sekundę)	Liczba cykli	Tryb analizy
Odwrotna transkrypcja	10 min	50	1,6	1	Brak
Początkowa aktywacja cieplna reakcji PCR	2 min	95	1,6	1	Brak
Cykl 2-etapowy				40	Ilościowa
Denaturacja	5 s	95	1,6		Brak
Hybrydyzacja/wydłużanie	30 s	58	1,6		Pojedyncza
Chłodzenie	1 min	37	1,6	1	Brak

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

**Ryc. 5. Przykładowy układ płytki w aparacie cobas z 480**

# Protokół: Przygotowanie próbki i detekcja wirusa SARS-CoV-2 w aparacie QuantStudio 5 Dx

Ten protokół jest przeznaczony do przygotowywania próbek i detekcji docelowych sekwencji wirusa SARS-CoV-2 w przechowywanych w podłożu transportowym ludzkich próbkach wymazów z nosa, nosogardzieli lub ustnej części gardła oraz w czystych próbkach śliny przy użyciu aparatu QuantStudio 5 Dx przeznaczonego do przeprowadzania reakcji real-time RT-PCR.

Ważne informacje przed rozpoczęciem procedury.

- Upewnić się, że nie upłynęły terminy ważności nadrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu oraz że przestrzegane są warunki przechowywania. Nie należy używać składników z przekroczonym terminem ważności ani niewłaściwie przechowywanych.
- Używać skalibrowanego sprzętu konserwowanego zgodnie z harmonogramem.
- Zachować ostrożność, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia próbek RNazami podczas eksperymentu. Używać sprzętów z tworzywa sztucznego wolnych od nukleaz.
- W przypadku korzystania z aparatu QuantStudio 5 Dx przed pierwszym użyciem do próbki z mieszaniną Master Mix należy dodać barwnik ROX.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury

- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki pobrane z dróg oddechowych mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej; zalecane jest jednak trzymanie próbek na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym.
- Podczas kroków przygotowywania próbek i przygotowywania reakcji próbki śliny mogą być przechowywane na lodzie lub w temperaturze 4°C na statywie chłodzącym; zalecane jest jednak, aby próbki przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- W przypadku korzystania z aparatu QuantStudio 5 należy używać barwnika ROX.

- Przed użyciem pozostawić odczynniki SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, SARS-CoV-2 Positive Control i wodę do stosowania jako NTC do całkowitego rozmrożenia w temperaturze 15–25°C. Do momentu użycia przechowywać próbki w temperaturze pokojowej i chronić je przed światłem.
- Przed użyciem buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer oraz buforu SARS-CoV-2 UM Amp Buffer należy każdy z nich wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy (nie wytrząsać), a następnie krótko je odwirować. W przypadku każdego z pozostałych odczynników jednorodną mieszaninę można otrzymać poprzez pulsacyjne wytrząsanie przez 3–5 sekund lub poprzez odwrócenie probówek 2–3 razy, a następnie ich krótkie odwirowanie.
- Bufor SARS-CoV-2 UM Prep Buffer powoduje inhibicję obecnych w próbkach klinicznych RNaz na potrzeby etapu detekcji; nie jest to jednak roztwór inaktywujący wirusa. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.
- Upewnić się, że warunki określone dla cykli na platformie do reakcji real-time RT-PCR są takie same jak warunki przedstawione w niniejszym protokole.
- W celu uniknięcia wielu cykli zamrażania-rozmrażania można podzielić odczynniki na porcje.
- Przygotować świeżą mieszaninę reakcyjną (<2 godz. przed rozpoczęciem reakcji real-time RT-PCR na płytce).
- W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia próbkę i reakcję real-time RT-PCR należy przygotowywać w odrębnych strefach.

## Procedura

**Przygotowanie próbek:** W przypadku próbek pobranych z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli) należy wykonać krok 1. W przypadku próbek śliny należy przejść do kroku 2.

1. Próbki pobrane z dróg oddechowych (wymazy z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli):
  - 1a. Energicznie wytrząsać wymazówkę zawierającą próbkę.

- 1b. Przenieść porcje próbki o objętości 50–200 µl do wolnych od składników reakcji PCR probówek o pojemności 1,5 ml.
  - 1c. Przeprowadzić etap podgrzewania w bloku grzewczym w temperaturze 70°C przez 10 min.
  - 1d. Chłodzić próbki na lodzie przez co najmniej 5 min, po czym trzymać próbki na lodzie lub w temperaturze 4°C.
2. Próbki śliny:
- 2a. Upłynnić (w celu ułatwienia pipetowania): ogrzewać próbkę śliny w temperaturze 95°C przez 15 minut (objętość, pojemnik i urządzenie do ogrzewania można dobrać dowolnie).
  - 2b. Uzyskać jednorodną mieszaninę z próbki, delikatnie pipetując w górę i w dół 8–10 razy.
  - 2c. Przenieść porcję próbki o objętości 50 µl do wolnej od składników reakcji PCR probówki o pojemności 1,5 ml.
  - 2d. Wykonać etap ogrzewania w temperaturze 95°C przez 15 minut w bloku grzewczym, następnie pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej na co najmniej 5 min do momentu przeniesienia próbki do dołka płytki lub probówki w celu wykonania reakcji PCR.
3. Podczas pierwszego użycia zestawu uzupełnić bufor SARS-CoV-2 UM Amp Buffer roztworem barwnika ROX Reference Dye.
- 3a. Dodać 32,8 µl barwnika ROX do probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zamknąć wieczko probówki z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX i odwrócić probówkę 3 razy.
  - 3c. Odwirować probówkę z buforem SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i barwnikiem ROX, aby zebrać roztwór na dnie probówki.
4. W przypadku analizy pełnej płytki w aparacie QuantStudio 5 Dx (96 dołków) przygotować porcje mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control.

- 4a. Przenieść wymaganą objętość odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers i kontroli SARS-CoV-2 Internal Control zgodnie z Tabelą 14 do nowej, wolnej od składników reakcji PCR próbówki o pojemności 1,5 ml.
- 4b. Zamknąć wieczko i odwrócić próbówkę 3 razy lub wytrząsać próbówkę pulsacyjnie przez 3–5 s.
- 4c. Odwirować próbówkę z odczynnikami SARS-CoV-2 Amp Primers i kontrolą IC, aby zebrać roztwór na dnie próbówki.

**Tabela 14. Przygotowanie mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC**

Mieszanina odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Liczba reakcji Objętość (µl)
Odczynniki	Stężenie roztworu podstawowego	Stężenie końcowe	1 reakcja	96 reakcji (+ nadwyżka 20%*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 kopii/µl	10 kopii/µl	1,5	172,8
Łączna objętość mieszaniny odczynnika SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

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

5. Przygotować mieszaninę reakcyjną zgodnie z Tabelą 15 i dokładnie ją wymieszać, odwracając próbówkę 3 razy.

**Tabela 15. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

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

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

6. Dodać 8 µl wody wolnej od nukleaz do dołka przypisanego do kontroli NEC.



7. Dodać 10 µl wody wolnej od nukleaz do dołka przypisanego do kontroli NTC.
8. Dodać 2 µl buforu SARS-CoV-2 UM Prep Buffer do każdego dołka przypisanego do kontroli NEC i przygotowanych próbek.
9. Dodać 8 µl przygotowanej próbki do dołka z buforem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
10. Dodać 15 µl mieszaniny reakcyjnej przygotowanej w kroku 5 do dołków przeznaczonych na próbki i kontrole (patrz przykład na Ryc. 6). Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
11. Dodać 10 µl kontroli SARS-CoV-2 Positive Control do odpowiedniego dołka. Wymieszać, pipetując w górę i w dół 5 razy.
12. Dobrze zakleić płytkę do reakcji PCR folią, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu. Przyłożyć równomierny nacisk na całą płytkę, aby dobrze uszczelnić wszystkie pojedyncze dołki.
13. Krótко odwirować płytkę do reakcji PCR, aby zebrać płyn na dnie dołków.
14. **Pierwsze użycie:** Przed rozpoczęciem reakcji w oprogramowaniu QuantStudio 5 Dx IVD należy najpierw wygenerować szablon w oprogramowaniu QuantStudio 5 Dx TD w wersji 1.0.1 lub wyższej, a następnie go opublikować. Należy odpowiednio ustawić szablon:

**Uwaga:** Na karcie **Properties** (Właściwości) dla opcji **Experiment type**

(Typ eksperymentu) ustawić wartość **Standard Curve** (Krzywa wzorcowa), natomiast dla opcji **Run mode** (Tryb reakcji) ustawić wartość **Standard** (Standardowy).

**Uwaga:** Na karcie **Method** (Metoda) ustawić program reakcji real-time RT-PCR dla reakcji o objętości 25 µl (Tabela 16).

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

**Uwaga:** Na karcie **Plate** (Płytką) jako pasywny barwnik referencyjny (opcja **Passive Reference** (Pasywny referencyjny)) wybrać barwnik **ROX** i ustawić barwniki FAM, VIC i Cy5 jako wartości dla opcji **Targets** (Barwniki docelowe) bez wygaszacza (dla opcji **Quencher** (Wygaszacz) należy zatem ustawić wartość **None** (Brak)).

**Uwaga:** Szczegółowe informacje przedstawiono w dokumencie *QuantStudio 5 Dx — Instrukcja użycia*.

15. W oprogramowaniu QuantStudio 5 Dx IVD Software załadować szablon utworzony w kroku 14. Wybrać używane dołki i zastosować dla nich barwniki docelowe FAM, VIC i Cy5.
16. Umieścić płytkę w cyklerze do reakcji real-time (przykładowy układ płytki do reakcji PCR przedstawiono na Ryc. 6).
17. Rozpocząć reakcję.
18. Po zakończeniu reakcji przeanalizować wyniki (patrz część Wyniki).

**Tabela 16. Program reakcji SARS-CoV-2 Prep&Amp UM wykonywanej w aparacie QuantStudio 5 Dx**

Etap	Krok	Czas	Temperatura (°C)	Liczba cykli	Rejestracja
Wstrzymanie	1. Odwrotna transkrypcja	10 min	50	1	Nie
	2. Początkowa aktywacja cieplna reakcji PCR	2 min	95	1	Nie
PCR	Cykl 2-etapowy			40	
	Denaturacja	5 s	95	1	Nie
	Hybrydyzacja/wydłużanie	30 s	58	1	FAM, VIC i Cy5

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

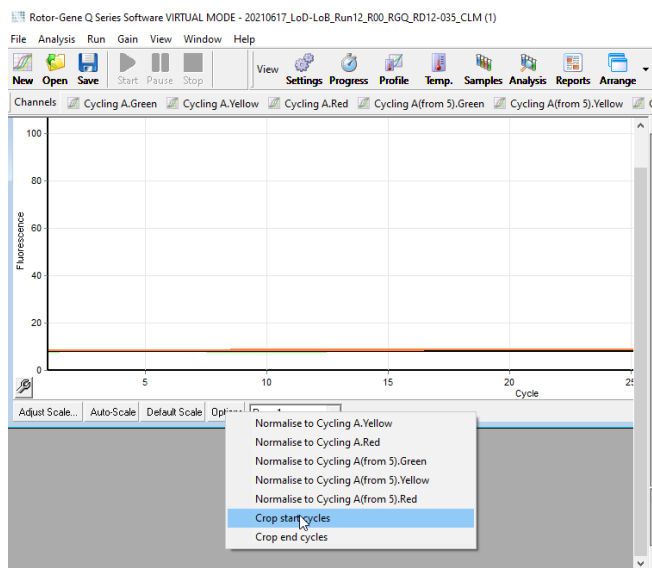
**Ryc. 6. Przykładowy układ płytki w aparacie QuantStudio 5 Dx**

# Wyniki

## Analiza wykonywana w aparacie RGQ MDx 5plex HRM

W przypadku aparatu RGQ MDx 5plex HRM dane są analizowane przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene Q w wersji 2.3.1 (lub wyższej) zgodnie z instrukcjami producenta (Podręcznik użytkownika aparatu Rotor-Gene Q MDx, wersja 7, wrzesień 2018 r.).

W przypadku analizy danych należy zastosować opcję przycinania cykli (Ryc. 7): Otworzyć nieprzetworzony kanał **Cycling A.Green**. Wybrać opcje **Options** (Opcje) > **Crop Start Cycles** (Przytnij cykle początkowe), a następnie w oknie dialogowym wprowadzić wartość **5**. Zostanie wygenerowany nowy kanał o nazwie **Cycling A(from 5).Green**. W ten sam sposób należy ustawić wartości dla nieprzetworzonych kanałów Red i Yellow, aby wygenerować kanały **Cycling A(from 5).Red** i **Cycling A(from 5).Yellow**.



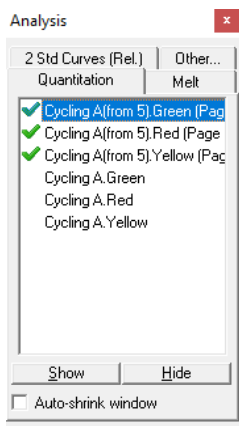
Ryc. 7. Zrzut ekranu przedstawiający ustawienie opcji przycinania cykli w przypadku analizy wykonywanej w aparacie RGQ MDx 5plex HRM.

Otworzyć menu analizy (Ryc. 8) i dla każdego wygenerowanego kanału Cycling A(from 5) **zastosować** następujące parametry analizy w celu zachowania spójności pomiędzy różnymi analizami (Tabela 17).

**Tabela 17. Parametry analizy w przypadku aparatu RGQ MDx 5plex HRM**

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

W oprogramowaniu RGQ wyniki reakcji są dostępne w siatce wyników ilościowych otwartej podczas analizy. Dane można wyeksportować w formacie .csv (wartości rozdzielane przecinkami): w oknie dialogowym RGQ Software (Oprogramowanie RGQ) wybrać opcje **File (Plik) > Save as (Zapisz jako) > Excel analysis sheet (Arkusze Excel do analizy)**. Przed wyeksportowaniem wyników upewnić się, że wybrano wszystkie próbki (Ryc. 8).



Ryc. 8. Zrzut ekranu przedstawiający kanały wybrane do zastosowania parametrów analizy i wyeksportowania wyników (analiza wykonywana w aparacie RGQ MDx 5plex HRM).

## Analiza wykonywana w aparacie ABI 7500 Fast Dx

W przypadku aparatu ABI 7500 Fast Dx dane są analizowane przy użyciu oprogramowania 7500 Fast System Software w wersji 1.4.1 (lub wyższej) zgodnie z instrukcjami producenta. Na karcie **Setup** (Konfiguracja) wybrać grupę dołków przeznaczonych do analizy lub analizę całej płytki, a następnie kliknąć prawym przyciskiem, aby otworzyć okna kontrolera dołków. Należy wybrać 3 fluorofory (FAM, VIC i Cy5) i określić barwnik **ROX** jako referencyjny barwnik pasywny (opcja **Passive reference** (Referencyjny pasywny)). W celu zapewnienia spójności między różnymi analizami należy uwzględnić określone poniżej parametry (Tabela 18).

Tabela 18. Parametry analizy w przypadku aparatu ABI 7500 Fast Dx

Kanały	FAM	Cy5	VIC
Barwnik pasywny	ROX	ROX	ROX
Wartość progowa fluorescencji	0,13	0,025	0,05
Ustawienie linii odniesienia	Auto	Auto	Auto
Cykle graniczne	Wartość Ct >39,00 jest uznawana za równą 40,00	Nie	Wartość Ct >35,00 jest uznawana za równą 40,00

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

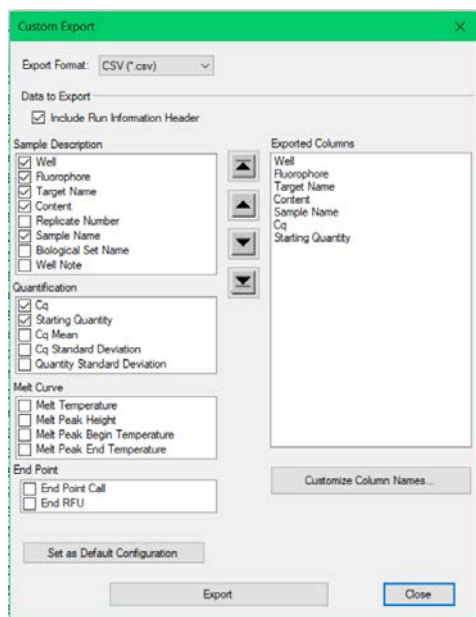
## Analiza wykonywana w aparacie CFX96 Dx

W przypadku aparatu CFX96 Dx dane są analizowane przy użyciu oprogramowania CFX Manager Dx Software w wersji 3.1.3090.1022 (lub wyższej) zgodnie z instrukcjami producenta. Dla wszystkich dołków używanych w eksperymencie należy wybrać barwniki FAM, HEX i Cy5. W celu zapewnienia spójności między różnymi analizami należy uwzględnić określone poniżej parametry (Tabela 19).

**Tabela 19. Parametry analizy wykonywanej w aparacie CFX96 Dx**

Kanały	FAM	HEX	Cy5
Tryb określania wartości Cq: jedna wartość progowa	Tak	Tak	Tak
Ustawianie linii odniesienia:			
• dopasowanie krzywej po odjęciu linii odniesienia	Tak	Tak	Tak
• korekta przesunięcia fluorescencji	Tak	Tak	Tak
Wartość progowa (RFU)	250	300	100
Cykle graniczne	Wartość Ct >39,00 jest uznawana za równą 40,00	Wartość Ct >35,00 jest uznawana za równą 40,00	Nie

W oprogramowaniu CFX manager Dx Software wartości Ct (nazywane w oprogramowaniu wartościami **Cq**) dla wybranej grupy dołków lub całej płytki są dostępne w arkuszu danych w obszarze **Quantification Data** (Dane ilościowe). Dane można wyeksportować w formacie .csv (wartości rozdzielane przecinkami) poprzez wybranie kolejno opcji **Export** (Eksportuj) > **Custom Export** (Eksport niestandardowy) i ustawienie parametrów zgodnie z Ryc. 9.



Ryc. 9. Parametry pliku danych surowych w aparacie CFX96 Dx

## Analiza wykonywana w aparacie cobas z 480

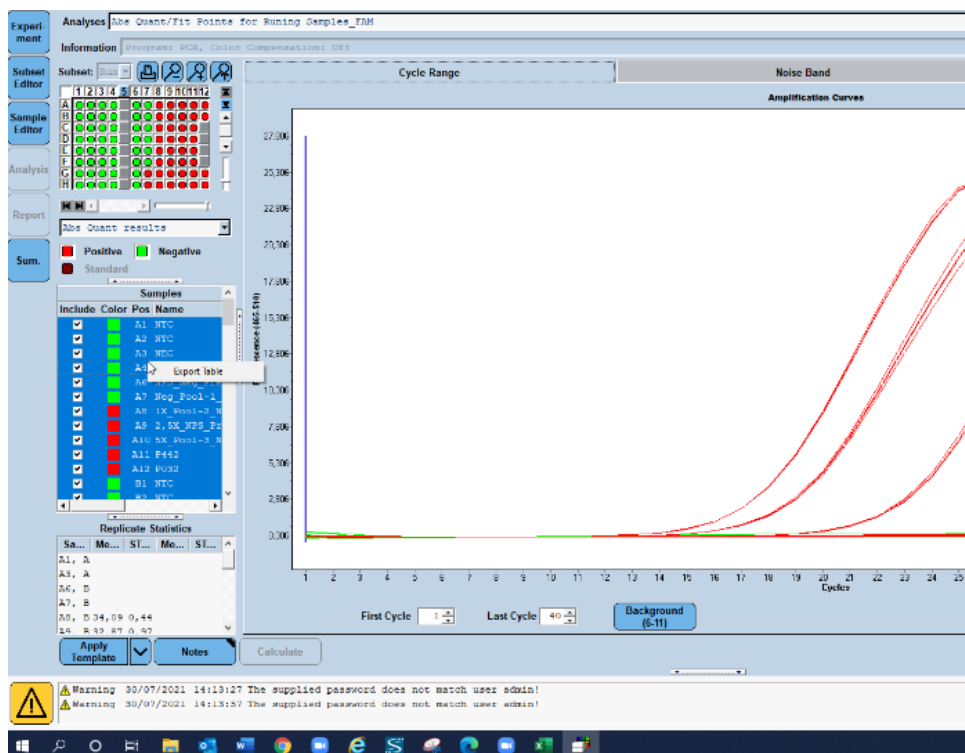
W przypadku aparatu cobas z 480 dane są analizowane przy użyciu oprogramowania LightCycler 480 SW UDF w wersji 2.0.0 (lub wyższej) zgodnie z instrukcjami producenta. Należy utworzyć podzbiór próbek wyłącznie z dołkami używanymi w eksperymencie. Dla poszczególnych kanałów należy utworzyć stronę analizy **Abs Quant/Fit Points** (Bezwzględne oznaczenie ilościowe/Punkty dopasowania) i ustawić dla nich poniższe parametry, aby zachować spójność między różnymi eksperymentami (Tabela 20).

Tabela 20. Parametry analizy wykonywanej w aparacie cobas z 480

Kanały	FAM (465-510)	HEX (540-580)	ATTO647N (610-670)
<b>Karta Cycle range</b> (Zakres cyklu)	1–40	1–40	6–40
• Pierwszy–ostatni cykl			
• Tło	5/10	5/10	6/11
<b>Karta Noise band</b> (Pasma szumu)	Mnożnik STD	Mnożnik STD	Mnożnik STD
• Metoda			
• Wartość mnożnika STD	50	40	25
<b>Karta Analysis</b> (Analiza)	2	2	2
• Punkty dopasowania			
• Metoda wyznaczania wartości progowej	Auto	Auto	Auto
<b>Cykl graniczny</b>	Wartość Ct >39,00 jest uznawana za równą 40,00	Wartość Ct >35,00 jest uznawana za równą 40,00	Nie

W oprogramowaniu LightCycler 480 SW UDF w wersji 2.0.0 (lub wyższej) wartości Ct (nazywane w oprogramowaniu wartościami **Cp**) wybranej grupy dołków lub całej płytki są dostępne w obszarze **analysis** (Analiza) (Ryc. 10). Dane dla poszczególnych kanałów mogą być eksportowane w formacie pliku tekstowego (**.txt**). Prawym przyciskiem należy kliknąć tabelę wyników i wybrać opcję **Export table** (Eksportuj tabelę).





Ryc. 10. Zrzut ekranu przedstawiający dane eksportowane w oprogramowaniu LightCycler 480 SW UDF w wersji 2.0.0 (lub wyższej).

## Analiza wykonywana w aparacie QuantStudio 5 Dx

W przypadku aparatu QuantStudio 5 Dx dane są analizowane przy użyciu oprogramowania QuantStudio 5 Dx IVD Software w wersji 1.0.1 (lub wyższej) zgodnie z instrukcjami producenta. W oknie **Assign Targets and Samples** (Przypisywanie barwników docelowych i próbek) dla wszystkich dołków używanych w eksperymencie należy wybrać 3 fluorofory (FAM, VIC i Cy5) i określić barwnik **ROX** jako referencyjny barwnik pasywny (opcja **Passive reference** (Referencyjny pasywny)). W celu zapewnienia spójności między różnymi analizami należy uwzględnić określone poniżej parametry (Tabela 21).

Tabela 21. Parametry analizy wykonywanej w aparacie QuantStudio 5 Dx

Kanały	FAM	VIC	Cy5
Barwnik pasywny	ROX	ROX	ROX
Wartość progowa fluorescencji	0,21	0,062	0,04
Ustawienie linii odniesienia	Auto	Auto	Auto
Cykle graniczne	Wartość Ct >39,00 jest uznawana za równą 40,00	Wartość Ct >35,00 jest uznawana za równą 40,00	Nie

Dane mogą być eksportowane w formie arkusza kalkulacyjnego lub pliku tekstowego (.xls, .xlsx, .txt). Na karcie **Export** (Eksport) dostępnej w oknie oprogramowania QuantStudio 5 Dx IVD Software należy wybrać wszystkie opcje dostępne w obszarze **Content** (Zawartość), a następnie wybrać opcję **Unify the above content into one file** (Zawrzyj powyższą zawartość w jednym pliku).

# Interpretacja wyników

Kontrola pozytywna (Positive Control, PC), regiony N1 i N2 są wykrywane w kanale fluorescencyjnym Green aparatu RGQ MDx 5plex HRM lub kanale fluorescencyjnym barwnika FAM aparatu ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 lub QuantStudio 5 Dx.

Kontrola przygotowania próbki w postaci genu RNazy P jest wykrywana w kanale fluorescencyjnym Yellow aparatu RGQ MDx 5plex HRM lub w kanale fluorescencyjnym barwnika VIC/HEX aparatu ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 lub QuantStudio 5 Dx. W każdej klinicznej próbce powinien być obecny sygnał wskazujący na amplifikację kontroli przygotowania próbki. W przypadku kontroli PC amplifikacja w kanale Yellow może być obserwowana pomimo braku sekwencji ludzkich. W takim przypadku można pominąć sygnał kontroli PC w kanale Yellow, ponieważ silny sygnał fluorescencyjny w kanale Green może „przenikać” do kanału Yellow. Kontrola wewnętrzna (Internal Control, IC) jest zawarta w odczynniku SARS-CoV-2 Amp Primers. Jest ona wykrywana w kontroli bez matrycy (No Template Control, NTC), kontroli bez izolacji (No Extraction Control, NEC), kontroli pozytywnej (Positive Control, PC) oraz w próbkach klinicznych w kanale fluorescencyjnym Red aparatu RGQ MDx 5plex HRM lub w kanale fluorescencyjnym barwnika Cy5/ATTO647N aparatu ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 lub QuantStudio 5 Dx. Aby reakcja real-time RT PCR została uznana za ważną, dla kontroli PC, NTC i NEC muszą zostać uzyskane wyniki opisane w Tabeli 22 i Tabeli 23.

**Tabela 22. Kryteria ważności reakcji i interpretacja wyników w przypadku aparatu RGQ MDx 5plex HRM**

Kontrola	Detekcja w kanale Green	Detekcja w kanale Yellow	Detekcja w kanale Red	Interpretacja
<b>Kontrola pozytywna (Positive Control, PC)</b>	Ct ≤38,00	Obojętna	Obojętna	Prawidłowa kontrola PC.
	Ct >38,00 lub brak wartości Ct	Obojętna	Obojętna	Nieprawidłowa kontrola PC.
<b>Kontrola bez matrycy (No Template Control, NTC) lub kontrola bez izolacji (No Extraction Control, NEC)</b>	Ct >38,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Tak	Prawidłowa kontrola NTC/NEC.
	Wszystkie pozostałe kombinacje z amplifikacją w kanale Green lub Yellow		Obojętna	Nieprawidłowa kontrola NTC/NEC.

Tabela 23. Kryteria ważności reakcji i interpretacja wyników w przypadku aparatów ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 oraz QuantStudio 5 Dx przeznaczonych do wykonywania reakcji real-time RT-PCR

Kontrola	Detekcja — barwnik FAM*	Detekcja — barwnik VIC/HEX*	Detekcja — barwnik Cy5/ATTO647N*	Interpretacja
<b>Kontrola pozytywna (Positive Control, PC)</b>	Ct ≤39,00	Obojętna	Obojętna	Prawidłowa kontrola PC.
	Ct > 39,00 lub brak wartości Ct	Obojętna	Obojętna	Nieprawidłowa kontrola PC.
<b>Kontrola bez matrycy (No Template Control, NTC) lub Kontrola bez izolacji (No Extraction Control, NEC)</b>	Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Tak	Prawidłowa kontrola NTC/NEC.
	Wszystkie pozostałe kombinacje z amplifikacją w kanale FAM lub VIC/HEX			Obojętna

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

Tabela 24. Kryteria ważności próbki i interpretacja wyników w przypadku aparatu RGQ MDx 5plex HRM

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

**Tabela 25. Kryteria ważności próbki i interpretacja wyników w przypadku aparatów ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 oraz QuantStudio 5 Dx przeznaczonych do wykonywania reakcji real-time RT-PCR.**

<b>Detekcja — barwnik FAM*</b>	<b>Detekcja — barwnik VIC/HEX*</b>	<b>Detekcja — barwnik Cy5/ATTO647N*</b>	<b>Interpretacja</b>
Ct ≤39,00	Obojętna	Obojętna	Próbka jest pozytywna.
Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Ct ≤35,00	Obojętna	Próbka jest negatywna, nie wykryto wirusa SARS-CoV-2.
Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Tak	Nieważna próbka. Nie wykryto materiału ludzkiego. Wymagane ponowne pobranie próbki.
Ct >39,00 lub brak wartości Ct	Ct >35,00 lub brak wartości Ct	Nie	Nieważna próbka. Wystąpiła inhibicja reakcji realtime RT-PCR. Wymagane powtórzenie testu.

# Ograniczenia

- Wyłącznie do celów diagnostyki *in vitro*.
- Wyniki uzyskane za pomocą zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nie mogą być traktowane jako wyłączna podstawa do postawienia diagnozy, wyboru leczenia ani podejmowania innych decyzji dotyczących terapii pacjenta. Wyniki negatywne nie wykluczają zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie mogą być traktowane jako wyłączna podstawa do podejmowania decyzji dotyczących leczenia pacjenta.
- Z produktu może korzystać jedynie personel odpowiednio poinstruowany i przeszkolony w zakresie procedur diagnostycznych *in vitro*.
- W celu uzyskania optymalnych wyników reakcji PCR wymagane jest ściśle przestrzeganie instrukcji podanych w podręczniku użytkownika platformy do wykonywania reakcji real-time RT-PCR (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 lub QuantStudio 5 Dx).
- Należy zwracać uwagę na daty ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.
- Nie ustalono skuteczności tego testu w przypadku próbek śliny pobranych od pacjentów bez przedmiotowych i podmiotowych objawów zakażenia układu oddechowego.
- Aby uniknąć ryzyka uzyskania wyniku fałszywie negatywnego w przypadku próbek klinicznych, dla których uzyskano wynik słabo pozytywny i w których zaobserwowano śladowe ilości krwi, należy ten fakt odnotować i jeśli dla próbek tego typu badanych przy użyciu zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit uzyskano wynik negatywny, należy ponownie pobrać próbkę od pacjenta i zbadać ją przy użyciu zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

# Skuteczność

## Czułość analityczna (granica wykrywalności)

Czułość analityczna lub granica wykrywalności jest definiowana jako najniższe stężenie, przy którym  $\geq 95\%$  badanych próbek daje pozytywny wynik. Granicę LoD wyznaczono, analizując szereg rozcieńczeń negatywnych próbek wymazów z nosogardzieli oraz upłynnionych czystych próbek śliny, do których dodano roztwory podstawowe o wysokim mianie cząstek inaktywowanego wirusa, uzyskane od dostawców komercyjnych (ZeptoMetrix®). Na potrzeby eksperymentów, podczas których wyznaczano granicę LoD, na każdą próbkę przypadały dwie pule próbek. W celu potwierdzenia stężenia odpowiadającego granicy LoD współczynnik detekcji wszystkich powtórzeń dla danego stężenia musiał wynosić  $\geq 95\%$  (sygnał pozytywny wygenerowany dla co najmniej 19 z 20 powtórzeń).

Stężenie odpowiadające granicy LoD zostało określone na podstawie próbek wymazów z nosogardzieli i czystych próbek śliny testowanych przy użyciu platform przeznaczonych do wykonywania reakcji real-time RT-PCR (aparaty RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx oraz cobas z 480).

### Próbki wymazów z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli

Granica LoD w przypadku aparatów RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx i QuantStudio 5 Dx wynosi 950 kopii/ml, natomiast w przypadku aparatu cobas z 480 wynosi 475 kopii/ml (patrz Tabela 26).

### Czyste próbki śliny

Granica LoD w przypadku aparatu RGQ MDx wynosi 950 kopii/ml, natomiast w przypadku aparatów ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx oraz CFX96 Dx wynosi 1200 kopii/ml (patrz Tabela 26).

Tabela 26. Podsumowanie wyników uzyskanych w ramach badania granicy LoD dla poszczególnych platform przeznaczonych do wykonywania reakcji real-time RT-PCR

Platforma	Typ próbki	określona granica LoD (kopie/ml)
RGQ MDx	NPS	950
	Czysta próbka śliny	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Czysta próbka śliny	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Czysta próbka śliny	1200
cobas z 480	NPS	475
	Czysta próbka śliny	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Czysta próbka śliny	1200

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

### Test zróżnicowania

Test zróżnicowania (zakres wykrywanych wirusów) odczynnika *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes oceniono w ramach analizy *in silico* na sekwencjach dostępnych w bazie danych GISAID ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)). Łącznie 722 488 sekwencji (dostępnych: 23/03/2021) przeanalizowano za pomocą narzędzia COVID CG (<https://covidcg.org>); informacje uzupełniono o metadane z bazy danych GISAID. Sekwencje przyrównywano do sekwencji referencyjnej WIV04 (identyczność na poziomie 100% z sekwencją Wuhan-Hu-1/NC\_045512.2, z wyjątkiem długości ogona poli-A) i przeanalizowano wariacje pojedynczego nukleotydu (Single Nucleotide Variation, SNV) w regionie genomu, na które ukierunkowane są statery i sondy z zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Częstość występowania zidentyfikowanych wariacji SNV utrzymywała się na poziomie poniżej 1%, podobnie jak częstość współwystępujących mutacji. Nie stwierdzono obecności żadnej wariacji SNV w ostatnich nukleotydach od końca 3' (nukleotydy od 1 do 3) w odpowiednich oligonukleotydach; wariacje tego typu z dużym prawdopodobieństwem miałyby wpływ na skuteczność testu. Uważa się, że zestaw *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit umożliwia wykrycie wszystkich (100%) opublikowanych sekwencji.



## Test wykluczenia/reaktywność krzyżowa

### Analiza *in silico*

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

Podczas analizy PCR *in silico* przeanalizowano łącznie 36 szczepów bakterii, wirusów i grzybów (Tabela 27); rozmiar potencjalnego amplikonu był ograniczony do 500 pz. Sekwencje patogenów uzyskano z bazy danych NCBI; dla żadnego z tych patogenów nie zaobserwowano jednak amplifikacji *in silico*. Tabela 27 przedstawia listę patogenów przetestowanych *in silico*.

**Tabela 27. Lista patogenów przetestowanych *in silico***

Patogeny	Szczep/typ	Id. taksonomiczny	Wyniki reakcji PCR <i>in silico</i>
Adenowirus typu 3	Typ 3	45659	Brak dopasowania
Adenowirus typu 4	Typ 4	28280	Brak dopasowania
Adenowirus typu 5	Typ 5	28285	Brak dopasowania
Adenowirus typu 7A	Typ 7A	85755	Brak dopasowania
Adenowirus typu 14	Typ 14	10521	Brak dopasowania
Adenowirus typu 31	Typ 31	10529	Brak dopasowania
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Brak dopasowania
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Brak możliwości zajęcia amplifikacji*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Brak dopasowania
Enterowirus	Typ 68	42789	Brak dopasowania

\* Podczas dopasowywania sekwencji stwierdzono homologię na poziomie <80% z jednym z elementów starter/sonda.

† Podczas dopasowywania sekwencji stwierdzono homologię na poziomie ≥80% z jednym z elementów starter/sonda.

(ciąg dalszy na następnej stronie)

Tabela 27. (ciąg dalszy z poprzedniej strony)

Patogeny	Szczep/typ	Id. taksonomiczny	Wyniki reakcji PCR <i>in silico</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus	229E	11137	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus	NL63	277944	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus	HKU-1	290028	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus OC43	OC43	31631	Brak dopasowania
Ludzki koronawirus	MERS-CoV	1335626	Brak dopasowania
Ludzki metapneumowirus	nd.	162145	Brak dopasowania
Wirus grypy A	H1N1	114727	Brak dopasowania
Wirus grypy A	H3N2	119210	Brak dopasowania
Wirus grypy B	nd.	11520	Brak dopasowania
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Brak dopasowania
Wirus paragrypy	Typ 1	12730	Brak dopasowania
Wirus paragrypy	Typ 2	2560525	Brak dopasowania
Wirus paragrypy	Typ 3	11216	Brak dopasowania
Wirus paragrypy	Typ 4	2560526	Brak dopasowania
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Brak dopasowania
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Brak możliwości zajęcia amplifikacji*
Syncytialny wirus oddechowy	Typ A (RSV-A)	208893	Brak dopasowania
Syncytialny wirus oddechowy	Typ B (RSV-B)	208895	Brak dopasowania
Rinowirus	Typ A	147711	Brak dopasowania
Rinowirus	Typ B	147712	Brak dopasowania
Koronawirus SARS	Tor2	694009	Brak możliwości zajęcia amplifikacji†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	nd.	1282	Brak dopasowania
<i>Streptococcus pyogenes</i>	nd.	1314	Brak możliwości zajęcia amplifikacji†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Brak możliwości zajęcia amplifikacji†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Brak dopasowania

\* Podczas dopasowywania sekwencji stwierdzono homologię na poziomie <80% z jednym z elementów starter/sonda.

† Podczas dopasowywania sekwencji stwierdzono homologię na poziomie ≥80% z jednym z elementów starter/sonda.

### Analiza *in vitro*

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

Zakłócenia przebiegu oznaczenia *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wywoływane przez patogeny oceniono w warunkach *in vitro* przy użyciu panelu zawierającego zalecane patogeny (Tabela 28). Próbkę przygotowano, dodając po maksymalnie 5 patogenów (w stężeniu 105 TCID<sub>50</sub>/ml w przypadku cząstek wirusowych,  $10^6$  kopii/ml w przypadku cząstek bakteryjnych i grzybów lub przy maksymalnym stężeniu, które można było uzyskać z roztworu podstawowego) do negatywnych wymazów z nosogardzieli, do których dodano cząstkę inaktywowanego wirusa SARS-CoV-2 w stężeniu  $2,87 \times \text{LoD}$  (Zeptomatrix). Do paneli NATrol™ i cząstek wirusa SARS-CoV-1 bezpośrednio dodano cząstkę inaktywowanego wirusa SARS-CoV-2 v (Zeptomatrix) w stężeniu  $2,87 \times \text{LoD}$ . Poniżej przedstawiono podsumowanie wyników dla każdej przetestowanej puli mikroorganizmów/wirusów wraz z odpowiadającymi im stężeniami.

Tabela 28 przedstawia listę patogenów testowanych pod kątem zakłócenia przebiegu oznaczenia.

Tabela 28. Lista patogenów przetestowanych *in vitro* pod kątem wywoływania zakłóceń przebiegu oznaczenia.

Id. puli/id. próbki	Mikroorganizm/wirus	Źródło	Stężenie końcowe	Jednostka	Wynik
Pula 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Ludzki koronawirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ludzki koronawirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/ml	
	Ludzki koronawirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID50/ml	
	Adenowirus typu 3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Wirus paragrypy typu 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID50/ml	
Pula 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Adenowirus typu 31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/ml	
	Wirus paragrypy typu 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/ml	
	Wirus grypy B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Rinowirus typu 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Pula 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Wirus paragrypy typu 3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3,30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4,60E+06	CFU/ml	

(ciąg dalszy na następnej stronie)

Tabela 28 (ciąg dalszy z poprzedniej strony)

<b>Id. puli/id. próbki</b>	<b>Mikroorganizm/wirus</b>	<b>Źródło</b>	<b>Stężenie końcowe</b>	<b>Jednostka</b>	<b>Wynik</b>
<b>Pula 4</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Adenowirus typu 7A	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1,02E+06	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1,00E+08	CFU/ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
<b>Pula 5</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Syncytialny wirus oddechowy RSV A	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Wirus grypy A H1N1 Kalifornia	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterowirus typu 68, grupa główna	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Adenowirus typu 14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
<b>Pula 6</b>	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	kopie/ml	Brak zakłóceń
	Koronawirus MERS	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Adenowirus typu 4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Ludzki metapneumowirus (hMPV) typu B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Syncytialny wirus oddechowy typu B (RSV- B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(ciąg dalszy na następnej stronie)

Tabela 28 (ciąg dalszy z poprzedniej strony)

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

\*Dostawca nie podał stężenia.

## Substancje zakłócające

### Próbki wymazów z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli

Oceniono wpływ substancji potencjalnie zakłócających (substancje wymienione w Tabeli 29) na skuteczność zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Testy wykonywano na 3 pulach negatywnych wymazów z nosogardzieli i na 3 pulach pozytywnych wymazów z nosogardzieli do których dodano cząstki inaktywowanego wirusa SARS-CoV-2 w stężeniu 4 x LoD (Zeptomatrix). Eksperymenty przeprowadzał 1 operator, korzystając z platformy RGQ MDx 5plex HRM (4 aparaty) i 1 zestawu badanego.

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

Z danych przedstawionych w Tabeli 29 wynika, że żadna z przetestowanych substancji nie zakłóca skuteczności zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w przypadku kanału fluorescencyjnego Green.

Tabela 29. Lista substancji zakłócających i wskaźnik udanych odczytów w kanale Green.

Substancje zakłócające	Przeznaczenie	Badane stężenie	Wskaźnik udanych odczytów dla negatywnych wymazów z nosogardzieli	Wskaźnik udanych odczytów dla pozytywnych (4x LoD) wymazów z nosogardzieli
<b>Tobramycyna</b>	Antybiotyk do stosowania ogólnego	1 mg/ml	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 15/15
<b>Mupirocyna</b>	Maść z antybiotykiem do nosa	6,6 mg/ml	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 15/15
<b>Flutykazon</b>	Kortykosteroid donosowy	5% (o/o)	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 15/15

ciąg dalszy na następnej stronie

Tabela 29 (ciąg dalszy z poprzedniej strony)

Substancje zakłócające	Przeznaczenie	Badane stężenie	Wskaźnik udanych odczytów dla negatywnych wymazów z nosogardzieli	Wskaźnik udanych odczytów dla pozytywnych (4x LoD) wymazów z nosogardzieli
<b>Mentol</b> (pastylki do ssania na dolegliwości gardła)	Doustny środek przeciwbólowy i przeciwzapalny	0,5 mg/ml	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 15/15
<b>Oksymetazolina</b>	Aerozol do nosa	10% (o/o)	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 15/15
<b>Oseltamiwir</b>	Lek przeciwwirusowy	3,3 mg/ml	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 15/15
<b>Mucyna</b> (bydłące gruczoły podszczękowe typu I-S)		2,5 mg/ml	Brak zakłóceń 0/15	Brak zakłóceń 15/15
<b>Krew pełna</b>		4% (o/o)	Brak zakłóceń 1/15*	Brak zakłóceń 15/15

\* Wykryto amplifikację charakterystyczną dla artefaktu.

## Czyste próbki śliny

Oceniono wpływ ośmiu substancji potencjalnie zakłócających (substancje wymienione w Tabeli 30) na skuteczność zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Testy zostały wykonane przy użyciu 1 puli negatywnych czystych próbek śliny, która została podzielona na dwie części w celu przetestowania dwóch poziomów rozcieńczeń: (1) negatywne czyste próbki śliny; (2) sztucznie wytworzone pozytywne czyste próbki śliny (uzyskane poprzez dodanie do negatywnej puli próbek inaktywowanych cząstek wirusa SARS-CoV-2 (Zeptomatrix) w stężeniu 3x LoD (3600 kopii/ml)). Czyste próbki śliny były testowane przy użyciu jednego zestawu komercyjnego, przez 3 operatorów, w jednej platformie cobas z 480.



---

Dla każdej substancji zakłócającej powtórzenia próbki podzielono na 2 części w celu przetestowania substancji zakłócającej rozpuszczonej w rozpuszczalniku (próbka badana) oraz samego rozpuszczalnika (próbka kontrola). Wskaźniki udanych odczytów w kanałach fluorescencyjnych Green, Red i Yellow porównano między próbkami badanymi i odpowiadającymi im próbkami kontrolnymi. W przypadku braku zakłóceń dla próbek badanych i odpowiadających im próbek kontrolnych otrzymywano taki sam wskaźnik udanych odczytów.

W przypadku analizy jakościowej (status próbki) nie wykazano, aby osiem testowanych substancji zakłócających (patrz Tabela 30) miało wpływ na wyniki testów pozytywnych i negatywnych próbek śliny wykonywanych przy użyciu zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

Z danych przedstawionych w Tabeli 30 wynika, że żadna z przetestowanych substancji nie zakłóca skuteczności zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w przypadku kanału fluorescencyjnego Green.

Tabela 30. Lista substancji zakłócających i wskaźnik udanych odczytów w kanale Green.

Substancje zakłócające*	Przeznaczenie	Badane stężenie	Wskaźnik udanych odczytów dla negatywnych czystych próbek śliny	Wskaźnik udanych odczytów dla pozytywnych (od 3 do 5x LoD) czystych próbek śliny
<b>Krew pełna</b>	Substancje endogenne: ludzki gDNA, leukocyty, erytrocyty	1% o/o	Brak zakłóceń* 0/8	Brak zakłóceń* 8/8
<b>Altoids®</b>	Cukierki	2% w/v	Brak zakłóceń 0/8	Brak zakłóceń 8/8
<b>Aspiryna</b>	Lek przeciwzapalny	1% w/v	Brak zakłóceń 0/8	Brak zakłóceń 8/8
<b>Listerine®</b>	Antyseptyczny płyn do płukania jamy ustnej	1% o/o	Brak zakłóceń 0/8	Brak zakłóceń 8/8
<b>Ricola®</b>	Cukierki	1% w/v	Brak zakłóceń 0/8	Brak zakłóceń 8/8
<b>Pasta do zębów Colgate® Total SF Whitening™</b>	Wybielająca pasta do zębów	0,1% w/v	Brak zakłóceń 0/8	Brak zakłóceń 8/8
<b>Syrop Tussidane®</b>	Lek na kaszel suchy	1% o/o	Brak zakłóceń 0/8	Brak zakłóceń 8/8
<b>Pulmofluide®</b>	Lek na kaszel mokry	1% o/o	Brak zakłóceń 0/8	Brak zakłóceń 8/8

\* Zaobserwowano, że krew pełna zakłóca wykrywanie kontroli IC w kanale Red (inhibicja na poziomie 10–40%), lecz nie ma wpływu na ważność próbki. W przypadku kanału Green obecność krwi pełnej nie miała wpływu na stan próbki, lecz zaobserwowano niewielkie przesunięcie punktu Ct (punkt Ct występował średnio o 1,35 cyklu później w przypadku próbek z krwią pełną w porównaniu do próbki kontrolnej).

Aby uniknąć ryzyka uzyskania wyniku fałszywie negatywnego w przypadku próbek klinicznych, dla których uzyskano wynik słabo pozytywny i w których zaobserwowano śladowe ilości krwi, należy ten fakt odnotować i jeśli dla próbek tego typu badanych przy użyciu zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* uzyskano wynik negatywny, należy ponownie pobrać czystą próbkę śliny od pacjenta i zbadać ją przy użyciu zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*.

## Badanie stabilności próbki

Badanie stabilności próbki przeprowadzono w celu oceny wpływu różnych warunków przechowywania próbki na wyniki jakościowe (analiza wskaźnika udanych odczytów) i ilościowe (analiza przesunięcia Ct) uzyskane za pomocą zestawów *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM*. Eksperymenty przeprowadzono na podstawie analizy dwóch poziomów rozcieńczeń: (1) próbki negatywne; (2) sztucznie wytworzone próbki pozytywne uzyskane poprzez dodanie cząstek inaktywowanego wirusa SARS-CoV-2 (Zeptomatrix). W celu potwierdzenia stabilności próbek (ślina i NPS) wymagane było, aby  $\geq 95\%$  powtórzeń dawało ten sam wskaźnik udanych odczytów i przesunięcie punktu Ct  $\leq 10\%$  punktu czasu 0 w przypadku każdego badanego warunku przechowywania.

### Próbki wymazów z nosa, ustnej części gardła i nosogardzieli:

Testowane różne warunki przechowywania przedstawiono w Tabeli 31. Testy wykonywano przy użyciu 3 puli próbek. Na platformie ABI 7500 Fast Dx przetestowano negatywne próbki NPS, pozytywne próbki NPS utworzone sztucznie poprzez dodanie wirusa w stężeniu  $5 \times \text{LoD}$  (4750 kopii/ml) oraz trzy serie wypuszczonych zbiorczo na rynek próbek BRS1 (fragment N2; 1000 kopii/10  $\mu\text{l}$  (String)), BRS2 (fragment genu RNazy P; 1000 kopii/10  $\mu\text{l}$  (gBlock)) oraz BRS3 (fragment N1, 1000 kopii/10  $\mu\text{l}$  (String)).

Na podstawie wyników uzyskanych dla analiz jakościowych i ilościowych wykazano, że testowane warunki przechowywania próbek NPS nie miały wpływu na wskaźnik udanych odczytów (oczekiwane wyniki detekcji) i nie doprowadziły do istotnego przesunięcia punktu Ct podczas wykonywania testów przy użyciu zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*. Z tego względu wydajność zestawu pozostaje stabilna bez względu na różne warunki przechowywania testowanych próbek NPS (patrz Tabela 31).

W Tabeli 31 przedstawiono warunki, w których próbki wymazów z nosogardzieli pozostają stabilne

**Tabela 31. Warunki, w których próbki wymazów z nosogardzieli pozostają stabilne.**

Warunki	Określona przez producenta stabilność próbek
Cykl zamrażania-rozmrażania	3 cykle zamrażania-rozmrażania
4°C (od 2°C do 8°C)	72 godz.
-70°C	2 tygodnie

### Czyste próbki śliny

Testowane różne warunki przechowywania przedstawiono w Tabeli 32. Testy wykonywano przy użyciu 2 puli próbek. Na platformie ABI 7500 Fast Dx przetestowano negatywne czyste próbki śliny oraz sztucznie wytworzone pozytywne czyste próbki śliny w stężeniu 3xLoD (3600 kopii/ml).

Na podstawie wyników uzyskanych dla analiz jakościowych i ilościowych wykazano, że testowane warunki przechowywania nie miały wpływu na wskaźnik udanych odczytów (oczekiwane wyniki detekcji) i nie doprowadziły do istotnego przesunięcia punktu Ct podczas wykonywania testów przy użyciu zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*. Z tego względu wydajność zestawu pozostaje stabilna bez względu na różne warunki przechowywania testowanych czystych próbek śliny.

W Tabeli 32 przedstawiono warunki, w których czyste próbki śliny pozostają stabilne.

**Tabela 32. Warunki, w których czyste próbki śliny pozostają stabilne**

Warunki	Określona przez producenta stabilność próbek
Cykl zamrażania-rozmrażania	3 cykle zamrażania-rozmrażania
Temperatura pokojowa (od 18°C do 26°C)	72 godz.
4°C (od 2°C do 8°C)	72 godz.
Warunki mieszane: 6 godz. w temperaturze pokojowej połączone z 72 godz. w temperaturze 4°C (od 2 do 8°C) połączone z 8 dniami w temperaturze -20°C (od -30°C do -15°C)	6 godz. w temperaturze pokojowej, następnie 72 godz. w temperaturze 4°C (od 2 do 8°C), a następnie 7 dni w temperaturze -20°C (od -30°C do -15°C)
-20°C (od -30°C do -15°C)	1 miesiąc (30,5 dnia)

---

## Precyzja

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

Dla każdego rozcieńczenia zebrano 204 punkty danych. Dane z badań powtarzalności i odtwarzalności wykorzystano do obliczenia odchylenia standardowego (Standard Deviation, SD) i współczynnika zmienności (Coefficient of Variation, %CV) dla detekcji sekwencji docelowych wirusa SARS-CoV-2 w kanałach Green, Yellow i Red. Dane przedstawione w Tabeli 33 wskazują, że ogólna precyzja zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit jest równa 0,63 SD (2,03 %CV) w kanale Green, 0,54 SD (2,22 %CV) w kanale Yellow i 1,28 SD (4,10 %CV) w kanale Red.

Tabela 33. Odchylenie standardowe i współczynnik zmienności zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*.

Próbki i kanał detekcji	Łącznie	Między dniami	Między partiami	Między operatorami	Między aparatami	Między reakcjami	W ramach reakcji
<b>Odchylenie standardowe (SD) (Współczynnik zmienności (%CV))</b>							
Negatywny wymaz z nosogardzieli Kanał Yellow	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
Negatywny wymaz z nosogardzieli Kanał Red	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)0	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
Wymaz z nosogardzieli z dodatkiem cząstek Kanał Green	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
Wymaz z nosogardzieli z dodatkiem cząstek Kanał Yellow	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
Wymaz z nosogardzieli z dodatkiem cząstek Kanał Red	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

## Skuteczność kliniczna

### Wymazy z nosogardzieli

Skuteczność kliniczną oznaczenia *artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp* oceniono przy użyciu zebranych retrospektywnie 150 próbek klinicznych wymazów z nosogardzieli w podłożu transportowym.

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

Walidację kliniczną przeprowadzono w aparacie ABI 7500 Fast Dx. W Tabeli 34 przedstawiono dane dotyczące skuteczności zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w porównaniu z metodą referencyjną.

**Tabela 34. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w porównaniu z metodą referencyjną.**

Status próbki	N	Odsetek wyników pozytywnych (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników negatywnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki pozytywne	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Wyniki negatywne	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7–97,8

Wyniki niezgodne oceniono trzecią metodą i przeanalizowano ponownie przy użyciu tabeli kontyngencji. Ogólne wyniki skuteczności klinicznej wyrażono jako zgodność procentowa wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentowa wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA) przedstawiono w Tabeli 35.

**Tabela 35. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit po analizie niezgodnych wyników.**

Status próbki	N	Odsetek wyników pozytywnych (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników negatywnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki pozytywne	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Wyniki negatywne	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7–97,8

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

Zgodność procentowa wyników dodatnich

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

Zgodność procentowa wyników ujemnych

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

## Wymazy z nosogardzieli z uwzględnieniem próbek pobranych od osób bezobjawowych

Skuteczność kliniczną oznaczenia *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp oceniono przy użyciu zebranych retrospektywnie 153 próbek klinicznych wymazów z nosogardzieli w podłożu transportowym.

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

Walidację kliniczną przeprowadzono w aparacie ABI 7500 Fast Dx. Szesnaście próbek przetestowanych za pomocą zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wykluczono z analizy z powodu stwierdzenia dla nich nieważnego statusu na podstawie kryteriów ważności próbki (Tabela 23).

Tabela 36 zawiera dane dotyczące skuteczności zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w porównaniu z metodą referencyjną. Skuteczność zestawu wyrażono jako zgodność procentową wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentową wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA).

**Tabela 36. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w porównaniu z metodą referencyjną**

Status próbki	N	Odsetek wyników pozytywnych (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników negatywnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki pozytywne	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	36,0 (18/50)	–
Wyniki negatywne	87	1,15 (1/87)	–	98,85 (86/87)	93,8–99,8

Dziewiętnaście wyników niezgodnych oceniono trzecią metodą i przeanalizowano ponownie przy użyciu tabeli kontyngencji. Ogólne wyniki skuteczności klinicznej wyrażono jako zgodność procentowa wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentowa wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA) przedstawiono w Tabeli 37.



Tabela 37. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit po analizie niezgodnych wyników.

Status próbki	N	Odsetek wyników pozytywnych (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników negatywnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki pozytywne	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0 (0/32)	-
Wyniki negatywne	105	0,95 (1/105)	-	99,05 (104/105)	94,8–99,8

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

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

Zgodność procentowa wyników dodatnich

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

Zgodność procentowa wyników ujemnych

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

### Czyste próbki śliny

Skuteczność kliniczną oznaczenia *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp oceniono przy użyciu 142 czystych próbek śliny.

Wszystkie próbki pobrano od pacjentów z objawami przedmiotowymi i podmiotowymi zakażenia COVID-19. Walidację kliniczną przeprowadzono w aparacie ABI 7500 Fast Dx. Dwanaście próbek przetestowanych za pomocą zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit oraz przy użyciu metody referencyjnej wykluczono z analizy, ponieważ w obu testach na podstawie kryteriów ważności próbki uzyskano dla tych próbek status nieważny.

W Tabeli 38 przedstawiono dane dotyczące skuteczności zestawu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit w porównaniu z metodą referencyjną.

Tabela 38. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* w porównaniu z metodą referencyjną.

Status próbki	N	Odsetek wyników pozytywnych (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników negatywnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki pozytywne	45	93,33 (42/45)	82,14–97,71	6,67 (3/45)	--
Wyniki negatywne	85	0 (0/85)	-	100 (85/85)	95,68–100,00

Trzy wyniki niezgodne oceniono przy użyciu trzeciej metody i przeanalizowano ponownie przy użyciu tabeli kontyngencji. Ogólne wyniki dotyczące skuteczności klinicznej wyrażono jako zgodność procentową wyników dodatnich (Positive Percent Agreement, PPA) i zgodność procentową wyników ujemnych (Negative Percent Agreement, NPA); przedstawia je Tabela 39.

Tabela 39. Dane dotyczące skuteczności klinicznej zestawu *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* po analizie niezgodnych wyników.

Status próbki	N	Odsetek wyników pozytywnych (%)	95-procentowy CI	Odsetek wyników negatywnych (%)	95-procentowy CI
Wyniki pozytywne	43	97,67 (42/43)	87,94–99,59	2,32 (1/43)	--
Wyniki negatywne	87	0 (0/87)	-	100 (87/87)	95,77–100,00

Dwa wyniki fałszywie negatywne poddano ponownej klasyfikacji i stwierdzono, że są to wyniki prawdziwie negatywne, natomiast jeden wynik fałszywie negatywny pozostał wynikiem fałszywie negatywnym.

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

Zgodność procentowa wyników dodatnich

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

Zgodność procentowa wyników ujemnych

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

---

# Literatura

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

# Rozwiązywanie problemów

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

## Komentarze i wskazówki

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

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

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

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

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

## Komentarze i wskazówki

### Słaby sygnał lub brak sygnału w kanale Red (Cy5/Atto) dla kontroli wewnętrznej











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





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

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

# Symbole

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

Symbol	Definicja symbolu
	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania 768 lub 3072 reakcji
	Data ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Składniki
	Zawiera
	Numer
	Globalny numer jednostki handlowej
Rn	R oznacza wydanie instrukcji użycia, a n to numer wydania
	Zakres temperatury

Symbol	Definicja symbolu
	Producent
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Chronić przed światłem słonecznym
	Ostrzeżenie/przestroga

---

## Informacje kontaktowe

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



# Dane do zamówień

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Na 768 reakcji: bufor do przygotowania, barwnik ROX, mieszanina Master Mix, startery i sondy, kontrola wewnętrzna, woda (NTC) i kontrola pozytywna	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Na 3072 reakcje: bufor do przygotowania, barwnik ROX, mieszanina Master Mix, startery i sondy, kontrola wewnętrzna, woda (NTC) i kontrola pozytywna	4511469
<b>Aparat i akcesoria</b>		
PCR tubes, 0,1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Do użytku z rotorem 72-Well Rotor, próbki w paskach i zatyczki	981103
Rotor-Gene Q software	Oprogramowanie Rotor-Gene Q w wersji 2.3.1 (lub wyższej)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Cykler do reakcji real-time PCR z 5 kanałami, analizator High Resolution Melt, oprogramowanie, komputer typu laptop i akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; obejmuje instalację	9002032
72-Well Rotor	Do przytrzymywania próbek Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, o objętościach reakcyjnych 10–50 µl	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Do blokowania próbek Strip Tubes and Caps, 0,1 ml w rotorze 72-Well Rotor	9018904

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

# Historia zmian dokumentu

Wersja	Opis
R1, kwiecień 2021 r.	Pierwsze wydanie.
R2, lipiec 2021 r.	Uzupełnienie oświadczenia: Ustalono skuteczność tego testu w przypadku osób bezobjawowych. Zaktualizowano część dotyczącą przeznaczenia w celu uwzględnienia możliwości testowania próbek pobranych od pacjentów bezobjawowych lub osób z podejrzeniem zakażenia wirusem wywołującym chorobę COVID-19. Do danych dotyczących skuteczności dodano część dotyczącą skuteczności klinicznej z uwzględnieniem próbek pobranych od osób bezobjawowych.
R3, wrzesień 2021 r.	Uzupełnienie oświadczenia: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Dodano informacje na temat wykonywania testów przy użyciu próbek śliny.</li><li>2. Zmodyfikowano procedurę.</li><li>3. Dodano informacje na temat używania 3 dodatkowych platform z odpowiednim oprogramowaniem: aparat CFX96 Dx z oprogramowaniem CFX Manager Dx Software w wersji 3.1.3090.1022 (lub wyższej), aparat cobas z 480 z oprogramowaniem LightCycler 480 SW UDF w wersji 2.0.0 (lub wyższej) oraz aparat QuantStudio 5 Dx z oprogramowaniem QuantStudio 5 Dx IVD Software w wersji 1.0.1 (lub wyższej).</li><li>4. W części dotyczącej skuteczności dodano granice wykrywalności próbek wymazów z nosogardzieli, nosa i ustnej części gardła badanych przy użyciu 3 dodatkowych platform (aparaty CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx).</li><li>5. Zaktualizowano część dotyczącą parametrów skuteczności.</li><li>6. W przypadku aparatu RGQ zachowano wyłącznie nazwy kanałów fluorescencyjnych (Green, Red, Yellow) (usunięto nazwy barwników w nawiasach).</li><li>7. Nazwy barwników zostały zachowane w przypadku aparatów CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 i QuantStudio 5 Dx.</li><li>8. W przypadku aparatu ABI7500 Fast Dx usunięto informacje dotyczące filtrów fluorescencyjnych A/1, B/2 i E/5. Zachowano jedynie nazwy barwników (Fam, Vic i Cy5).</li><li>9. Wprowadzono zmiany w Tabelach 34–37 w części dotyczącej skuteczności klinicznej w celu poprawienia czytelności.</li></ol>
R4, styczeń 2022 r.	Poprawiono błąd pisowni — Tabela 39.

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

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

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

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

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, artus®, 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); Zeptomatrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Colgate®, Total SF Whitening™ (Colgate-Palmolive Company); Listerine® (Johnson & Johnson); Tussidane® (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). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

01/2022 R4 HB-2850-004 © 2021 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

---

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