



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




Használati utasítás

In vitro diagnosztikai alkalmazásra

Csak exportálásra. Az Egyesült Államokban nem forgalmazható.

B2 változat, 2022. május

Szimbólumok magyarázata

	Európai megfelelés		Vigyázat!
	In vitro orvosi diagnosztikai eszköz		Katalógus-/kódszám
	Gyártó		Olvassa el a használati útmutatót
	Felhasználható		<N> számú vizsgálat elvégzéséhez elegendő
	Tételkód		Ne használja fel ismét
	Hőmérsékleti korlátozások		Egyedi eszközazonosító
	Európai meghatalmazott képviselő		

Megjegyzés a vásárlónak: Korlátozott engedély

Ez a termék az Agilent és a Life Technologies Corporation közötti engedélyezési rendelkezések mellett kerül értékesítésre. A termék vételára korlátozott, nem átruházható jogokat tartalmaz, amelyek tulajdonosa a Life Technologies Corporation, és a termék csak ilyen mértékben használható fel a SARS-CoV-2 *in vitro* tesztelésére embereknél a termékhez mellékelt használati utasításnak megfelelően. Egyéb jogok átadása nem történik. További információkat kérhet az engedélyek vásárlásával kapcsolatban a fenti szabadság mellett a következő elérhetőségen: Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. E-mail: outlicensing@lifetech.com.

1 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Termékinformáció

Alkalmazási terület	6
Termékleírás	7
A termék áttekintése/a vizsgálat elve	7
A vizsgálat lépéseinek leírása	7
Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlettel együtt használandó ellenőrző anyagok	7
Vizsgálat munkafolyamata	9

2 Anyagok, biztonság és kezelés

Mellékelt anyagok	11
Szükséges, de nem mellékelt reagensek, anyagok, berendezések és szoftverek	12
Biztonsági útmutatások	15
Tárolás és kezelés	17
Termék csomagolása	17
A reagensek tárolása, kezelése és stabilitása	17
Minta gyűjtése, kezelése és tárolása	17

3 A nukleinsavak kivonására vonatkozó utasítások

Nukleinsavak kivonása	19
-----------------------	----

4 Utasítások a qRT-PCR reakciók előkészítéséhez

Állítsa be a qRT-PCR kísérletet a valós idejű PCR rendszeren	21
Hozzon létre és állítsa be az AriaMx/AriaDx kísérletet (akkor szükséges, ha még nem hoztak létre sablont)	21
Az AriaMx/AriaDx kísérlet létrehozása mentett sablonból	27
Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása és beállítása (szükséges, ha a sablont még nem hozta létre)	27
Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása mentett sablonból	33
Hozza létre és állítsa be a Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérletet (akkor szükséges, ha a mentett protokoll és lemezfájlok még nincsenek létrehozva)	34
A Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérlet létrehozása a kimentett protokollból és a lemezfájlokból	39
A qRT-PCR reakciók előkészítése	41

5 qRT-PCR elvégzési utasítások

qRT-PCR elvégzése Agilent AriaMx/AriaDx valós idejű PCR rendszeren	46
A qRT-PCR program futtatása az AriaMx/AriaDx rendszeren	46
Adatelemzési beállítások hozzárendelése az AriaMx/AriaDx kísérlethez	47
Adatexportálás az Aria szoftverből	52
qRT-PCR elvégzése az ABI 7500 Fast valós idejű PCR készüléken	55
A qRT-PCR program futtatása az ABI 7500 Fast valós idejű PCR készüléken	55
Adatelemzési beállítások hozzárendelése az ABI 7500 Fast kísérlethez	55
A Well (Cella) táblázat adatainak exportálása a Design & Analysis szoftverből CSV fájlba	60

qRT-PCR elvégzése Bio-Rad CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszeren	62
A qRT-PCR program futtatása a CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszeren	62
Adatelemzési beállítások hozzárendelése a CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszerhez	62
Adatexportálás a CFX Maestro szoftverből	67

6 Elemzés és eredmények

Az eredmények értelmezése	70
Eredmények és értelmezés kontrollminták esetén	70
Eredmények és értelmezés klinikai minták esetén	71

7 Minőség-ellenőrzés

Minőség-ellenőrzés	74
--------------------	----

8 A vizsgálat korlátjai

Korlátozások	76
--------------	----

9 Teljesítményjellemzők

Teljesítményjellemzők	78
Analitikai érzékenység (kimutatási határ)	78
Analitikai inkluzivitás	79
Keresztreaktivitás	79
Klinikai értékelés	79

10 Hivatkozások

Termékcímkék	82
--------------	----

1

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Termékinformáció

Alkalmazási terület **6**

Termékleírás **7**

Vizsgálat munkafolyamata **9**

Ez a fejezet bevezető információkat tartalmaz a vizsgálatról.

Alkalmazási terület

Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit egy valós idejű RT-PCR in vitro diagnosztikai teszt, amely a SARS-CoV-2 RNS-ének kvalitatív kimutatására szolgál a COVID-19 klinikai és/vagy epidemiológiai feltételeinek megfelelő egyénekből izolált és tisztított nazofaringeális (NP), nazális és orofaringeális (OP) tamponmintákból.*

Az eredmények a SARS-CoV-2 RNS azonosítására szolgálnak. A SARS-CoV-2 RNS általában a felső légúti mintákban detektálható a fertőzés akut fázisában. A pozitív eredmények a SARS-CoV-2 RNS jelenlétére utalnak; a beteg kórtörténetének és egyéb diagnosztikai információknak a figyelembe vétele szükséges a beteg fertőzöttségi állapotának meghatározásához. A pozitív eredmények nem zárják ki a bakteriális fertőzés vagy más vírusokkal történő együttes fertőzés jelenlétét. A vizsgálattal azonosított anyag nem biztos, hogy a betegség okozója.

A negatív eredmények nem zárják ki a SARS-CoV-2 fertőzés jelenlétét, és nem használhatók egyedüli alapként a beteg kezelésével kapcsolatos döntések meghozatalában. A negatív eredményeket összefüggésükben kell vizsgálni más klinikai megfigyelésekkel, a beteg kórtörténetével és az epidemiológiai információkkal együtt.

Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készletet csak képzett és erre képesített klinikai laboratóriumi személyzet használja, akik az Agilent rendszer működésével és az in vitro diagnosztikai eljárásokkal kapcsolatban kifejezetten oktatást és képzést kaptak.

* Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit vizsgálat teljesítményét nazofaringeális tamponmintával, UTM vagy VCM transzport médium alkalmazása esetén állapították meg. Az orofaringeális tamponminta, az orr és a középső orrkagyló tamponmintái elfogadható mintatípust jelentenek az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlettel végzett vizsgálathoz, de a teljesítmény ezekkel a mintákkal még nincs megállapítva. Az orofaringeális tamponminták, az orr és a középső orrkagyló tamponmintáinak vizsgálata (amelyet saját kezűleg vagy egészségügyi szakember felügyelete alatt gyűjtöttek) csak a COVID-19 tüneteiben szenvedő betegekre korlátozódik.

Termékleírás

A termék áttekintése/a vizsgálat elve

Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit egy valós idejű reverz transzkripció polimeráz-láncreakció (qRT-PCR) vizsgálat. A SARS-CoV-2 primer és próba készlet(ek) a SARS-CoV-2 RNS-ének kimutatására szolgálnak COVID-19 gyanú esetén a betegektől egészségügyi szakember által vett nazofaringeális (NP), nazális és orofaringeális (OP) tamponmintákból.

A vizsgálat lépéseinek leírása

A nukleinsavakat (az extrakciós módszertől függően) ~140–200 µl nazofaringeális (NP) tamponmintából származó mintából izoláljuk automata extrakciós rendszerrel (Qiagen QIAasympohony DSP Virus/Pathogen Mini Kit és QIAasympohony, ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II Kit és KingFisher Flex). A megtisztított nukleinsavból (5 µl) reverz transzkripcióval cDNS készül, majd ezt követően egy lépéses qRT-PCR reakcióban Agilent Brilliant III qRT-PCR reagensekkel amplifikáljuk a támogatott valós idejű PCR készülékeken. A folyamat során a próba egy meghatározott célszekvenciához kapcsolódik, amely a forward és reverz primerek között helyezkedik el. A PCR-ciklus meghosszabbítási fázisa során a *Taq* polimeráz 5'-nukleáz aktivitása lebontja a próbát, melynek következtében a riporterfesték elválik a kioltófestéktől, és fluoreszcens jel jön létre. Minden ciklus során további riporterfesték-molekulák hasítódnak le a megfelelő próbából, növelve a fluoreszcencia intenzitását. A fluoreszcencia intenzitást minden PCR-ciklusban monitorozzuk a támogatott valós idejű PCR készülékekkel (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast vagy Bio-Rad CFX96).

Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlettel együtt használandó ellenőrző anyagok

- A „nem” (negatív) kontroll mintára van szükség a tesztfolyamat szennyeződésének ellenőrzéséhez, a szennyeződés ugyanis álpozitív eredményeket adhat, és a kontrollt PCR-lemezenként legalább egyszer használni kell. A felhasználó vizet ad hozzá az extrahált RNS helyett, és ezt negatív kontroll mintaként használja.
- Pozitív kontroll mintára van szükség annak biztosítására, hogy a célzott SARS-CoV-2 RNS kimutatásának mechanizmusa ne sérüljön, és ezt PCR-lemezenként legalább egyszer használni kell (50 kópia/reakció). A készlet pozitív kontrollja a vírus célszekvenciáknak megfelelő szintetikus RNS.
- Humán kontroll mintára (Human Specimen Control, HSC) van szükség annak biztosításához, hogy az eredeti mintában lévő RNS megfelelő maradjon az extrakció során, és ezt a kontroll mintát extrakciós tételenként legalább egyszer használni kell.
- Belső kontrollra (humán RNáz P-gén) van szükség annak biztosítására, hogy az eredeti mintából származó RNS kimutatható legyen a qRT-PCR reakcióban. Várhatóan a HSC-ben, valamint a legtöbb humán mintában detektálható elegendő celluláris RNS. Humán mintákban előfordulhat, hogy a belső kontroll nem mutatható ki, ha a SARS-CoV-2 vírus RNS magas koncentrációban van jelen.

A készlethez mellékelt kontrollok

1. táblázat Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlethez mellékelt kontrollok

A kontroll típusa	A kontroll neve	Beszállító neve	Beszállító cikkszama
Pozitív	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

A készlethez szükséges, azzal nem biztosított kontrollok

- Molekuláris minőségű, nukleázmentes víz, amelyet „nem” (negatív) kontroll mintaként kell használni
- Extrakciós kontroll: a CDC ajánlásai alapján számos lehetőség áll az ügyfél rendelkezésére
 - Humán kontroll minta, gyártója a CDC, KT0189
 - Negatív humán minta: a laboratóriumok előállíthatnak bizonyos mennyiségű humán mintát (például humán szérum vagy egyesített maradék negatív légzőszervi minta) a klinikai minták extrakciójához és futtatásához extrakciós kontrollként. Ezt az anyagot elegendő térfogatban kell elkészíteni ahhoz, hogy több futtatás során felhasználható legyen. Az anyagot használat előtt tesztelni kell mint extrakciós kontrollt annak biztosítására, hogy az a jelen használati utasításban felsorolt HSC várt eredményeit hozza létre.
 - Előállított negatív humán minta: a laboratóriumok előállíthatnak mesterségesen humán mintákat úgy, hogy valamely humán sejtvonalat (pl. A549, Hela vagy 293) szuszpendálnak PBS-ben. Ezt az anyagot elegendő térfogatban kell elkészíteni ahhoz, hogy több futtatás során felhasználható legyen. Az anyagot használat előtt tesztelni kell mint extrakciós kontrollt annak biztosítására, hogy az a jelen használati utasításban felsorolt HSC várt eredményeit hozza létre.

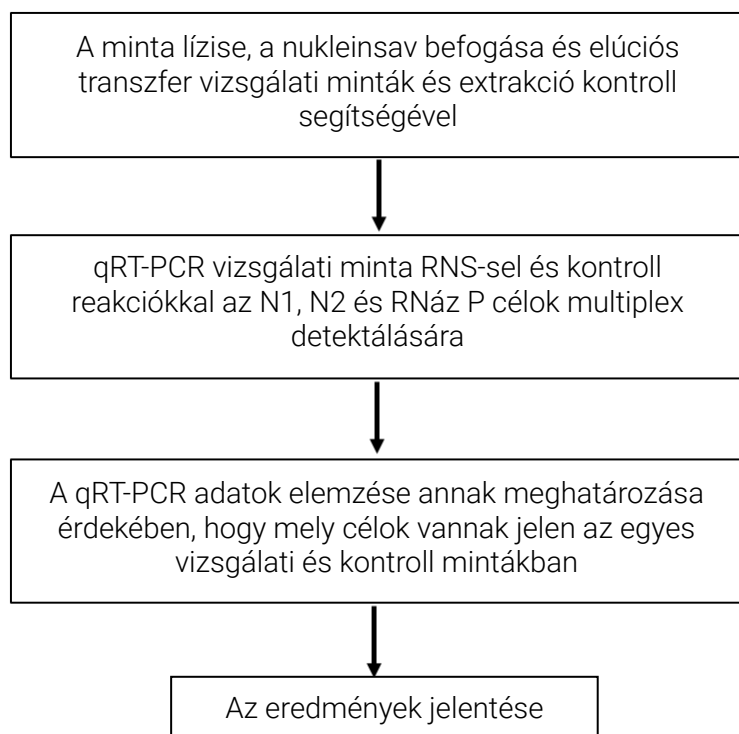
Vizsgálat munkafolyamata

A vizsgálat megkezdéséhez vonjon ki nukleinsavat a nazofaringeális vizsgálati mintákból, megfelelő humán kontroll minta mellett.

Ezután futtasson multiplex qRT-PCR kísérletet a kivont RNS-minták és a rendelkezésre álló pozitív RNS-kontroll felhasználásával. Használjon negatív kontroll mintát (No Template Control, NTC).

A qRT-PCR futtatás befejezése után elemezze az adatokat célként N1 és N2 vírusok és a humán RNáz P-gén amplifikálásához.

Végül jelentse a vizsgálati minták eredményeit.



1. ábra A SARS-CoV2 qRT-PCR Dx Assay munkafolyamata

2 Anyagok, biztonság és kezelés

Mellékelt anyagok	11
Szükséges, de nem mellékelt reagensek, anyagok, berendezések és szoftverek	12
Biztonsági útmutatások	15
Tárolás és kezelés	17

Ez a fejezet ismerteti a vizsgálatban használt reagenseket és egyéb anyagokat, valamint információkat nyújt a vizsgálat biztonságos elvégzéséhez.

Mellékelt anyagok

A **2. táblázat** az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlethez mellékelt anyagokat és azok hőmérsékleti követelményeit sorolja fel. Az anyagok tárolására vonatkozó további utasításokkal kapcsolatban lásd: „**Tárolás és kezelés**”, 17. oldal.

2. táblázat Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlethez mellékelt anyagok, cikkszám: K1180A

Anyagok	Mennyiség	Összetevők	Tárolási hőmérséklet
Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx reagensek, cikkszám: K1180-64100*	Megfelelő a 400 qRT-PCR reakciókhoz (vizsgálati minták és kontrollok)	2x Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	Átvétel után –20 °C-on tárolandó.
		RT/RNase Block Dx	Átvétel után –20 °C-on tárolandó.
		Reference Dye Dx [†]	Átvétel után –20 °C-on tárolandó.
		100 mM DTT Dx	Átvétel után –20 °C-on tárolandó.
		10x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx [†]	Átvétel után –20 °C-on tárolandó.
Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, cikkszám: K1180-64200 [‡]	8 vizsgálatához elegendő	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Átvétel után –80 °C-on tárolandó.

* A SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents kit a K1180B Agilent cikkszám alatt külön is kapható.

[†] Ez a reagens fényérzékeny, és fénytől védve tárolandó, amikor lehetséges.

[‡] A SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx a K1180C Agilent cikkszám alatt külön is kapható.

Szükséges, de nem mellékelt reagensek, anyagok, berendezések és szoftverek

A **3. táblázat** felsorolja a protokoll olyan lehetséges RNS kivonási lépéseit, amelyeket az automatizálás érdekében egy készüléken hajtanak végre. Az RNS-extrakciós eljárás leírását lásd: „**A nukleinsavak kivonására vonatkozó utasítások**”, 18. oldal.

3. táblázat RNS-extrakciós lehetőségek – szükséges, de nem mellékelt

RNS-extrakciós készlet	Készülék
QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, cikkszám: 937055	QIAGEN QIAAsymphony SP, cikkszám: 9001297 (automatizálás)
Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher cikkszám: A48383	Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Purification System, cikkszám: 5400630 (automatizálás)

A **4. táblázat** felsorolja a humán kontroll minta lehetőségeket. Ez a kontroll minta humán sejtenyészlet-készítmény, amelyet extrakciós eljárási kontrollként használnak a nukleinsav sikeres kinyerésének, valamint az extrakciós reagens integritásának igazolására.

4. táblázat Humán kontroll minta lehetőségek – szükséges, de nem mellékelt

Humán kontroll minta	Leírás
Humán kontroll minta (Human Specimen Control, HSC), 10 ampulla x 500 µl, CDC cikkszám: KT0189	Gyártó és forgalmazó: CDC. A CDC HSC nem fertőző (béta-propiolaktonnal kezelt) tenyésztett humán sejtekből áll, amely folyadékként, 0,01 M PBS-ben szuszpendálva, 7,2–7,4 pH-n érhető el.
Negatív humán minta	A laboratórium készíti. Ez a típusú humán kontroll minta adott mennyiségű humán minta (például humán szérum vagy egyesített maradék negatív légzőszervi minta) a klinikai minták extrakciójához és futtatásához extrakciós kontrollként. Ezt az anyagot elegendő térfogatban kell elkészíteni ahhoz, hogy több futtatás során felhasználható legyen. Az anyagot használat előtt tesztelni kell mint extrakciós kontrollt annak biztosítására, hogy az a jelen használati utasításban felsorolt HSC várt eredményeit hozza létre.
Előállított negatív humán minta	A laboratórium készíti. Ez a típusú humán kontroll minta mesterségesen előállított humán minta, amelyet PBS-ben szuszpendált valamely humán sejtvonal (pl. A549, Hela vagy 293) alkot. Ezt az anyagot elegendő térfogatban kell elkészíteni ahhoz, hogy több futtatás során felhasználható legyen. Az anyagot használat előtt tesztelni kell mint extrakciós kontrollt annak biztosítására, hogy az a jelen használati utasításban felsorolt humán kontroll minta várt eredményeit hozza létre.

Az **5. táblázat** és a **6. táblázat** további reagenseket, anyagokat, berendezéseket és készülékeket sorol fel, amelyek szükségesek, de nincsenek mellékelve az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlethez.

5. táblázat Szükséges reagensek és anyagok, amelyek nincsenek mellékelve

Reagens vagy anyag	Forma
Molekuláris minőség, nukleázmentes víz	Reagens
10%-os fehérítőszer (1:10-es hígítású 5,25–6%-os hipoklorit fehérítő)	Anyag
DNAZap, Ambion cikkszám: AM9890 vagy ekvivalens fertőtlenítőszer	Anyag
RNase AWAY, Fisher Scientific cikkszám: 21-236-21 vagy ekvivalens fertőtlenítőszer	Anyag
Eldobható pormentes kesztyűk és műtési ruhák	Anyag
Steril, nukleázmentes, aeroszol barrier pipettahegyek	Anyag
Nukleázmentes, 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövek	Anyag
Nukleázmentes, 2 ml-es mikrocentrifuga csövek	Anyag
Nukleázmentes, 96 cellás lemezek, 200- μ l <i>Olyan lemezeket használjon, amelyek kompatibilisek a kiválasztott valós idejű PCR rendszerrel</i>	Anyag
Nukleázmentes, 8 tagból álló csősor	Anyag
Nukleázmentes ragasztószalag lemezre vagy nukleázmentes, 8 tagból álló optikai kupakcsik 96 cellás PCR-lemezekhez <i>Olyan lezáró szalagokat vagy csíkokat használjon, amelyek kompatibilisek a kiválasztott valós idejű PCR rendszerrel</i>	Anyag
MicroAmp Optical Film Compression Pads, Thermo Fisher Scientific, cikkszám: 4312639*	Anyag

*A kompressziós párnákra csak akkor van szükség, ha ragasztószalagot használnak a lemezek lezárásához az AriaMx/AriaDx Real-Time PCR rendszer esetén.

6. táblázat Szükséges készülékek, szoftver és berendezés, amelyek nincsenek mellékelve

Készülék, szoftver vagy berendezés	Forma
Valós idejű PCR rendszer <ul style="list-style-type: none"> Agilent AriaMx Real-Time PCR rendszer (cikkszám: G8830A) vagy AriaDx Real-Time PCR rendszer (cikkszám: K8930AA) Szoftver: Aria szoftver 1.71-es vagy 1.8-as verzió és Electronic Tracking Software (K8930AA cikkszámú termékhez mellékelve vagy külön, G5380AA cikkszámú termékként) ABI 7500 Fast Real Time PCR készülék lappal (cikkszám: 4351106) vagy asztali géppel (cikkszám: 4351107) Szoftver: 7500 szoftver 2.3-as verzió és Design & Analysis szoftver 2.4.3-as verzió Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR érzékelő rendszer (cikkszám: 1855195) vagy CFX96 Touch Real-Time PCR érzékelő rendszer kezdőcsomaggal (cikkszám: 1855196) Szoftver: CFX Maestro 2.0 szoftver 4.1.2-es verzió (az 1855196 cikkszámú csomagban vagy önállóan, 12004110 cikkszámú termékként) 	Készülék számítógéppel és szoftverrel
Szoftver a valós idejű PCR szoftverből exportált adatok megtekintéséhez, pl. Microsoft Excel	Szoftver
Vortex-keverő	Berendezés
Mikrocentrifuga	Berendezés

6. táblázat Szükséges készülékek, szoftver és berendezés, amelyek nincsenek mellékelve (continued)

Készülék, szoftver vagy berendezés	Forma
Lemezcentrifuga 96 cellás lemezekhez	Berendezés
P10, P20, P200 és P1000 mikropipetta	Berendezés
Többcsatornás pipetták (5–50 µl)	Berendezés
Állványok mikrocentrifuga csövekhez	Berendezés
Két (2) 96 cellás hideg állvány	Berendezés
Jeges vödör	Berendezés

Biztonsági útmutatások

- 1 A hibás eredmények kockázatának elkerülése érdekében az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit munkafolyamatot képzett és erre képesített klinikai laboratóriumi személyzet kell végezze. Használjon külön területeket a betegminták és a kontrollok elkészítéséhez az álpozitív eredmények megelőzése érdekében.
- 2 Ezt a vizsgálatot csak nukleinsav kimutatására engedélyezték a SARS-CoV-2-ből, más vírusok vagy kórokozók esetében nem használható.
- 3 Gondosan olvassa el a teljes használati utasítást.
- 4 A mintákat és a kontrollokat a biztonságos laboratóriumi eljárásokkal összhangban mindig úgy kell kezelni, mintha fertőzőek lennének és/vagy biológiai veszélyt jelentenének. Lásd a 2019-nCoV-hoz társított minták kezelésére és feldolgozására vonatkozó ideiglenes laboratóriumi biológiai biztonsági irányelveket: Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with 2019-nCoV.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- 5 A minták kezelésénél tartsa be a szükséges óvintézkedéseket. A potenciálisan fertőző minták kezelésére vonatkozó jelenlegi irányelveknek megfelelően használjon személyi védőfelszerelést (personal protective equipment, PPE). Kiömlés esetén azonnal végezzen fertőtlenítést.
- 6 A minták fertőzőek lehetnek. Tartsa be az általános óvintézkedéseket ennek a vizsgálatnak a végrehajtása során. A megfelelő kezelési és ártalmatlanítási módszereket a laboratórium vezetőjének kell meghatároznia. Csak a fertőző anyagok kezelésében megfelelően képzett személyzet engedélyezheti a diagnosztikai eljárás elvégzését.
- 7 Ha a közegészségügyi hatóságok által ajánlott jelenlegi klinikai szűrési kritériumok alapján felmerül a 2019-nCoV fertőzés gyanúja, a mintákat megfelelő fertőzésszabályozási óvintézkedésekkel kell gyűjteni.
- 8 Csak mellékelt vagy meghatározott eldobható laboratóriumi eszközöket használjon.
- 9 Mindig aeroszol barrierrel ellátott pipettahegyeket használjon. A felhasznált hegyeknek sterileknek, valamint DNáz- és RNáz-menteseknek kell lenniük.
- 10 A PCR-alapú vizsgálatok érzékenyek a korábbi PCR-reakciókból származó amplifikációs termékek véletlenszerű bevezetésére. A vizsgálati minták vagy reagensek bármilyen szennyezése hibás eredményt eredményezhet. A laboratóriumi munkafolyamatnak egyirányúan kell haladniuk. Az alábbi bevált módszerekkel megakadályozható a minták PCR-termékekkel történő szennyeződése a munkafolyamat során:
 - Jelöljön ki külön PCR előtti és PCR utáni munkaállomásokat, és minden területre használjon dedikált készleteket és reagenseket. Ne használjon a PCR utáni munkához kijelölt anyagokat a munkafolyamat PCR előtti szakaszaihoz. A kijelölt PCR előtti oldatok pipettázásához mindig a nukleázmentes, aeroszol-rezisztens hegyekkel ellátott, kijelölt PCR előtti pipettákat használja.
 - Tartsa tisztán a munkaterületeket. Tisztítsa meg a PCR előtti felületeket naponta és az egyes vizsgálatok között 10%-os hipóoldattal és/vagy olyan termékkel, mint a DNAzap vagy az RNase AWAY. Távolítsa el a maradék hipót 70%-os etanollal.
 - Viseljen tiszta laborköpenyt és tiszta, hintőpormentes kesztyűt. Alkalmazzon jó laboratóriumi higiénit, beleértve a kesztyű cseréjét is, ha bármilyen potenciálisan szennyezett felülettel érintkezik.

- Cserélje ki az aeroszol barrierrel ellátott pipettahegyeket minden kézi folyadéktranszfer között.
 - A nukleinsav mintákból történő kivonása során alkalmazzon megfelelő aszeptikus technikát a minták közötti keresztszennyeződés kockázatának minimalizálása érdekében, és kerülje el a nukleázok véletlen bejutását a mintákba.
 - Ha lehetséges, tartsa a reagenseket és a reakciócsöveket lezárva vagy lefedve.
- 11** Ne egyen, igyon, dohányozzon, és ne alkalmazzon kozmetikai termékeket a munkaterületeken.
- 12** A teszt reagenseinek, a tesztprotokollnak vagy az eszközöknek a módosítása nem engedélyezett.
- 13** A reagenseket a **2. táblázat**, 11. oldal és a **„Tárolás és kezelés”**, 17. oldal bekezdésekben meghatározott módon kell tárolni és kezelni.
- 14** Ne használja a készletet a megadott lejáratidő után.
- 15** A hulladékot a helyi, állami és szövetségi előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa.
- 16** A biztonsági adatlapok a www.agilent.com címen érhetők el.
- 17** Ne használjon olyan anyagokat a valós idejű PCR készüléken, amelyek guanidin-tiocianátot vagy bármilyen guanidintartalmú anyagot tartalmazhatnak. Nagyon reaktív és/vagy toxikus vegyületek képződhetnek, ha ezek nátrium-hipoklorittal (hipóval) keverednek.
- 18** A pozitív eredmények a SARS-CoV-2 RNS jelenlétére utalnak.

Tárolás és kezelés

Termék csomagolása

Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit kézhezvételét követően gondosan ellenőrizze a termék dobozát, hogy nincs-e rajta látható sérülés. Ha a termék doboza sérült, forduljon az Agilent műszaki ügyfélszolgálatához.

A reagensek tárolása, kezelése és stabilitása

- Használat előtt mindig ellenőrizze a lejárat dátumot. Ne használjon lejárt reagenseket.
- Óvja a fluorogén próbákat a fénytől.
- A primereket, a próbákat (beleértve az alikvotokat is) és az enzim fő keverékeit fel kell olvasztani, majd az előkészítés és a felhasználás során mindig jégen vagy hideg állványon kell tartani.
- A kontrollokat fel kell olvasztani, majd az előkészítés és a felhasználás során mindig jégen vagy hideg állványon kell tartani.
- Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit reagenseinek tárolási hőmérsékleteivel kapcsolatban lásd: **2. táblázat**, 11. oldal.

Minta gyűjtése, kezelése és tárolása

A nem megfelelő vagy helytelen mintagyűjtés, tárolás és szállítás valószínűleg hamis vizsgálati eredményeket eredményez. A minta minőségének fontossága miatt erősen ajánlott a mintagyűjtés oktatása. A CLSI MM13-A megfelelő forrásként hivatkozható.

- Mintagyűjtés
 - Tekintse meg a 2019. évi új koronavírus (2019-nCoV) átmeneti útmutatóit a vizsgálandó betegek klinikai mintáinak összegyűjtésével, kezelésével és tesztelésével kapcsolatban: Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (PUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
 - A megfelelő mintagyűjtési módszerek tekintetében kövesse a mintagyűjtő eszköz gyártójának utasításait.
- Minták szállítása
 - A betegtől összegyűjtött klinikai anyag megfelelő szállítórendszerbe kerül. Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit esetén ez NP mintákat jelent vírusos transzportközegben (viral transport medium, VTM), univerzális transzportközegben (universal transport medium, UTM), fiziológiás sóoldatban, Amies oldatban vagy a mintaszállító közegben (specimen transport medium, STM).

3 A nukleinsavak kivonására vonatkozó utasítások

Nukleinsavak kivonása **19**

Ez a fejezet utasításokat tartalmaz az RNS kivonására a klinikai vizsgálati mintákból, valamint a humán kontroll mintáról.

Nukleinsavak kivonása

Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit teljesítménye függ a humán mintából tisztított RNS-minta mennyiségétől és minőségétől. Az alábbi, kereskedelmi forgalomban kapható RNS-extrakciós készleteket és eljárásokat minősítették és validálták az RNS kinyerésére és tisztaságára a készlettel való használat tekintetében.

A minta extrakciója során a gyártó által ajánlott eljárásokat kell követni (kivéve az alábbi ajánlásokat). A humán kontroll mintát minden egyes extrakciós tételnek tartalmaznia kell.

QIAGEN QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, automatizálási protokoll

Ajánlás: Használjon 140 µl mintát, és eluálja 60 µl pufferrel.

MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, automatizálási protokoll

Ajánlás: Használjon 200 µl mintát, és eluálja 50 µl pufferrel.

4 Utasítások a qRT-PCR reakciók előkészítéséhez

Állítsa be a qRT-PCR kísérletet a valós idejű PCR rendszeren **21**

A qRT-PCR reakciók előkészítése **41**

Ez a fejezet utasításokat tartalmaz a kvantitatív reverz transzkripció PCR (qRT-PCR) reakciók előkészítésére a tesztmintákhoz és a kontrollmintákhoz.

Állítsa be a qRT-PCR kísérletet a valós idejű PCR rendszeren

A qRT-PCR reakciólemez beállítása előtt állítsa be a kísérletet a valós idejű PCR rendszerben úgy, hogy a készülék azonnal készen álljon a működésre, amint a reakciólemezt előkészíti.

Kövesse az adott valós idejű PCR rendszer utasításait.

Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR rendszer

- Ha nincs mintafájla a szükséges beállításokkal, lásd: **„Hozzon létre és állítsa be az AriaMx/AriaDx kísérletet (akkor szükséges, ha még nem hoztak létre sablont)”**, 21. oldal.
- Ha rendelkezik mintafájllal, lásd: **„Az AriaMx/AriaDx kísérlet létrehozása mentett sablonból”**, 27. oldal.

MEGJEGYZÉS

Kapcsolja be az AriaMx vagy AriaDx készüléket legalább 3 órával a használat előtt. A készüléket folyamatosan bekapcsolva lehet hagyni, hogy mindig készen álljon a használatra.

A készülék specifikációi szerint az üzemi körülmények 20–30 °C, 20–80%-os páratartalom és ≤ 2000 méter tengerszint feletti magasság.

ABI 7500 Fast Real Time PCR készülék

- Ha nincs mintafájla a szükséges beállításokkal, lásd: **„Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása és beállítása (szükséges, ha a sablont még nem hozta létre)”**, 27. oldal.
- Ha rendelkezik mintafájllal, lásd: **„Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása mentett sablonból”**, 33. oldal.

Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR észlelő rendszer

- Ha nem rendelkezik a szükséges beállításokhoz kimentett protokollal és lemezfájlokkal, lásd: **„Hozza létre és állítsa be a Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérletet (akkor szükséges, ha a mentett protokoll és lemezfájlok még nincsenek létrehozva)”**, 34. oldal.
- Ha rendelkezik mentett protokollal és lemezfájlokkal, lásd: **„A Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérlet létrehozása a kimentett protokollból és a lemezfájlokból”**, 39. oldal.

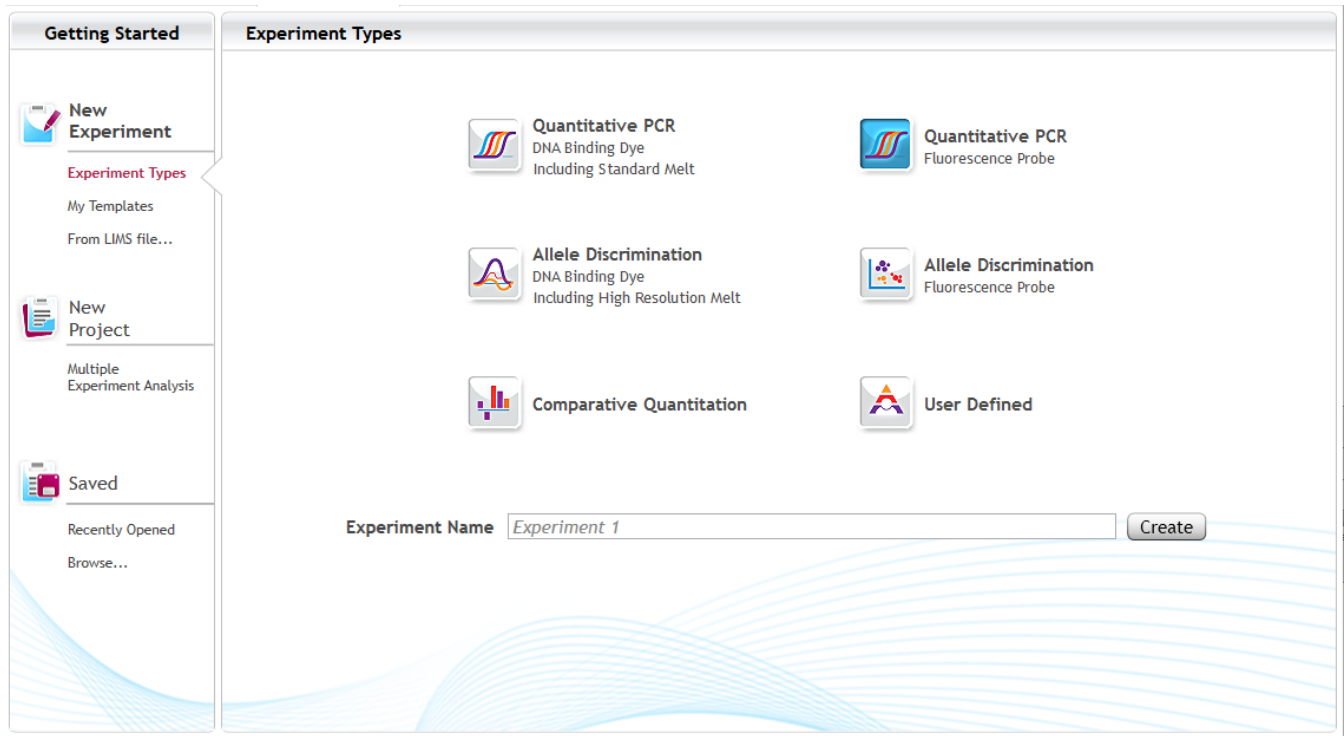
Hozzon létre és állítsa be az AriaMx/AriaDx kísérletet (akkor szükséges, ha még nem hoztak létre sablont)

Ha a kísérlethez már létezik sablon, lépjen a következőre: **„Az AriaMx/AriaDx kísérlet létrehozása mentett sablonból”**, 27. oldal.

1. lépés: A kísérlet létrehozása

- 1 A készülékhez csatlakoztatott számítógépen nyissa meg az Aria szoftver Getting Started (Első lépések) képernyőjét.
- 2 A **New Experiment** (Új kísérlet) lehetőségnél kattintson az **Experiment Types** (Kísérlet típusa) lehetőségre (ha még nincs kiválasztva).

- 3 A képernyő közepén válassza a **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** (Kvantitatív PCR, fluoreszcens próba) lehetőséget az itt látható módon: **2. ábra**.



2. ábra Az Aria Getting Started (Első lépések) képernyő – **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** (Kvantitatív PCR, fluoreszcens próba) lehetősége ki van választva

- 4 Írja be a kísérlet nevét az Experiment Name (Kísérlet neve) mezőbe, és kattintson a **Create** (Létrehozás) gombra.

Az új kísérlet a Plate Setup (Lemez beállítása) képernyőn jelenik meg. Alapértelmezésben a lemeztérkép minden cellája ki van választva.

Akkor válassza ki mind a 96 cellát, ha a lemez minden cellájában lesz qRT-PCR-reakció. Ha a lemez bármelyik cellája üres, akkor azok kijelölését törölje ebben a lépésben.

2. lépés: A cellatípusok és -nevek hozzárendelése

- 5 A képernyő jobb oldalán, a Tulajdonságok panelben nyissa le a **Well type** (Cellatípus) legördülő listát, és válassza ki az **Unknown** (Ismeretlen) lehetőséget.

A lemeztérképen ekkor minden cella ismeretlenként (Unknown) lesz megjelölve.

- 6 Rendelje hozzá az A12-es cellához a negatív kontroll mintát (No Template Control, NTC).

a Kattintson a lemeztérképen az A12-es cellára, hogy kiválassza az adott cellát.

b A képernyő jobb oldalán, a Tulajdonságok panelben nyissa le a **Well type** (Cellatípus) legördülő listát, és válassza ki az **NTC** lehetőséget.

Az A12-es cella NTC megjelölést kap a lemeztérképen, a többi cella típusa pedig ismeretlen (Unknown) marad.

7 A lemeztérképen válasszon ki minden cellát újra.

A lemeztérkép bal felső sarkában a jelölőnégyzetre kattintva egyszerre kiválaszthat minden cellát.

A lemez beállítása most a **3. ábra** szerinti lesz.

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

3. ábra A cellatípus hozzárendelése az Aria Plate Setup (Lemez beállítása) képernyőn

8 Rendelje hozzá a kontroll cellákhoz azok nevét, és ha szeretné, nevezze el a vizsgálati mintákat tartalmazó cellákat is. A kontroll cellákhoz a következő táblázatban látható neveket kell hozzárendelni: **7. táblázat**. Kézzel is hozzárendelheti a neveket a cellákhoz, valamint a cellák azonosítóinak és a hozzájuk tartozó neveknek a listáját tartalmazó Excel táblázat vagy vesszővel elválasztott szövegfájl importálásával is elvégezhető a hozzárendelés.

- A cellákhoz a név manuális hozzárendeléséhez módosítsa a Show (Megjelenítés) beállítást **Type** (Típus) lehetőségről **Name** (Név) lehetőségre. Válassza ki a cellá(ka)t a lemezen, majd adja meg a kiválasztott cellá(k)hoz tartozó neve(ke)t a Cella neve mezőben.
- Ha a nevet Excel vagy szöveges fájlból rendeli hozzá, kattintson a jobb egérgombbal a lemeztérképre, és válassza ki az **Import Well Name** (Cellanév importálása) lehetőséget. A megjelenő párbeszédpanelben válassza ki az Excel vagy szöveges fájlt. A fájl formátumával kapcsolatos követelményekkel kapcsolatban olvassa el az Aria súgóját.

7. táblázat Cella név hozzárendelése a kontroll cellákhoz

Cella azonosítója	Cella neve
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pozitív

* Ha egynél több humán kontroll mintát szeretne a lemezre tenni, használjon további cellákat a 12. oszlopban azokhoz a reakciókhoz, és annak megfelelően nevezze el a cellákat (pl. HSC1, HSC2 stb.).

3. lépés: Festékek és célok hozzárendelése

9 A Tulajdonságok panelben az **Add Dyes** (Festékek hozzáadás) lehetőségnél jelölje be az FAM, HEX és Cy5 jelölőnégyzeteket.

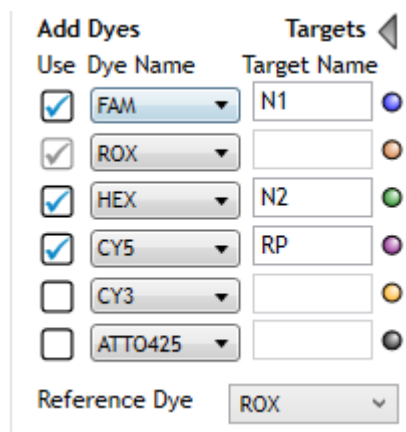
A cellák lemeztérképén az egyes festékeknek megfelelő színekódolt pont látható.

10 A Reference Dye (Referencia festék) legördülő listán válassza a **ROX** lehetőséget.

Az „R” jelölésű színekódolt pont jelenik meg a lemeztérkép minden cellájánál.

11 Kattintson a **Targets** (Célok) lehetőség mellett található nyílhegyre.

12 A megjelenő Target Name (Cél neve) mezőben adja meg a cél nevét az itt látható módon:
4. ábra.



4. ábra Festék és cél hozzárendelése az Aria Plate Setup (Lemez beállítása) képernyőn

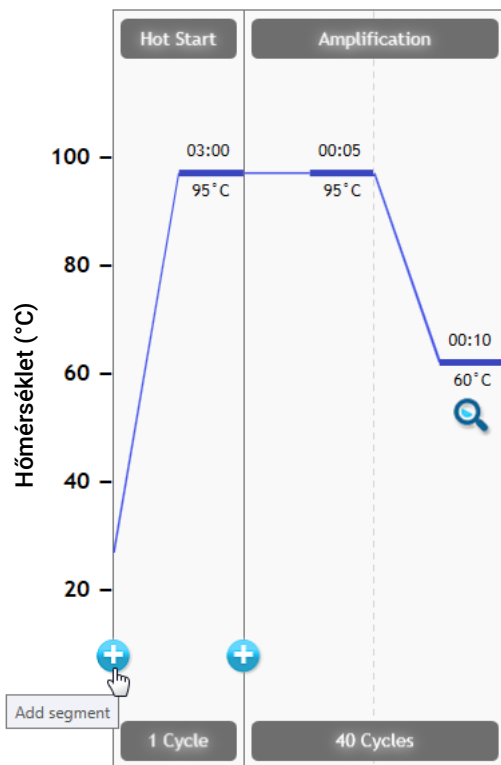
4. lépés: A hőprofil beállítása

13 A képernyő bal oldalán, a **Set Up** (Beállítás) lehetőségnél kattintson a **Thermal Profile** (Hőprofil) lehetőségre.

Megjelenik a Thermal Profile (Hőprofil) képernyő, és látható lesz az alapértelmezett hőprofil.

14 A ciklusok előtt adjon hozzá egy RT-szegmenst a program kezdetéhez.

a A kijelzőn húzza a kurzort a Hot Start (Meleg kezdete) szegmenshez. Kattintson a + ikonra (lásd **5. ábra**), amely a Hot Start (Meleg kezdete) szegmens bal oldalán jelenik meg.

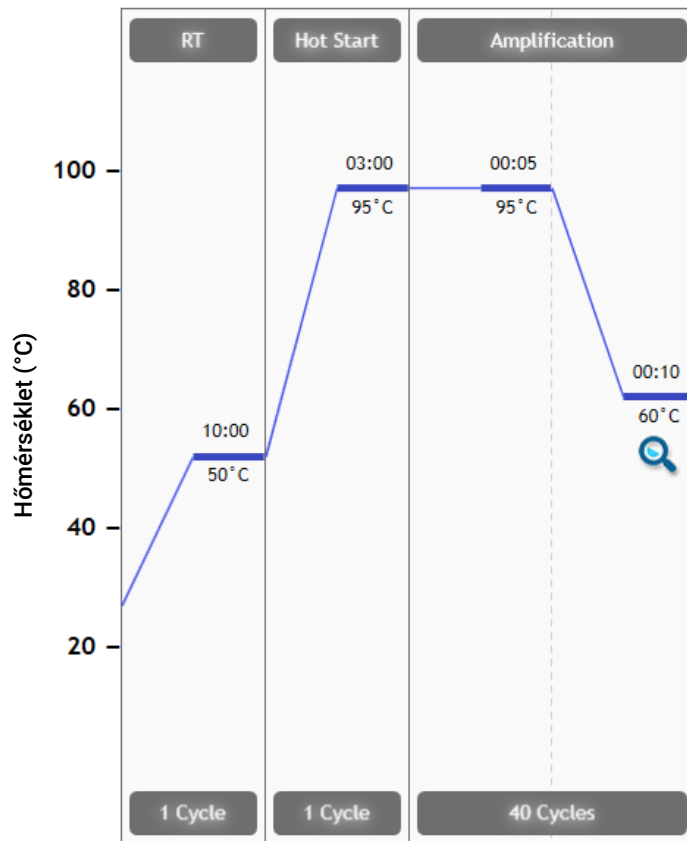


5. ábra Új szegmens hozzáadása az Aria Thermal Profile (Hőprofil) képernyőhöz

A program megnyit egy helyőrzőt az új szegmens számára, amely felsorolja a rendelkezésre álló szegmenstípusokat.

b A helyőrző szegmensben kattintson az **RT** lehetőségre.

A hőprofil megjelenik, lásd: **6. ábra**.



6. ábra Hőprofil az Aria Thermal Profile (Hőprofil) képernyőn

15 Győződjön meg arról, hogy a képernyőn látható hőprofil megfelel-e a hőciklus programnak, lásd: 8. táblázat.

8. táblázat Az AriaMx/AriaDx Real-Time PCR rendszer hőciklus programja

Szegmens száma	Ciklusok száma	Időtartam	Hőmérséklet
1	1	10 perc	50 °C
2	1	3 perc	95 °C
3	40	5 másodperc	95 °C
		10 másodperc	60 °C

5. lépés: Mentse a kísérletet sablonként

16 Kattintson a **File > Save As Template** (Fájl > Mentés sablonként) lehetőségre.

Megnyílik a Save As (Mentés másként) párbeszédablak. A fájl típusa **AriaMx Template Files** (AriaMx mintafájlok) (fájl kiterjesztése *amxt*) vagy **AriaDx Template Files** (AriaDx mintafájlok) (fájl kiterjesztése *adxt*) lesz.

17 Válasszon egy mappát az új sablonnak.

18 A fájl neve mezőben írja be, hogy **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

19 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

A párbeszédablak bezáródik, és a program elmenti az új sablonfájlt a megadott mappába.

A jövőben a vizsgálatokhoz használja a mentett sablont, a segítségével hozzon létre és állítson be qRT-PCR kísérleteket az **„Az AriaMx/AriaDx kísérlet létrehozása mentett sablonból.”** szakaszban leírt módon.

Ekkor folytassa kísérleteket az **„A qRT-PCR reakciók előkészítése”**, 41. oldal szakasszal.

Az AriaMx/AriaDx kísérlet létrehozása mentett sablonból

Ha a szükséges lemezbeállítással és hőprofilal még nem készült kísérleti sablon, lásd: **„Hozzon létre és állítsa be az AriaMx/AriaDx kísérletet (akkor szükséges, ha még nem hoztak létre sablont)”**, 21. oldal.

- 1 A készülékhez csatlakoztatott számítógépen nyissa meg az Aria szoftver Getting Started (Első lépések) képernyőjét.
- 2 A **New Experiment** (Új kísérlet) lehetőségnél kattintson a **My Templates** (Saját sablonok) elemre.
- 3 A kísérlet neve mezőbe írja be az új kísérlet nevét.
- 4 Válassza az **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** sablont, és hozza létre a kísérletet.
 - Ha a sablon az alapértelmezett mappában van, kattintson közvetlenül a sablonra a kiválasztáshoz, majd kattintson a **Create** (Létrehozás) lehetőségre (vagy kattintson duplán közvetlenül a sablonra). A program létrehozza az új kísérletet, és megnyitja a kísérletet a Plate Setup (Lemez beállítása) képernyőn.
 - Ha a sablon nincs a jelenleg kiválasztott mappában, kattintson a **Browse to Template** (Tallózás a sablonhoz) ikonra (lásd alább) a böngésző ablak megnyitásához. Keresse meg az **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** sablon fájlt tartalmazó mappát. Válassza ki a fájlt, és kattintson az **Open** (Megnyitás) gombra. A program létrehozza az új kísérletet, és megnyitja a kísérletet a Plate Setup (Lemez beállítása) képernyőn.



Ekkor folytassa kísérleteket az **„A qRT-PCR reakciók előkészítése”**, 41. oldal szakasszal.

Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása és beállítása (szükséges, ha a sablont még nem hozta létre)

Ha a kísérlethez már létezik sablon, lépjen a következőre: **„Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása mentett sablonból”**, 33. oldal.

1. lépés: A kísérlet létrehozása

- 1 Kapcsolja be az ABI 7500 Fast készüléket.
- 2 A készülékhez csatlakoztatott számítógépről nyissa meg a 7500 rendszer szoftvert.
- 3 A kezdőképernyőn a **Set Up** (Beállítás) lehetőségnél kattintson az **Advanced Setup** (Haladó beállítás) elemre.

Ekkor megnyílik az Experiment (Kísérlet) képernyő.

- 4 A képernyő bal oldalán, az **Experiment Menu** (Kísérlet menüben) a **Setup** (Beállítás) lehetőségnél kattintson az **Experiment Properties** (Kísérlet tulajdonsága) elemre (ha még nincs kiválasztva).

A kísérlet tulajdonságainak beállításai a képernyő közepén jelennek meg.

- 5 Válaszoljon a képernyőn megjelenő kérdésekre az itt látható választások és bejegyzések segítségével: **9. táblázat**

9. táblázat Kísérlet tulajdonságai beállítások

Kérdés	Választások/bejegyzések
How do you want to identify this experiment? (Hogy szeretné azonosítani ezt a kísérletet?)	<ul style="list-style-type: none"> Experiment Name (Kísérlet neve): adjon meg egyedi nevet a kísérletnek Barcode (Vonalkód): hagyja üresen User Name (Felhasználó neve): adja meg a nevét Comments (Megjegyzések): szükség esetén írjon megjegyzést vagy hagyja üresen
Which instrument are you using to run the experiment? (Melyik készüléket használja a kísérlethez?)	7500 Fast (96 cellás)
What type of experiment do you want to set up? (Milyen típusú kísérletet szeretne beállítani?)	Quantitation – Standard Curve (Számszerűsítés – standard görbe)
Which reagents do you want to use to detect the target sequence? (Milyen reagenseket szeretne használni a cél szekvencia detektálására?)	TaqMan® Reagents (TaqMan® reagensek)
Which ramp speed do you want to use in the instrument run? (Melyik hőmérséklet-változási sebességet szeretné használni a készülék használata közben?)	Fast (Gyors)

2. lépés: A célok és a minták meghatározása

- 6 A képernyő bal oldalán lévő **Experiment Menu** (Kísérlet) menüben, a **Setup** (Beállítás) lehetőségnél kattintson a **Plate Setup** (Lemez beállítása) elemre. Győződjön meg arról, hogy a **Define Targets and Samples** (Célok és minták meghatározása) fül van kiválasztva felül.

A célok és a minták meghatározásának eszközei a képernyő közepén jelennek meg.

- 7 A Define Targets (Célok meghatározása) táblázatban hozzon létre célokat az N1, N2 és RP célokra az ábra szerint: **7. ábra**. Szükség esetén kattintson az **Add New Target** (Új cél hozzáadása) gombra, hogy hozzáadjon egy sort a táblázathoz.

A **Quencher** (Kioltó) kiválasztásához válassza a **NFQ-MGB** lehetőséget minden cél esetén. A **Color** (Szín) kiválasztásához használja az alapértelmezett színt vagy válassza ki a kívánt színt.

Define Targets			
<input type="button" value="Add New Target"/> <input type="button" value="Add Saved Target"/> <input type="button" value="Save Target"/> <input type="button" value="Delete Target"/>			
Target Name	Reporter	Quencher	Color
N1	FAM	NFQ-MGB	
N2	VIC	NFQ-MGB	
RP	CY5	NFQ-MGB	

7. ábra Céldefiníciók a 7500 szoftver Plate Setup (Lemez beállítása) képernyőjén

- 8 A Define Samples (Minták meghatározása) táblázatban hozzon létre mintaneveket az alábbiak szerint: **8. ábra**. Szükség esetén kattintson az **Add New Sample** (Új minta hozzáadása) gombra, hogy hozzáadjon egy sort a táblázathoz.

A három minta a humán kontroll minta (**HSC**), a negatív kontroll minta (**NTC**) és a pozitív kontroll (**Pos**) SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontrollal. Vegye figyelembe, hogy a vizsgálati mintákhoz nincs hozzárendelve a minta neve.

A **Color** (Szín) kiválasztásához használja az alapértelmezett színt vagy válassza ki a kívánt színt.

Define Samples	
<input type="button" value="Add New Sample"/> <input type="button" value="Add Saved Sample"/> <input type="button" value="Save Sample"/> <input type="button" value="Delete Sample"/>	
Sample Name	Color
HSC	
NTC	
Pos	

8. ábra Mintadefiníciók a 7500 szoftver Plate Setup (Lemez beállítása) képernyőjén

3. lépés: Célok és feladatok hozzárendelése

- 9 A képernyő felső részén kattintson az **Assign Targets and Samples** (Célok és minták hozzárendelése) fülre. Győződjön meg arról, hogy a **View Plate Layout** (Lemez elrendezésének megtekintése) fül van kiválasztva.

A képernyőn egy 96 cellás lemez lemeztérképe látható.




- 10 A lemeztérképen válassza ki mind a 96 cellát.

A kiválasztott cellák kékkel megjelölve, fehér ovális középső résszel láthatók.

Mind a 96 cella kiválasztása akkor megfelelő, ha a lemez minden cellájában qRT-PCR reakciót fog végezni. Ha a lemez bármelyik cellája üres lesz, akkor azok kijelölését törölje ebben a lépésben.

11 Az **Assign target(s) to the selected wells** (Cél(ok) hozzárendelése a kiválasztott cellákhoz) alatt látható táblázatban jelölje be mind a három jelölőnégyzetet az oszlop hozzárendelése részben, hogy jelezze, minden cella esetén mindhárom célt figyelni és jelenteni fogják. A Feladat oszlopban ellenőrizze, hogy mindhárom célnál „U” van-e kiválasztva. Lásd: **9. ábra**.

A lemeztérképen a 96 cella mindegyik céljához tartozik egy szimbólum.

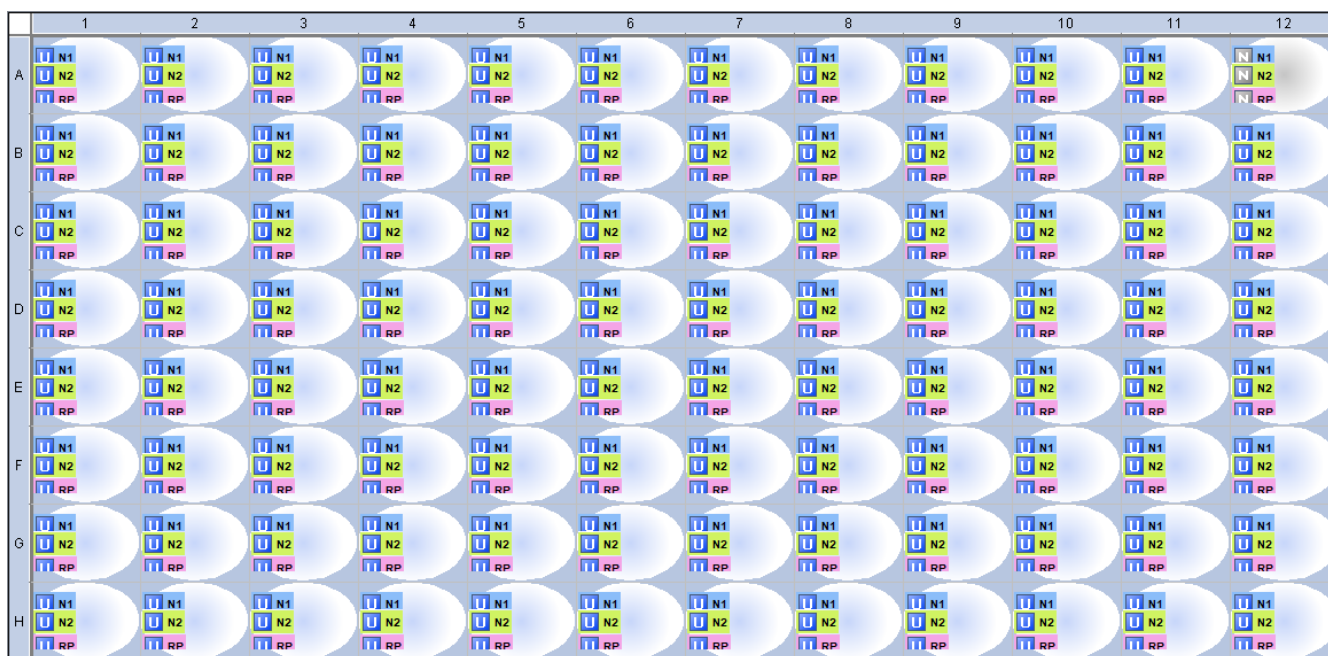
Assign target(s) to the selected wells.			
Assign	Target	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	N1		
<input checked="" type="checkbox"/>	N2		
<input checked="" type="checkbox"/>	RP		

9. ábra Célfeladatok a 7500 szoftver View Plate Layout (Lemez nézetének elrendezése) fölön

12 Változtassa meg a negatív kontroll minta cellához rendelt feladatot.

- a A lemeztérképen válassza ki az A12 cellát.
- b Az **Assign target(s) to the selected wells** (Cél(ok) hozzárendelése a kiválasztott cellákhoz) alatt látható táblázatban változtassa meg a kiválasztást a Feladatok oszlopban – mindhárom cél esetén állítsa „N”-re. Győződjön meg arról, hogy a jelölőnégyzetek az Assign (Hozzárendelés) oszlopban bejelölve maradtak-e.

A lemeztérkép az itt látható módon jelenik meg: **10. ábra**.



10. ábra Lemeztérkép a 7500 szoftver Plate Setup (Lemez beállítása) képernyőjén

4. lépés: Kontroll minták hozzárendelése

13 Rendelje hozzá a negatív kontrollt az A12-es cellához.

- a Válassza ki az A12 cellát a lemeztérképen.
- b Az **Assign sample(s) to the selected wells** (Minta/minták hozzárendelése a kiválasztott cellákhoz) alatt látható táblázatban jelölje meg az **NTC** lehetőséget.

A minta neve (NTC) megjelenik a kiválasztott cellánál.

14 Rendelje hozzá a humán kontroll mintát a B12-es cellához.

- a Válassza ki a B12 cellát a lemeztérképen.

Ha egynél több humán kontroll mintát szeretne a lemezre helyezni, válassza ki a szükséges további cellákat a lemeztérkép 12. oszlopában.

- b Az **Assign sample(s) to the selected wells** (Minta/minták hozzárendelése a kiválasztott cellákhoz) alatt látható táblázatban jelölje meg az **HSC** lehetőséget.

A minta neve (HSC) megjelenik a kiválasztott cellá(k)nál.

15 Rendelje hozzá a SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontroll mintát a H12-es cellához.

- a Válassza ki a H12 cellát a lemeztérképen.
- b Az **Assign sample(s) to the selected wells** (Minta/minták hozzárendelése a kiválasztott cellákhoz) alatt látható táblázatban jelölje meg a **Pos** lehetőséget.

A minta neve (Pos) megjelenik a kiválasztott cellánál.

5. lépés: Referencia festék hozzárendelése

16 A **Select the dye to use as the passive reference** (Festék kiválasztása passzív referenciaként) alatt látható táblázatban válassza ki a **ROX** lehetőséget.

6. lépés: A futtatási módszer beállítása

17 A képernyő bal oldalán lévő **Experiment Menu** (Kísérlet) menüben, a **Setup** (Beállítás) lehetőségnél kattintson a **Run Method** (Futtatási módszer) elemre. Kattintson a **Tabular View** (Táblázatos nézet) fülre a felső részen.

A reakciótérfogat és a hőprofil meghatározásának eszközei a képernyő közepén jelennek meg.

18 Ellenőrizze, hogy a **Reaction Volume Per Well** (Reakciótérfogat cellánként) mező értéke 20 µl legyen. Ha nem, írja be a **20** értéket a mezőbe.

19 Állítsa a hőprofil az itt láthatók szerint: **11. ábra**. A beállítások összefoglalását lásd: **10. táblázat**.

Ha az 50 °C-os reverz transzkripció lépés érdekében a hőprofil elejéhez új tartási lépést kell hozzáadnia, kövesse az alábbi lépéseket.

- a Válassza ki a hőprofil kép bal szélső fokozatát.
- b Kattintson az **Add Stage > Holding** (Fokozat hozzáadása > Tartás) lehetőségre.

Egy új tartási fokozat kerül hozzáadásra a hőprofil kezdetéhez. Módosítsa a hőmérsékletet és az időtartamot az itt látható módon: **11. ábra**.

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

11. ábra Hőprofil a 7500 szoftver Run Method (Futtatási módszer) képernyőjén

10. táblázat Hőprofil beállításai a 7500 Fast Real Time PCR készüléken

Szegmens száma	Ciklusok száma	Időtartam	Hőmérséklet
1	1	10 perc	50 °C
2	1	3 perc	95 °C
3	40	5 másodperc	95 °C
		30 másodperc	60 °C

7. lépés: A kísérlet mentése

20 A képernyő felső részén kattintson a **Save** (Mentés) gomb melletti lefelé mutató nyílhegyre a Mentés opció menüjének megnyitásához.

21 Válassza ki a **Save As** (Mentés másként) lehetőséget a menüben.

Megnyílik a Save As (Mentés másként) párbeszédablak.

22 Válasszon egy mappát az új kísérlet fájljának.

23 A fájl neve mezőbe írja be a kísérlet nevét.

24 Győződjön meg arról, hogy a fájl típusa **Experiment Document Single files (*.eds)** (Kísérleti dokumentum egyedi fájlok (*.eds)) legyen.

25 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

A párbeszédablak bezáródik, és a program elmenti a kísérlet fájlt a megadott mappába.

8. lépés: A kísérlet mentése sablonként jövőbeli felhasználásra

26 Kattintson a **Save** (Mentés) gomb melletti lefelé mutató nyílhegyre a mentési lehetőségek menü megnyitásához.

27 A menüben válassza ki a **Save As Template** (Mentés sablonként) lehetőséget.

Megjelenik a Save As Template (Mentés sablonként) párbeszédablak.

28 Válasszon egy mappát az új sablonnak.

29 A fájl neve mezőben írja be, hogy **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

30 Győződjön meg arról, hogy a fájl típusa **Experiment Document Template files (*.edt)** (Kísérleti dokumentum mintafájlok (*.edt)) legyen.

31 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

A párbeszédablak bezáródik, és a program elmenti az új sablonfájlt a megadott mappába.

A jövőben a vizsgálatokhoz használja a mentett sablont, a segítségével hozzon létre és állítson be qRT-PCR kísérleteket az „**Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása mentett sablonból.**” szakaszban leírt módon.

Ekkor folytassa kísérleteket az „**A qRT-PCR reakciók előkészítése**”, 41. oldal szakasszal.

Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása mentett sablonból

Ha a szükséges lemezbeállítással és hőprofilal még nem készült kísérleti sablon, lásd: „**Az ABI 7500 Fast kísérlet létrehozása és beállítása (szükséges, ha a sablont még nem hozta létre)**”, 27. oldal.

1. lépés: A kísérlet létrehozása

1 Kapcsolja be az ABI 7500 Fast készüléket.

2 A készülékhez csatlakoztatott számítógépről nyissa meg a 7500 rendszer szoftvert.

3 A kezdőképernyőn a **Set Up** (Beállítás) lehetőségnél kattintson a **Template** (Sablon) elemre.

Megnyílik a Megnyitás párbeszédpanel.

4 A párbeszédablakban keresse meg a mappát, ahová a sablont mentette.

5 Kattintson duplán az **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt** fájlra.

A készülék elindul.

A 7500 rendszer szoftver megnyílik az Experiment (Kísérlet) képernyővel, és megjelennek rajta a lemez beállításai.

2. lépés: A kísérlet mentése

6 A képernyő felső részén kattintson a **Save** (Mentés) gomb melletti lefelé mutató nyílhegyre a Mentés opció menüjének megnyitásához.

7 Válassza ki a **Save As** (Mentés másként) lehetőséget a menüben.

Megnyílik a Save As (Mentés másként) párbeszédablak.

8 Válasszon egy mappát az új kísérlet fájlnak.

9 A fájl neve mezőbe írja be a kísérlet nevét.

10 Győződjön meg arról, hogy a fájl típusa **Experiment Document Single files (*.eds)** (Kísérleti dokumentum egyedi fájlok (*.eds)) legyen.

11 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

A párbeszédablak bezáródik, és a program elmenti a kísérlet fájlt a megadott mappába.

Ekkor folytassa kísérleteket az „**A qRT-PCR reakciók előkészítése**”, 41. oldal szakasszal.

Hozza létre és állítsa be a Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérletet (akkor szükséges, ha a mentett protokoll és lemezfájlok még nincsenek létrehozva)

Ha már van megfelelő protokoll és lemezfájl, folytassa a következővel: „**A Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérlet létrehozása a kimentett protokollból és a lemezfájlokból**”, 39. oldal.

1. lépés: A kísérlet létrehozása

1 Kapcsolja be a CFX96 Touch Real-Time PCR készüléket.

2 A készülékhez csatlakoztatott számítógépről nyissa meg a Bio-Rad CFX Maestro szoftver alkalmazást.

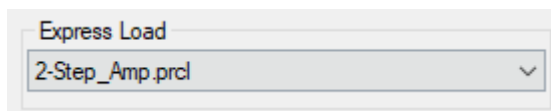
3 Az Indítási varázslóban a **Select instrument** (Készülék kiválasztása) legördülő listában állítsa be a **CFX96** értéket, majd kattintson a **User-defined** (Felhasználó által meghatározott) lehetőségre.

A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő megnyitja a Protocol (Protokoll) fület. Az alapértelmezett hőprofil megjelenik a képernyő középső részén.

2. lépés: A hőprofil beállítása

4 Az Express Load (Expressz betöltés) legördülő listában válassza a **2-Step_Amp.prc1** lehetőséget.

A hőprofil frissül az alapértelmezett beállításokra egy kétlépéses amplifikációs protokollhoz, amely alkalmas a fluoreszcens próbákkal való használatra.



12. ábra Az Expressz betöltés beállítása **2-Step_Amp.prc1** a CFX Maestro Protocol (Protokoll) fülön

5 Kattintson az **Edit Selected** (Kiválasztott szerkesztése) lehetőségre.

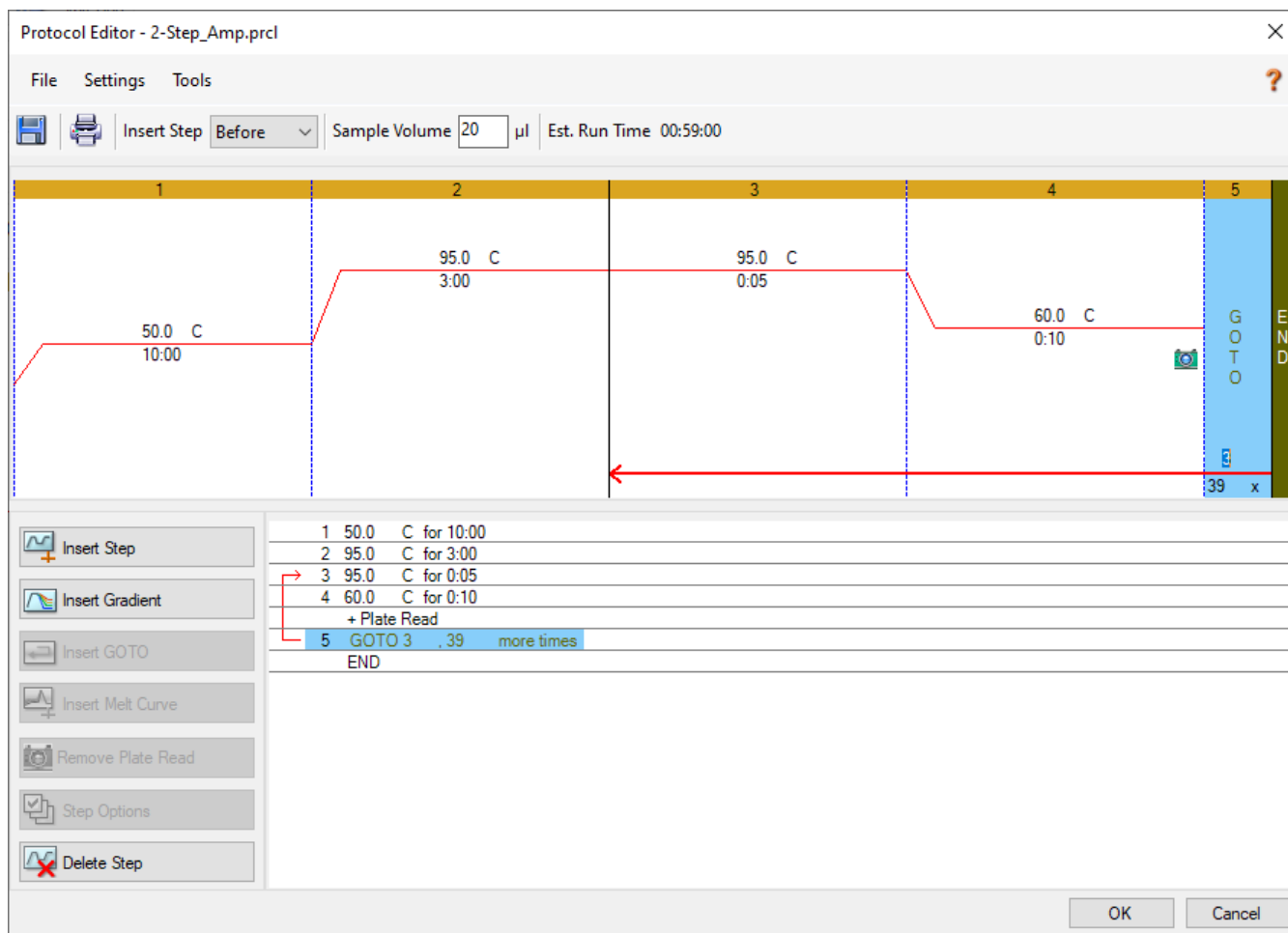
Megnyílik a Protokollszerkesztő ablak.

6 A Protokollszerkesztő ablakban adjon egy lépést a reverz transzkripció hőprofiljának kezdetéhez.

a Válassza ki az 1. lépést a hőprofil képen.

b Az Insert Step (Lépés beillesztése) legördülő listában válassza a **Before** (Ez elé) lehetőséget.

- c Kattintson az **Insert Step** (Lépés beillesztése) lehetőségre.
A kiválasztott lépés elé egy új 1. lépés kerül hozzáadásra.
 - d Szerkessze át az új lépés beállításait 50 °C-ra 10 percig.
- 7 Állítsa be a hőprofil többi lépését az itt látható módon: **13. ábra**. A beállítások összefoglalását lásd: **11. táblázat**. Győződjön meg arról, hogy a GOTO lépés (5. Lépés) 39-szeres ismétlésre van állítva.



13. ábra A CFX Maestro protokollszerkesztő ablak hőprofilja

11. táblázat A Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR készülék hőciklusainak programja

Szegmens száma	Ciklusok száma	Időtartam	Hőmérséklet
1	1	10 perc	50 °C
2	1	3 perc	95 °C
3	40	5 másodperc	95 °C
		10 másodperc	60 °C

3. lépés: A protokoll fájl mentése.

8 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

Megjelenik a Save As (Mentés másként) párbeszédablak, hogy megkérdezze, menti-e a protokoll fájlt a kísérlethez. A protokoll fájl tartalmazza a Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő Protocol (Protokoll) fülének beállításait.

9 Válasszon egy mappát a protokoll fájlból.

10 A fájl neve mezőben írja be: **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

11 Győződjön meg arról, hogy a fájl típusa **Protocol File (*.prcl)** (Protokoll fájl (*.prcl)) legyen.

12 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

A párbeszédablak bezáródik, és a program elmenti a protokoll fájlt a megadott mappába.

13 Kattintson az **OK** gombra a Protokollszerkesztő ablak bezárásához.

A jövőben a vizsgálatokhoz használja a mentett protokoll fájlt, melynek segítségével beállíthatja a Protocol (Protokoll) fület az itt leírt módon: „**A Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérlet létrehozása a kimentett protokollból és a lemezfájlokból.**”.

4. lépés: A fluorofórok kiválasztása és célnevek hozzárendelése

14 A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő alsó részén kattintson a **Next** (Következő) gombra.

A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyőn megjelenik a Plate (Lemez) fül. A lemeztérkép képe megjelenik a képernyő középső részén.

15 Győződjön meg arról, hogy a Scan Mode (Szkenelési mód) legördülő lista **All Channels** (Minden csatorna) értékre legyen beállítva.

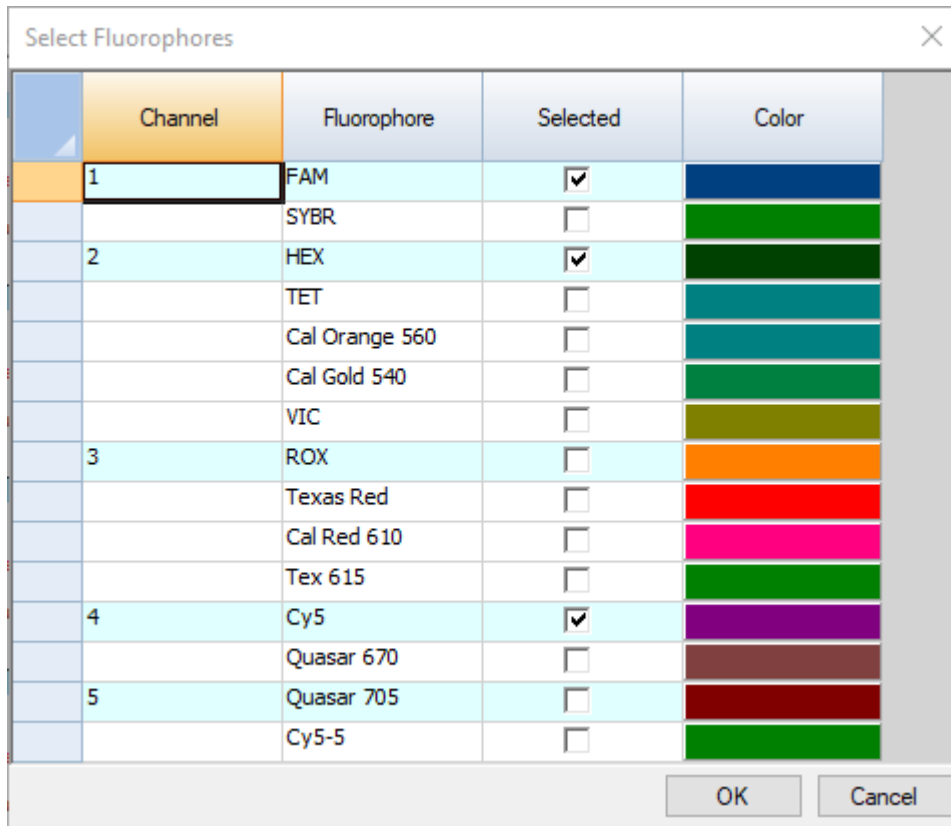
16 Kattintson az **Edit Selected** (Kiválasztott szerkesztése) lehetőségre.

Megnyílik a Lemezszerkesztő ablak.

17 A Lemezszerkesztő ablakban kattintson a **Select Fluorophores** (Fluorofórok kiválasztása) lehetőségre.

Megnyílik a Fluorofórok kiválasztása párbeszédablak.

18 A párbeszédablakban jelölje be az **FAM**, a **HEX** és a **Cy5** fluorofórok jelölőnégyzeteit. A többi fluorofór jelölőnégyzetének bejelölését törölje. Lásd: **14. ábra**.



14. ábra Fluorofórok kiválasztása a CFX Maestro Fluorofórok kiválasztása párbeszédablakban

19 Kattintson az **OK** gombra.

Bezárul a Fluorofórok kiválasztása párbeszédablak. A három kiválasztott fluorofór a Lemezszerkesztő ablak jobb oldalán látható felsorolva a **Target Names** (Célnevek) alatt.

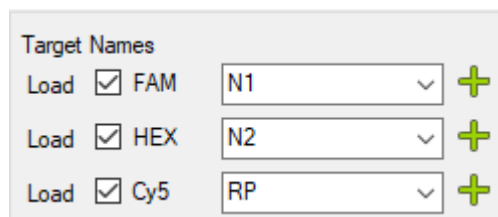
20 Válasszon ki minden cellát a lemeztérképen.

A kiválasztott cellák kékkel kiemelve láthatók.

Mind a 96 cella kiválasztása akkor megfelelő, ha a lemez minden cellájában qRT-PCR reakciót fog végezni. Ha a lemez bármelyik cellája üres lesz, akkor azok kijelölését törölje ebben a lépésben.

21 A **Target Names** (Célnevek) lehetőségénél győződjön meg arról, hogy mind a három fluorofór meg van jelölve, és minden cellában látható mindhárom fluorofór neve.

22 A fluorofórok nevei mellett található mezőkben adja meg a célneveket a fluorofórok esetén, lásd: **15. ábra**. Nyomja meg az **Enter** gombot az egyes nevek beírása után ahhoz, hogy a név alkalmazásra kerüljön a lemez celláin.



15. ábra Célnev hozzárendelése a CFX Maestro lemezszerkesztő ablakban

5. lépés: Mintatípusok és nevek hozzárendelése

23 No Template Control (Negatív kontroll, NTC) mintatípus hozzárendelése.

- Válassza ki az A12 cellát a lemeztérképen.
- A Sample Type (Minta típusa) legördülő listában válassza az **NTC** lehetőséget.

Az **NTC** címke megjelenik az A12-es cella tetején.

24 Győződjön meg arról, hogy a többi cellához az Unknown (Ismeretlen) minta típust jelölte, a cella tetején található **Unk** címkének megfelelően. Lásd: **16. ábra**.

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

16. ábra Mintatípus hozzárendelése a CFX Maestro lemezszerkesztő ablakban

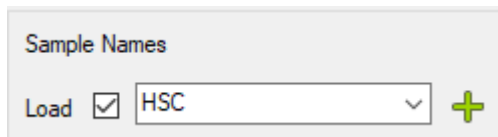
25 Rendelje hozzá a minta nevét a humán kontroll mintához a B12-es cellában.

- Válassza ki a B12 cellát a lemeztérképen.

Ha egynél több humán kontroll mintát szeretne a lemezre helyezni, válassza ki a szükséges további cellákat a lemeztérkép 12. oszlopában.

- A **Sample Names** (Minta neve) alatt látható mezőbe írja be a **HSC-t**, lásd: **17. ábra**. Nyomja meg az **Enter** gombot.

A minta neve (HSC) megjelenik a kiválasztott cellá(k)nál.



17. ábra A HSC név hozzárendelése a CFX Maestro lemezszerkesztő ablakban

26 Rendelje hozzá a minta nevét a SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontroll mintához a H12-es cellában.

a Válassza ki a H12 cellát a lemeztérképen.

b A **Sample Names** (Minta neve) alatt látható mezőbe írja be a **Pos**-t. Kattintson az **Enter** gombra.

A minta neve (Pos) megjelenik a H12-es cellánál.

6. lépés: Lemezfájl mentése

27 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

Megjelenik a Save As (Mentés másként) párbeszédablak, hogy megkérdezze, menti-e a lemezfájlt a kísérlethez. A lemezfájl tartalmazza a Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő Plate (Lemez) fülének a beállításait.

28 Válasszon egy mappát a lemezfájlnak.

29 A fájl neve mezőben írja be az **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate** nevet.

30 Győződjön meg arról, hogy a fájl típusa **Plate File (*.pltd)** (Lemezfájl (*.pltd)) legyen.

31 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

A párbeszédablak bezáródik, és a program elmenti a lemezfájlt a megadott mappába.

32 Kattintson az **OK** gombra a Lemezszerkesztő ablak bezárásához.

33 A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő alsó részén kattintson a **Next** (Következő) gombra.

A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyőn megjelenik a Start Run (Futtatás indítása) fül.

A jövőben a vizsgálatokhoz használja a mentett lemezfájlt, a segítségével állítsa be a Plate (Lemez) fület az „**A Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérlet létrehozása a kimentett protokollból és a lemezfájlokból.**” szakaszban leírt módon.

Ekkor folytassa közvetlenül az „**A qRT-PCR reakciók előkészítése**”, 41. oldal szakasszal.

A Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérlet létrehozása a kimentett protokollból és a lemezfájlokból

Ha a szükséges lemezbeállítással és hőprofillal még nem készült kísérlet, lásd: „**Hozza létre és állítsa be a Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR kísérletet (akkor szükséges, ha a mentett protokoll és lemezfájlok még nincsenek létrehozva)**”, 34. oldal.

1. lépés: A kísérlet létrehozása

1 Kapcsolja be a CFX96 Touch Real-Time PCR készüléket.

2 A készülékhez csatlakoztatott számítógépről nyissa meg a Bio-Rad CFX Maestro szoftver alkalmazást.

- 3 Az Indítási varázslóban a **Select instrument** (Készülék kiválasztása) legördülő listában állítsa be a **CFX96** értéket, majd kattintson a **User-defined** (Felhasználó által meghatározott) lehetőségre.

A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő megnyitja a Protocol (Protokoll) fület.
Az alapértelmezett hőprofil megjelenik a képernyő középső részén.

2. lépés: Töltse be a protokoll fájlt

- 4 Kattintson a **Select Existing** (Meglévő kiválasztása) lehetőségre.
Megnyílik a Protokoll kiválasztása párbeszédablak.
- 5 A párbeszédablakban navigáljon abba a mappába, amelybe az **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prcl** fájlt mentették.
- 6 Kattintson duplán a protokoll fájlra.
A protokoll fájl beállításai betöltésre kerülnek a kísérletbe.

3. lépés: A lemezfájl betöltése

- 7 A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő alsó részén kattintson a **Next** (Következő) gombra.
A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyőn megjelenik a Plate (Lemez) fül. A lemeztérkép képe megjelenik a képernyő középső részén.
- 8 Kattintson a **Select Existing** (Meglévő kiválasztása) lehetőségre.
Megnyílik a Lemez kiválasztása párbeszédablak.
- 9 A párbeszédablakban navigáljon abba a mappába, amelybe az **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.pltd** fájlt mentették.
- 10 Kattintson duplán a lemezfájlra.
A lemezfájl beállításai betöltésre kerülnek a kísérletbe.
- 11 A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő alsó részén kattintson a **Next** (Következő) gombra.
A Run Setup (Futtatás beállítása) képernyőn megjelenik a Start Run (Futtatás indítása) fül.
Ekkor folytassa közvetlenül az „**A qRT-PCR reakciók előkészítése**”, 41. oldal szakasszal.

A qRT-PCR reakciók előkészítése

VIGYÁZAT

Közvetlenül a használat előtt készítse elő a qRT-PCR lemezt, és mindig tartsa jégen vagy hideg állványban, amíg a valós idejű PCR készülékbe nem töltődik.

1. lépés: A qRT-PCR reagens keverék és a lemez előkészítése a PCR előtti munkaállomáson

- 1 Olvassa fel a fagyasztott qRT-PCR reagenseket jégen. A szükséges reagensek listáját lásd: **12. táblázat**. Tartsa a 10× SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx és a Reference Dye Dx termékeket fénytől védve.
- 2 Készítse el a mellékelt Reference Dye Dx 1:500 arányú hígítását nukleázmentes vízzel (a reakciókon belüli 30 nM végkoncentrációhoz). Minden referenciafestéket tartalmazó oldat fénytől védve tárolandó.

Ha a hígított Reference Dye Dx festéket fénytől védett csőben, 4 °C-on tárolják, akkor egy napon belül felhasználható további vizsgálatok beállításához.

- 3 Készítse elő a reagenskeveréket úgy, hogy az összetevőket az itt látható sorrendben adja hozzá: **12. táblázat**. Készítsen egyetlen reagenskeveréket az összes mintához (3 kontroll és legfeljebb 93 vizsgálati minta) az alább felsorolt összetevők többszörösével. Tartsa a reagenskeveréket jégen és fénytől védve. Közvetlenül használat előtt készítse elő a reagenskeveréket.
 - Ha 96 reakciót készít, akkor 2 ml-es csőben készítse elő a reagenskeveréket.
 - Ha 48 reakciót készít, akkor 1,5 ml-es csőben készítse elő a reagenskeveréket.

Segítségképpen a **12. táblázat** tartalmazza az 1, 48 és 96 reakció előállításához szükséges mennyiségeket.

12. táblázat qRT-PCR Reagent Mixture

Komponens	1 reakcióhoz való mennyiség	48 reakcióhoz való mennyiség (ideértve a felesleget)	96 reakcióhoz való mennyiség (ideértve a felesleget)
Nukleázmentes víz	1,5 µl	81 µl	162 µl
2× Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 µl	540 µl	1080 µl
10× SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx	2 µl	108 µl	216 µl
100 mM DTT Dx	0,2 µl	10,8 µl	21,6 µl
Diluted Reference Dye Dx (a 2. lépés -től)	0,3 µl	16,2 µl	32,4 µl
RT/RNase Block Dx	1 µl	54 µl	108 µl

- 4 Óvatosan, buborékok képződése nélkül keverje össze a reagenskeveréket vortex-keverőn, majd forgassa a csövet mikrocentrifugában 5 másodpercig.

- 5 Oszlasson el 15 μl reagenskeveréket a 96 cellás lemez celláiban a következő eljárással.
 - a Helyezzen egy tiszta 8x csősort a 96 cellás hideg állványra.
 - b Adjon 190 μl reagenskeveréket (ha 96 reakciót hajt végre) vagy 100 μl reagenskeveréket (ha 48 reakciót futtat) a 8 csövet tartalmazó csík minden csövébe. Szükség esetén távolítsa el minden nagy buborékot, amely a csövek alján jelen lehet.
 - c Tegyen át egy többcsatornás pipettával 15 μl reagenskeveréket a 8 cellás csősorból a 96 cellás lemez oszlopába. A lemezt az egész folyamat során jégen vagy a 96 cellás hideg állványban, fénytől védve kell tárolni.

MEGJEGYZÉS

Ha csak 48 reakciót hajt végre, akkor hagyja üresen az 1–6. oszlopokat.

- 6 Ha a lemez le van fedve, vigye a lemezt a PCR előtti munkaállomás minta hozzáadására kijelölt helyére. Tartsa a lemezt jégen vagy hideg állványon.

2. lépés: Kontroll és tesztminták hozzáadása a PCR előtti munkaállomás qRT-PCR lemezéhez (minta hozzáadási terület)

- 7 Hígítsa a SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS-kontrollt 10 munkakészletre/ μl .
 - a Adjon hozzá 99 μl nukleázmentes vizet egy tiszta, 1,5 ml-es csőhöz. Ehhez a csőhöz adjon 1 μl hígítatlan SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontrollt. Jól keverje össze vortex-keverővel, majd röviden forgassa egy mikrocentrifugában.
 - b Adjon hozzá 99 μl nukleázmentes vizet egy másik tiszta, 1,5 ml-es csőhöz. Ehhez a csőhöz adjon 1 μl hígított SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontrollt, amelyet ekkor készített el:
 - a. **lépés.** Jól keverje össze vortex-keverővel, majd röviden forgassa egy mikrocentrifugában.

Ez a cső működő SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS-kontrollt tartalmaz, koncentrációja 10 kópia/ μl .

Ha a munkakészletet 4 °C-on tárolják, akkor egy napon belül felhasználható további vizsgálatok beállítására. Helyezze vissza a SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS-kontroll eredeti készletét –80 °C-ra.

8 Állítsa be a kontroll reakciókat, lásd: **18. ábra**.

- A negatív kontroll mintához (No Template Control, NTC) adjon hozzá 5 µl nukleázmentes vizet az A12-es cellához.
- A humán kontroll mintához (Human Specimen Control, HSC) röviden keverje össze a humán kontroll mintából származó RNS-t. Ezután adjon hozzá 5 µl RNS-t a B12-es cellához.

Ha egynél több HSC minta van, amelyet fel kell venni a lemezre, használjon további cellákat a 12. oszlopban, ahogyan azt a lemez felállításakor a qRT-PCR készülék szoftverben jelezte.

- A SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontrollhoz (Poz) adjon 5 µl hígított SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontrollt a H12-es cellába.

9 Állítsa be a reakciókat a vizsgálati mintákhoz (S1 - S93), lásd: **18. ábra**. A szennyeződés elkerülése érdekében gyakran cserélje a kesztyűt.

- Röviden keverje meg a vizsgálati mintákból készített RNS mintákat. Ezután centrifugálja mikrocentrifugában 5 másodpercig.
- Minden mintához adjon 5 µl-t a qRT-PCR lemez egyik cellájába. Gondosan kövesse nyomon, hogy melyik mintát adta az egyes cellákba. Minden hozzáadás után cserélje ki a pipettahegyet.
- Ha a qRT-PCR lemezt ragasztószalaggal kell lezárni, akkor a lezárás előtt keverje össze a reakciókat úgy, hogy a keverékeket rövid ideig fel és le pipettázza buborékok képződése nélkül.

MEGJEGYZÉS

Ha csak 48 reakciót hajt végre, akkor hagyja üresen az S1-S48 jelzésű cellákat a lemezen.

10 Zárja le a lemezt egy ragasztószalaggal vagy kupakcsíkokkal.

11 Ha a lemez kupakcsíkokkal van lezárva, röviden keverje össze egy vortex-keverőn. (Ne használjon vortex-keverőt ragasztóval lezárt lemezekhez.)

12 Röviden forgassa meg a lemezt egy centrifugában.

13 Ha Agilent AriaMx/AriaDx valós idejű PCR rendszert használ, és a lemezt ragasztószalaggal zárta le, akkor helyezzen kompressziós párnát a lemez fölé.

14 Folytassa közvetlenül a qRT-PCR elvégzésével a valós idejű PCR rendszerén.

- Lásd: „**qRT-PCR elvégzése Agilent AriaMx/AriaDx valós idejű PCR rendszeren**”, 46. oldal
- Lásd: „**qRT-PCR elvégzése az ABI 7500 Fast valós idejű PCR készüléken**”, 55. oldal
- Lásd: „**qRT-PCR elvégzése Bio-Rad CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszeren**”, 62. oldal

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

18. ábra Lemez beállítása az 1–93 minták és a kontroll minták vizsgálatához (negatív kontroll [No Template Control, NTC], humán kontroll minta [Human Specimen Control, HSC] és szintetikus pozitív RNS kontroll [Synthetic Positive RNA Control Dx, Pos])

5

qRT-PCR elvégzési utasítások

- qRT-PCR elvégzése Agilent AriaMx/AriaDx valós idejű PCR rendszeren **46**
- qRT-PCR elvégzése az ABI 7500 Fast valós idejű PCR készüléken **55**
- qRT-PCR elvégzése Bio-Rad CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszeren **62**

Ez a fejezet a qRT-PCR ciklusprogram végrehajtásával kapcsolatos utasításokat tartalmazza a kiválasztott valós idejű PCR készüléken.

qRT-PCR elvégzése Agilent AriaMx/AriaDx valós idejű PCR rendszeren

Ez a rész leírja a qRT-PCR végrehajtási eljárását Agilent AriaMx vagy AriaDx valós idejű PCR rendszeren.

A qRT-PCR program futtatása az AriaMx/AriaDx rendszeren

- 1 Győződjön meg arról, hogy az AriaMx/AriaDx készülék be van-e kapcsolva.
- 2 A készülékhez csatlakoztatott számítógépről nyissa meg azt a kísérletet, amelyet korábban hozott létre az Aria alkalmazásban.
- 3 Lépjen a Thermal Profile (Hőprofil) képernyőre, a Run Status (Futtatás állapota) képernyőre vagy a Raw Data Plots (Nyersadat-diagram) képernyőre.
- 4 Kattintson a **Run** (Futtatás) lehetőségre.
Megnyílik az Instrument Explorer (Készülékkeresés) párbeszédablak.
- 5 Keresse meg azt a készüléket, amelyet a futtatáshoz használni fog, és kattintson a **Send Config** (Konfig. küldése) lehetőségre. (A készülékek keresésével és hozzáadásával kapcsolatos utasításokat lásd az AriaMx vagy az AriaDx beállításában vagy felhasználói útmutatójában.)
 - Ha az Aria program utolsó megnyitása óta most csatlakoztatott először egy készüléket, akkor megnyílik a Login (Bejelentkezés) párbeszédablak. Válassza ki a Username (Felhasználónév) lehetőséget a legördülő listába, írja be a bejelentkezési jelszavát a Password (Jelszó) mezőbe, majd kattintson a **Login** bejelentkezés lehetőségre. Ha más felhasználói fiókkal kíván belépni, kattintson jobb egérgombbal a készülék nevére, majd kattintson a **Log off current user** (Jelenlegi felhasználó kijelentkeztetése) lehetőségre. Ezután bejelentkezhet a kívánt felhasználói fiókkal.
 - Ha még nem mentette el a kísérletet, a rendszer a kísérlet mentésére szólítja fel továbblépés előtt.
- 6 Vigye a reakciólemezt a készülékhez, és töltsze be a hőblokkba.
- 7 A készülék érintőképernyőjén nyissa meg az előkészített kísérletet a Thermal Profile (Hőprofil) képernyőn, és nyomja meg a **Run Experiment** (Kísérlet futtatása) lehetőséget.
A készülék elkezd a kísérlet futtatását.
- 8 Térjen vissza a számítógépes programhoz. A program a Run Status (Futtatás állapota) képernyőre vezet, ahol megfigyelheti a futtatás előrehaladását.
A futtatás megfigyelése nem szükséges. Ha a futtatás befejeződése előtt bezárja az Aria szoftvert, jegyezze fel, hogy hova lesz mentve a futtatás utáni kísérleti fájl.

Adatelemzési beállítások hozzárendelése az AriaMx/AriaDx kísérlethez

1. lépés: Az amplifikációs diagramok megtekintése minden célnál és minden cellában

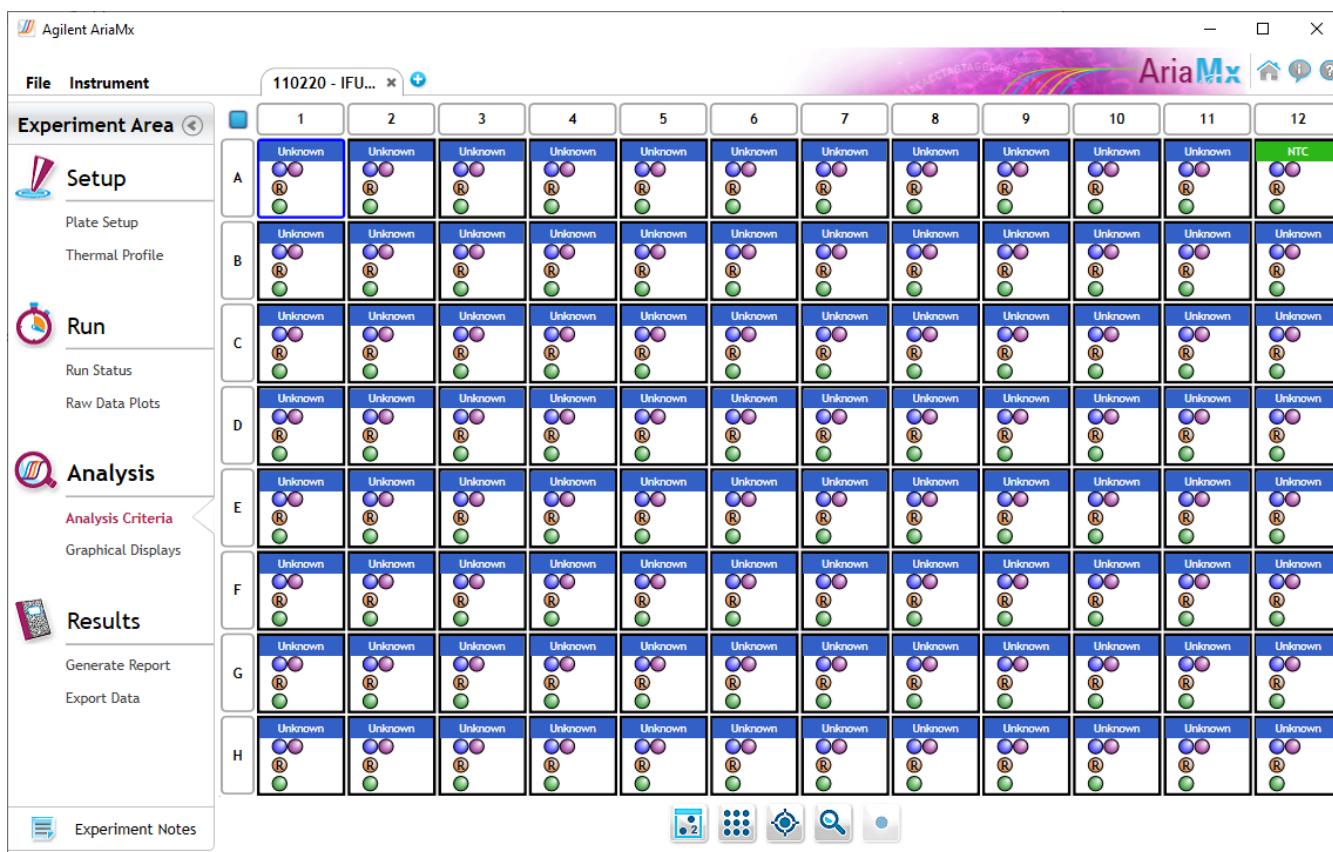
- 1 A futtatás befejeztével nyissa meg a kísérleti fájlt az Aria szoftverben.
- 2 Kattintson az **Analysis Criteria** (Elemzési kritériumok) lehetőségre a képernyő bal oldalán.

Megnyílik az Analysis Criteria (Elemzési kritériumok) képernyő, amely tartalmazza az elemzés beállításait pontosító beállításokat.

- 3 Győződjön meg arról, hogy minden cellát, cellatípust és célt kiválasztott az elemzéshez, amint azt a **19. ábra** mutatja.

MEGJEGYZÉS

Ha a lemez üres cellákat tartalmaz, győződjön meg arról, hogy azokat a Blank (Üres) cellatípushoz rendelte hozzá a Plate Setup (Lemez beállítása) fülön.



19. ábra Aria Analysis Criteria (Elemzési kritériumok) képernyő

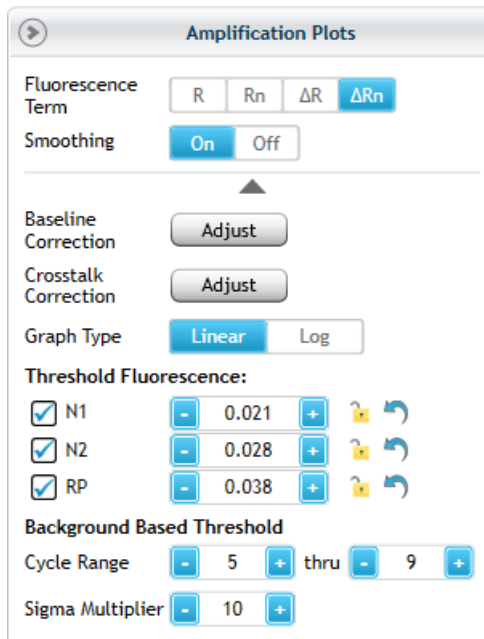
- 4 Kattintson a **Graphical Displays** (Grafikus kijelzők) lehetőségre a képernyő bal oldalán.

Megnyílik a Graphical Displays (Grafikus kijelzők) képernyő, amely megjeleníti az adatokat az eszközökkel az elemzési paraméterek beállításához.

- 5 Győződjön meg arról, hogy a képernyő megjeleníti az Amplification Plots (Amplifikációs diagramok) grafikont, és az alapértelmezett elemzési paraméterek megegyeznek a **20. ábra** által mutatottakkal.

Ha nem látja a **20. ábra** szerinti elemzési paraméterek teljes paneljét, kattintson a lefelé mutató nyílhegyre közvetlenül a **Smoothing** (Simítás) beállítás alatt a panel kinyitásához.

Vegye figyelembe, hogy a kísérletében lévő alapértelmezett Threshold Fluorescence (Küszöbérték fluoreszcencia) értékek valószínűleg eltérnek a **20. ábra** által mutatottaktól. A szoftver a háttér ciklustartomány fluoreszcencia zajsztintje alapján számítja ki az alapértelmezett értékeket. Ebből következően az alapértelmezett értékek eltérőek lesznek a különböző kísérletek esetén.



20. ábra Az Amplification Plots (Amplifikációs diagramok) alapértelmezett beállításai az Aria szoftverben (a Threshold Fluorescence (Küszöbérték fluoreszcencia) értékek eltérőek lesznek a különböző kísérletek esetén)

- 6** A **Background Based Threshold** (Háttér alapú küszöbérték) lehetőség alatt győződjön meg arról, hogy az alapértelmezett ciklustartomány 5–9.
- 7** Ellenőrizze az amplifikációs diagramokat korai amplifikációval (azaz a 9. ciklus előtt). A korai amplifikációs tesztmintákat zárja ki az elemzésből, és végezzen ismételt tesztelést alacsonyabb koncentrációval.

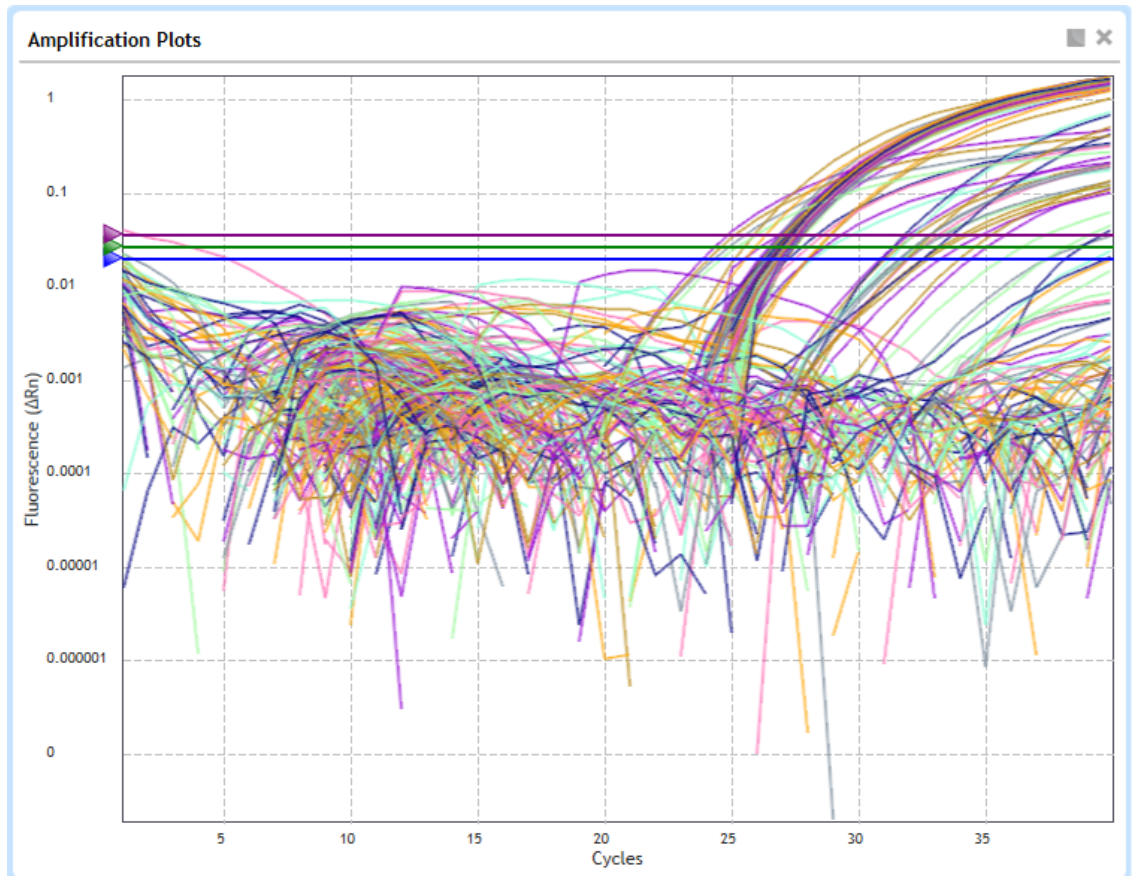
A szokatlanul magas vírus RNS koncentrációjú tesztminták esetén a víruscélok amplifikálása már nagyon korai ciklusszámnál (< 9) kimutatható szintet érhet el. A kiindulási korrekciós számítások részeként a szoftver az ilyen korai amplifikációs jeleket háttérzajként értelmezheti, és ezekben a mintákban sikertelen lehet a Cq érték hozzárendelése a víruscélokhhoz.

Figyelje meg az ilyen tesztminták jelenlétét az Amplification Plots (Amplifikációs diagramok) megtekintésével a kiindulási korrekció nélkül (Fluoreszcencia kifejezés R vagy Rn). Ha bármelyik tesztmintában amplifikáció jelei láthatók a 9. ciklus előtt, távolítsa el azokat a cellákat az elemzésből azáltal, hogy az Analysis Criteria (Elemzési kritériumok) képernyőn megszünteti a kiválasztásukat. Futtassa ismét a qRT-PCR reakciót a mintához úgy, hogy a nukleinsavat 1:100 arányban hígítja a megfelelő elúciós pufferrel.

2. lépés: A küszöbértékek kiértékelése


- 8 A Graph Type (Grafikontípus) beállításnál a **Linear** (Lineáris) helyett válassza a **Log** (Log) lehetőséget. Győződjön meg arról, hogy a Fluorescence Term (Fluoreszcencia kifejezés) ΔRn (Rn) értékre van állítva.

Ha az Amplification Plots (Amplifikációs) diagramokat logaritmus értékekkel tekinti meg, azzal jobb áttekintést kap a háttér jelzajról. A **21. ábra** egy példát mutat. Minden cél küszöbvonalára egy vízszintes vonalként jelenik meg.



21. ábra Aria Amplification Plots (Amplifikációs diagramok) logaritmus skálán – cél küszöbértékek vízszintes vonalakként megjelenítve

- 9 Szemrevételezéssel értékelje az amplifikációs diagramokat és az alapértelmezett küszöbértéket az N1 célra vonatkozóan.







- Kattintson a grafikon alatt lévő célok megjelenítése ikonra. 
- A megnyíló menüben törölje az összes többi cél mezőjét, hogy csak az N1 cél jelenjen meg az Amplification Plots (Amplifikációs diagramok) grafikonon.
- Határozza meg, hogy a küszöbérték elég magas-e ahhoz, hogy a háttérzaj felett legyen, illetve elég alacsony-e ahhoz, hogy diagramokat tartalmazzon az exponenciális amplifikációs fázisban (lásd: **23. ábra**). Ezen meghatározás alapján lépjen tovább a **13. táblázat** utasításai szerint.

- 10 Ismétlje meg a **9. lépés**-t az N2 célra, majd az RP célra vonatkozóan.

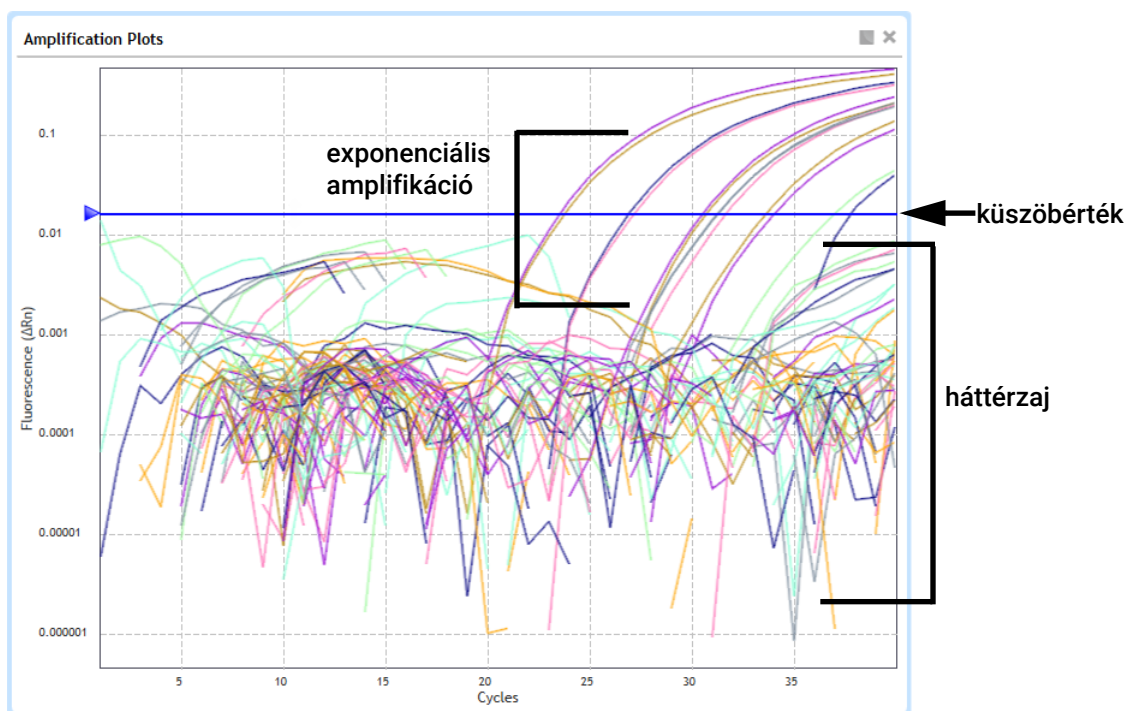
11 A **Threshold Fluorescence** (Küszöbérték fluoreszcencia) lehetőség alatt győződjön meg arról, hogy mindhárom cél be van jelölve, és mindhárom Threshold Fluorescence (Küszöbérték fluoreszcencia) érték le van zárva, a **22. ábra** szerint.

12 Kattintson a grafikon alatt lévő célok megjelenítése ikonra.  Győződjön meg arról, hogy minden cél ki van választva.

Threshold Fluorescence:

<input checked="" type="checkbox"/> N1	0.021		
<input checked="" type="checkbox"/> N2	0.028		
<input checked="" type="checkbox"/> RP	0.038		

22. ábra Célok kiválasztva és Threshold Fluorescence (Küszöbérték fluoreszcencia) értékek lezárva



23. ábra Aria Amplification Plots (Amplifikációs diagramok) az N1 célhoz

13. táblázat Az optimális küszöbérték-beállítás ellenőrzése az Aria szoftverben

Küszöbérték helyzete	Leírás	Megoldás
Optimális pozíció	A háttérzaj felett, és tartalmazza az összes diagramot az exponenciális amplifikáció fázisban	<ul style="list-style-type: none"> Zárja le a Threshold Fluorescence (Küszöbérték fluoreszcencia) értéket a képernyő jobb oldalán azáltal, hogy a lakat ikonra kattint. <p>Az érték lezárásakor a lakat ikon zárt helyzetbe kerül. Az érték lezárása megakadályozza az érték megváltozását, ha bármelyik elemzési kritérium megváltozik.</p>
Túl magas	Bizonyos diagramok nem érik el a küszöbértéket az exponenciális amplifikáció fázisban	<ul style="list-style-type: none"> Keresse meg a rendkívül magas háttérzaj értékű cellákat. Az ilyen kiugró értékű cellák miatt a szoftver túl magasra állíthatja be a küszöbértéket. Lépjen vissza az Analysis Criteria (Elemzési kritériumok) képernyőre, hogy azt a cellát kizárja az elemzésből. A kiugró értékű cella kizárása után a szoftver újraszámítja a küszöbértéket. Másik lehetőségként az eger segítségével manuálisan is áthúzhatja a küszöbvonalat a grafikonon egy új pozícióba. Ellenőrizze, hogy az új küszöbérték optimális pozícióban van-e, és zárja le a Threshold Fluorescence (Küszöbérték fluoreszcencia) értéket a fent leírtak szerint. Az új érték lezárása után ismét lépjen vissza az Analysis Criteria (Elemzési kritériumok) képernyőre, hogy a kiugró értékű cellát ismét bevegye az elemzésbe.* <p>* Ha a kiugró értékű cella amplifikációs diagramja nem mutat exponenciális amplifikációt egyik ciklusszámnál sem, akkor győződjön meg arról, hogy az alacsonyabbra állított küszöbérték miatt a szoftver nem rendel-e hozzá Cq értéket a cellához (amiatt, hogy a háttér jelzaj keresztezi a küszöbértéket). Ha igen, akkor próbálja módosítani az adott cella egyéb elemzési beállításait, pl. a Baseline Correction (Kiindulási korrekció) beállítását.</p>
Túl alacsony	Bizonyos diagramok nincsenek a háttérzaj értéke felett.	<ul style="list-style-type: none"> Emelje a küszöbértéket éppen a háttérzaj szintje fölé.

3. lépés: Az eredmények ellenőrzése az NTC cellában

13 A Results Table (Eredmények táblázatban) keresse meg a negatív kontroll minta (No Template Control, NTC) reakciót, amely az A12 cellában található.

14 Győződjön meg arról, hogy a Cq oszlopban mindhárom cél esetén „No Cq” (Nincs Cq) vagy > 37,00 Cq érték szerepel.

Ha az NTC reakció esetén a Cq érték $\leq 37,00$ bármelyik célra vonatkozóan, akkor a minta szennyezett lehet. Érvénytelenítse a futtatást, és ismétlje meg a vizsgálatot az irányelvek szigorú betartásával.

Adatexportálás az Aria szoftverből

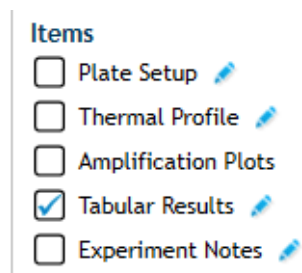
1. lépés: Az exportálási beállítások megadása és mentése

Ha már mentette az exportálási beállításokat, lépjen közvetlenül ide: **„2. lépés: Adatok exportálása”,** 54. oldal.

- 1 A képernyő bal oldalán, a **Results** (Eredmények) rész alatt kattintson az **Export Data** (Adatok exportálása) lehetőségre.

Megnyílik az Export Data (Adatok exportálása) képernyő.

- 2 Az Export Configuration (Exportálási konfiguráció) panelen válasszon ki egy fájlípust az exportált adatoknak, pl. **Excel**.
- 3 Győződjön meg arról, hogy az **Items** (Elemek) lehetőség alatt a Tabular Results (Táblázatos eredmények) mező be van jelölve. Törölje az egyéb elemek jelölőnégyzeteinek bejelölését. Lásd: **24. ábra**.

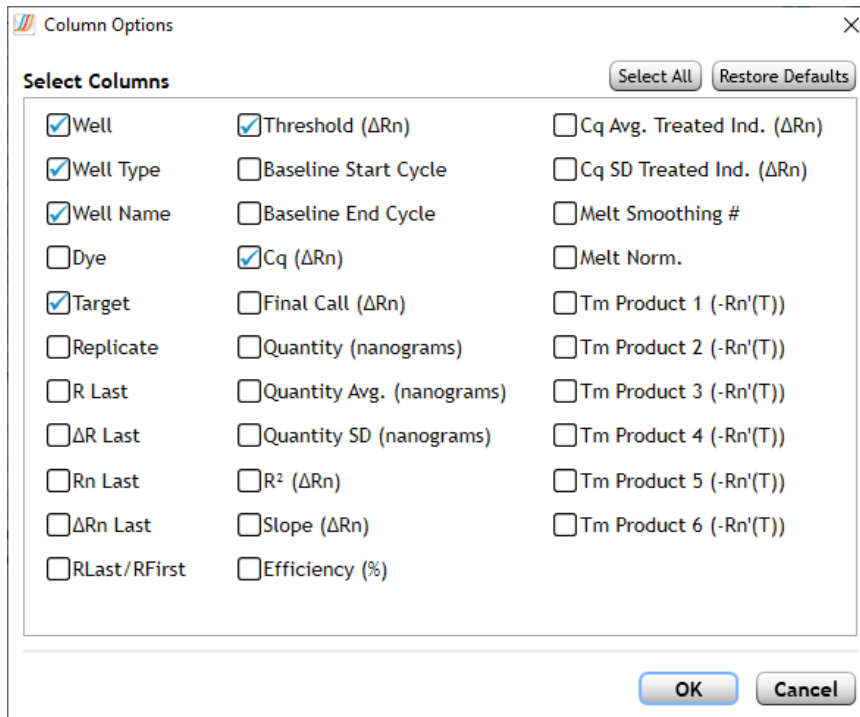


24. ábra Aria szoftver Export Data (Adatok exportálása) képernyő – exportálandó elemek

- 4 Kattintson a **Tabular Results** (Táblázatos eredmények) lehetőség melletti ceruza ikonra, hogy személyre szabja az alkalmazandó oszlopokat.

Megnyílik a Column Options (Oszloplehetőségek) párbeszédablak.

- 5 Módosítsa a beállításokat úgy, hogy a befoglalásra kijelölt oszlopok az itt láthatók szerintiek legyenek: **25. ábra**.



Bejelölt oszlopok:

Well (Cella)

Well Type
(Cellatípus)

Well Name
(Cella neve)

Target (Cél)

Threshold
(Küszöbérték)

Cq

25. ábra Aria Column Options (Oszloplehetőségek) párbeszédablak

6 A módosítások mentéséhez kattintson az **OK** gombra, és zárja be a párbeszédablakot.

7 Mentse az exportálási beállításokat új meghatározásként.

a Az Export Configuration (Exportálási konfiguráció) panelen nyissa le a Definition (Meghatározás) legördülő listát.

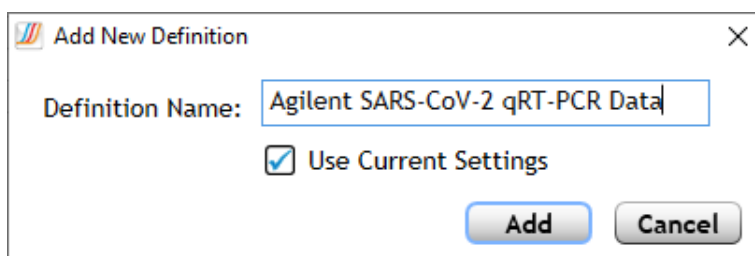
b Kattintson az **Add New** (Új hozzáadása) lehetőségre.

Megnyílik az Add New Definition (Új meghatározás hozzáadása) párbeszédablak.

c A Definition Name (Meghatározás neve) mezőbe írja be a következőt: **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**. Lásd: 26. ábra.

d Győződjön meg arról, hogy a Use Current Settings (Aktuális beállítások alkalmazása) jelölőnégyzet be legyen jelölve.

e Kattintson az **Add** (Hozzáadás) lehetőségre.



26. ábra Aria Add New Definition (Új meghatározás hozzáadása) párbeszédablak

2. lépés: Adatok exportálása

8 Az Export Configuration (Exportálási konfiguráció) panelen győződjön meg arról, hogy a Definition legördülő lista a következőre van beállítva: **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**.

9 Kattintson az **Export Data** (Adatok exportálása) lehetőségre.

A jelentés az alapértelmezett alkalmazásban nyílik meg a kiválasztott fájlípushoz.

10 Tekintse át a Cq adatokat minden tesztmintára és kontrollra vonatkozóan az eredmények értelmezéséhez. Lásd: [6. fejezet](#), „Elemzés és eredmények”.

qRT-PCR elvégzése az ABI 7500 Fast valós idejű PCR készüléken

Ez a rész leírja a qRT-PCR végrehajtási eljárását Applied Biosystems 7500 Fast valós idejű PCR készüléken.

A qRT-PCR program futtatása az ABI 7500 Fast valós idejű PCR készüléken

- 1 Győződjön meg arról, hogy az ABI 7500 Fast készülék be legyen kapcsolva.
- 2 A készülékhez csatlakoztatott számítógépről nyissa meg azt a kísérletet, amelyet korábban létrehozott a 7500 szoftverben.
- 3 A készüléken nyomja be a tálcaajtót a fedél kinyitásához. Töltse be a reakciólemezt a készülék hőblokkjába.
- 4 Nyomja be a tálcaajtót a fedél zárásához.
- 5 A számítógépen kattintson a **START RUN** (FUTTATÁS INDÍTÁSA) lehetőségre.
A készülék elkezd a kísérlet futtatását.

Adatelemzési beállítások hozzárendelése az ABI 7500 Fast kísérlethez

1. lépés: Az amplifikációs diagramok megtekintése minden célnál és minden cellában

- 1 A futtatás befejeztével nyissa meg a kísérletet a Design & Analysis szoftveralkalmazásban.
- 2 A képernyő tetején kattintson a Quality Check (Minőség-ellenőrzés) fülre, ha még nem választotta ki. Győződjön meg arról, hogy a legördülő listában az **Amplification Plot** (Amplifikációs diagram) ki legyen választva.

A képernyő megjeleníti az amplifikációs diagramokat, az eredmények táblázatát minden cellában, valamint a lemeztérkép diagramját.

MEGJEGYZÉS

Ha a lemez üres cellákat tartalmaz, hagyja ki az érintett cellák minden célját az elemzésből, és végezzen ismételt elemzést.

- 3 Kattintson az **Actions > Primary Analysis Setting** (Műveletek > Elsődleges elemzési beállítás) lehetőségre.

Megnyílik a Primary Analysis Settings (Elsődleges elemzési beállítások) párbeszédablak. A párbeszédablak alapértelmezett beállításai itt láthatók: **27. ábra**.

- 4 Győződjön meg arról, hogy a beállítás megegyezik a **27. ábra** által mutatottakkal. Szükség esetén kattintson a **Reset to Default** (Visszaállítás az alapértelmezettre) lehetőségre.

Primary Analysis Setting ✕

General Well Cq QC Alerts

PCR Stage/Step: Stage 3, Step 2 Algorithm Settings: Baseline Threshold

Target	Use Default	Auto Threshold	Threshold	Auto Baseline	Baseline Start	Baseline End
Default Setting		<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	AUTO
N1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	AUTO
N2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	AUTO
RP	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	<input checked="" type="checkbox"/>	AUTO	AUTO

[Reset to Default](#)

27. ábra Alapértelmezett beállítások a Design & Analysis Primary Analysis Setting (Elsődleges elemzési beállítások) párbeszédablakban

5 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

Bezárul a Primary Analysis Setting (Elsődleges elemzési beállítás) párbeszédablak.

6 Győződjön meg arról, hogy az Analyze (Elemzés) gomb sarkában zöld pipa legyen. Ha nincs, kattintson az **Analyze** (Elemzés) lehetőségre.

7 Ellenőrizze az amplifikációs diagramokat korai amplifikációval (azaz a 9. ciklus előtt). A korai amplifikációs tesztmintákat hagyja ki az elemzésből, és végezzen ismételt tesztelést alacsonyabb koncentrációval.

A szokatlanul magas vírus RNS koncentrációjú tesztminták esetén a víruscélok amplifikálása már nagyon korai ciklusszámnál (< 9) kimutatható szintet érhet el. A kiindulási korrekciós számítások részeként a szoftver az ilyen korai amplifikációs jeleket háttérzajként értelmezheti, és ezekben a mintákban sikertelen lehet a Cq érték hozzárendelése a víruscélokhhoz.

Figyelje meg az ilyen tesztminták jelenlétét az Amplification Plot (Amplifikációs diagram) megtekintésével a kiindulási korrekció nélkül (az **Y Value** (Y érték) állítsa a következőre: **Rn**). Ha bármelyik tesztmintában amplifikáció jelei láthatók a 9. ciklus előtt, hagyja ki azokat a cellákat az elemzésből azáltal, hogy a Quality Check (Minőség-ellenőrzés) képernyőn megszünteti a kiválasztásukat. Futtassa ismét a qRT-PCR reakciót a mintához úgy, hogy a nukleinsavat 1:100 arányban hígítja a megfelelő elúciós pufferrel.

2. lépés: A küszöbértékek kiértékelése

8 Kattintson az Amplification Plot (Amplifikációs diagram) grafikon felett lévő beállítások ikonra.

Megnyílik a Settings (Beállítások) párbeszédablak a General (Általános) fülön.

9 Győződjön meg arról, hogy a Y Value (Y érték) ΔRn értékre legyen állítva.

10 A Y Scale (Y skála) legördülő listában a választást állítsa **Linear** (Lineáris) értékről **Log** (Log) értékre, amint az a **28. ábra** mutatja.

Ha az Amplification Plots (Amplifikációs) diagramokat logaritmus értékekkel tekinti meg, azzal jobb áttekintést kap a háttér jelzairól. A **29. ábra** egy példát mutat. Minden cél küszöbvonal egy vízszintes vonalként jelenik meg.

General X Axis Y Axis

Plot Title Amplification Plot

Color By Target

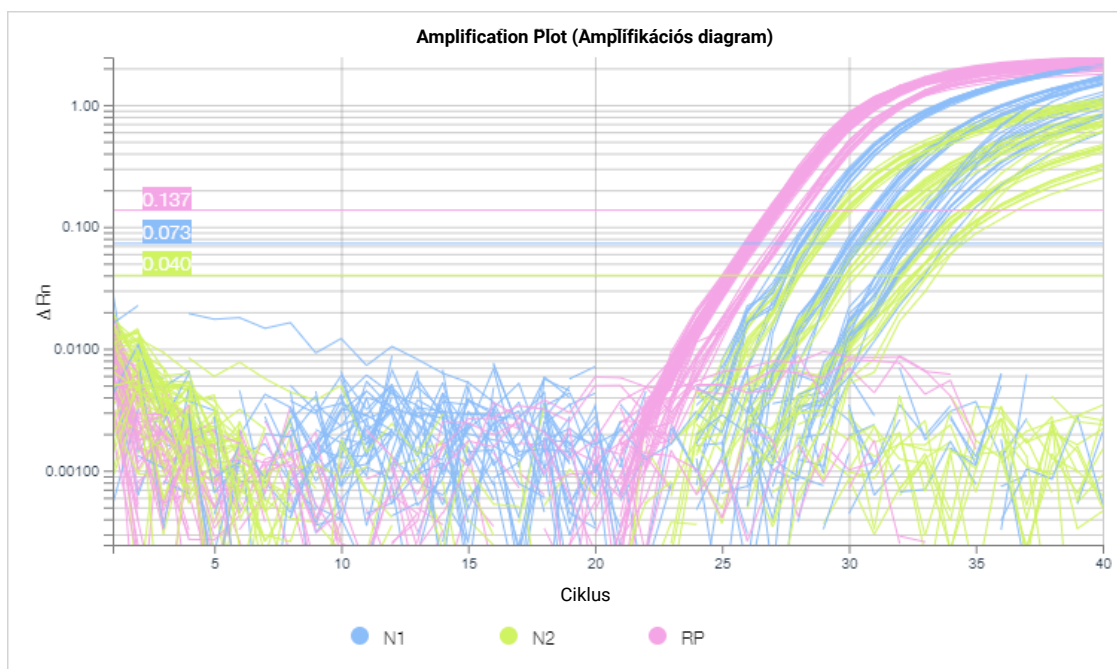
Y Value ΔRn Rn

Y Scale Log

Show Legend Cq Mark
 Unselected Tooltip
 Replicates of selected
 Threshold Baseline

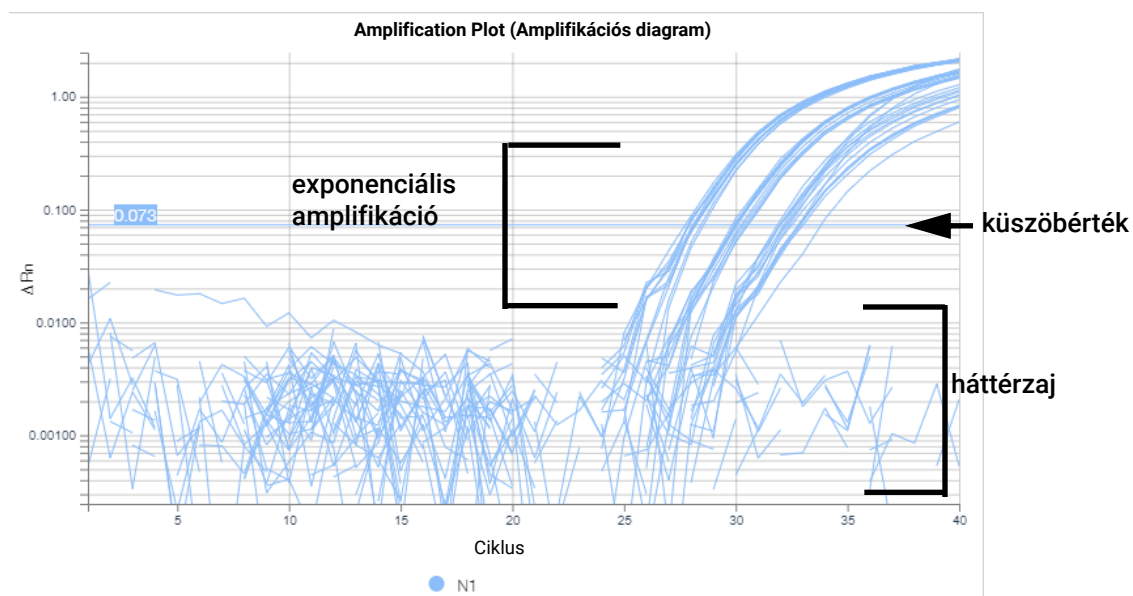
[Reset Setting](#)

28. ábra Az Amplification Plot (Amplifikációs diagram) Design & Analysis General Settings (Általános beállítások) része



29. ábra Design & Analysis Amplification Plots (Amplifikációs diagramok) logaritmus skálán – a cél küszöbértékek vízszintes vonalakként megjelenítve

- 11** Szemrevételezéssel értékelje az amplifikációs diagramokat és az alapértelmezett küszöbértéket az N1 célra vonatkozóan.
- A képernyő bal oldalán nyissa le a Targets (Célok) legördülő listát.
 - Csak az N1 cél lehetőséget válassza ki, majd zárja be a legördülő listát.
 - Határozza meg, hogy a küszöbérték elég magas-e ahhoz, hogy a háttérzaj felett legyen, illetve elég alacsony-e ahhoz, hogy diagramokat tartalmazzon az exponenciális amplifikációs fázisban (lásd: **30. ábra**). Ezen meghatározás alapján lépjen tovább a **14. táblázat** utasításai szerint.
- 12** Ismétlje meg a **11. lépés**-t az N2 célra, majd az RP célra vonatkozóan.
- 13** A képernyő bal oldalán, a **Targets (Célok)** lehetőség alatt kattintson a **Clear all (Összes törlése)** lehetőségre, hogy a célok alapján eltávolítsa a szűrőt.



30. ábra Design & Analysis Amplification Plots (Amplifikációs diagramok) az N1 célhoz

14. táblázat Az optimális küszöbérték-beállítás ellenőrzése a Design & Analysis szoftverben

Küszöbérték helyzete	Leírás	Megoldás
Optimális pozíció	A háttérzaj felett, és tartalmazza az összes diagramot az exponenciális amplifikáció fázisban	<ul style="list-style-type: none"> Hagyja a küszöbértékeket a jelenlegi értékükön.
Túl magas	Bizonyos diagramok nem érik el a küszöbértéket az exponenciális amplifikáció fázisban	<ul style="list-style-type: none"> Keresse meg a rendkívül magas háttérzaj értékű cellákat. Az ilyen kiugró értékű cellák miatt a szoftver túl magasra állíthatja be a küszöbértéket. Válassza ki a kiugró értékű cellát a lemeztérképen. A közvetlenül a lemeztérkép feletti eszköztárban kattintson a három pontot mutató gombra. A megnyíló menüben kattintson az Omit Wells (Cellák kihagyása) lehetőségre. Kattintson az Analyze (Elemzés) lehetőségre. A kiugró értékű cella kizárása után a szoftver újraszámítja a küszöbértéket. Másik lehetőségként az egér segítségével manuálisan is áthúzhatja a küszöbvonalat a grafikonon egy új pozícióba. Válassza ki az összes cellát a lemeztérképen az összes amplifikációs diagram megtekintéséhez. Ellenőrizze, hogy az új küszöbérték optimális pozícióban van-e. Kattintson újra a három pontot mutató gombra. A megnyíló menüben kattintson az Unomit Wells (Cellák kihagyásának visszavonása) lehetőségre, hogy a kiugró értékű cellákat ismét belevegye az elemzésbe.* <p>* Ha a kiugró értékű cella amplifikációs diagramja nem mutat exponenciális amplifikációt egyik ciklusszámnál sem, akkor győződjön meg arról, hogy az alacsonyabbra állított küszöbérték miatt a szoftver nem rendel-e hozzá Cq értéket a cellához (amiatt, hogy a háttér jelzaj keresztezi a küszöbértéket). Ha igen, akkor próbálja módosítani az adott cella egyéb elemzési beállításait, pl. a Baseline Start (Kiindulás indítás) és/vagy a Baseline End (Kiindulás vége) ciklusszámok beállításával.</p>
Túl alacsony	Bizonyos diagramok nincsenek a háttérzaj értéke felett.	<ul style="list-style-type: none"> Emelje a küszöbértéket éppen a háttérzaj szintje fölé.

3. lépés: Az eredmények ellenőrzése az NTC cellában

14 A Well Table (Cella táblázatban) keresse meg a negatív kontroll minta (No Template Control, NTC) reakciót, amely az A12 cellában található.

15 Győződjön meg arról, hogy a Cq oszlopban mindhárom cél esetén „Undetermined” (Meghatározatlan) vagy > 37,00 Cq érték szerepeljen.

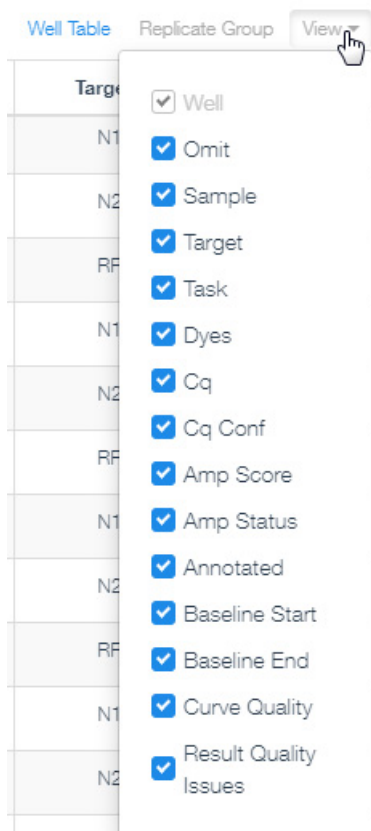
Ha az NTC reakció esetén a Cq érték $\leq 37,00$ bármelyik célra vonatkozóan, akkor a minta szennyezett lehet. Érvénytelenítse a futtatást, és ismétlje meg a vizsgálatot az irányelvek szigorú betartásával.

A Well (Cella) táblázat adatainak exportálása a Design & Analysis szoftverből CSV fájlba

1. lépés: A Well (Cella) táblázatban lévő oszlopok testreszabása

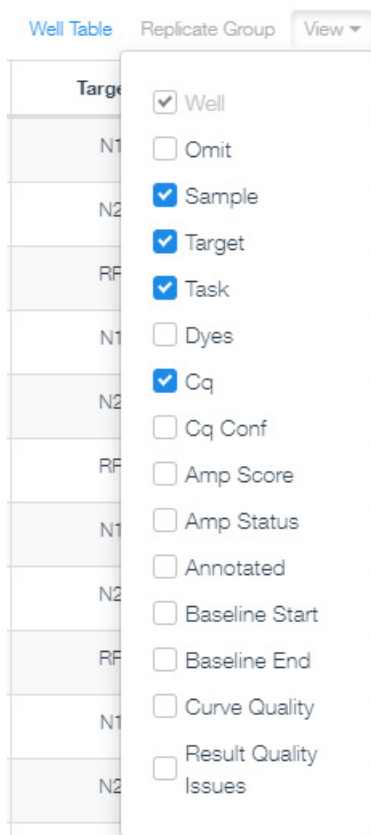
- 1 A közvetlenül a Well (Cella) táblázat feletti eszköztárban kattintson a **View** (Megtekintés) lehetőségre.

Ekkor megnyílik egy menü (lásd: **31. ábra**), amely felsorolja az összes rendelkezésre álló táblázat oszlopot.



31. ábra A Design & Analysis Well (Cella) táblázat menüjének megtekintése – alapértelmezett oszlopválasztás

- 2 Állítsa be a beállításokat úgy, hogy csak a Well (Cella), Sample (Minta), Target (Cél), Task (Feladat) és Cq oszlopok legyenek bejelölve. Lásd: **32. ábra**.



Bejelölt oszlopok:

Sample (Minta)

Target (Cél)

Task (Feladat)

Cq

32. ábra A Design & Analysis Well (Cella) táblázat menüjének megtekintése – egyedi oszlopválasztás

3 Kattintson a **View** (Megtekintés) lehetőségre a menü bezárásához.

2. lépés: Adatok exportálása

4 A közvetlenül a Well (Cella) táblázat feletti eszköztárban kattintson a három pontot mutató eszköztárgombra. ●●●

5 A megnyíló menüben kattintson az **Export** (Exportálás) lehetőségre.

Megnyílik egy párbeszédablak a CSV fájl mentéséhez.

6 Válasszon ki egy mappát a fájlnak.

7 Írja be a fájl nevét a File name (Fájlnév) mezőbe.

8 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

A párbeszédablak bezáródik, és a program exportálja az adatokat a CSV fájl típusba, illetve menti a kijelölt mappába.

9 Nyissa meg a fájlt, és tekintse át a Cq adatokat minden tesztmintára és kontrollra vonatkozóan az eredmények értelmezéséhez. Lásd: [6. fejezet](#), „Elemzés és eredmények”.

qRT-PCR elvégzése Bio-Rad CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszeren

Ez a rész leírja a qRT-PCR végrehajtási eljárását Bio-Rad CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszeren.

A qRT-PCR program futtatása a CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszeren

- 1 Győződjön meg arról, hogy a CFX96 Touch készülék be legyen kapcsolva.
- 2 A készülékhez csatlakoztatott számítógépről nyissa meg azt a kísérletet, amelyet korábban hozott létre a CFX Maestro szoftveralkalmazásban.
- 3 Lépjen a Run Setup (Futtatás beállítása) képernyő Start Run (Futtatás indítása) fülére.
Ha a készülék be van kapcsolva, de nem jelenik meg a **Block Name** (Blokk neve) rész alatt, akkor kattintson a **Detect Instrument(s)** (Készülék(ek) észlelése) lehetőségre a képernyő bal felső sarkában.
- 4 A táblázatban válassza ki a kísérlet futtatásához használandó készüléket.
- 5 Kattintson az **Open Lid** (Fedél kinyitása) lehetőségre.
A készülék fedele kinyílik.
- 6 Töltse be a reakciólemezt a készülék hőblokkjába.
- 7 A számítógépen kattintson a **Close lid** (Fedél zárása) lehetőségre.
A készülék fedele bezáródik.
- 8 Kattintson a **Start Run** (Futtatás indítása) lehetőségre.
- 9 Mentse a futtatási fájlt a kívánt mappába. Írjon be egy fájlnevet, majd kattintson a **Save** (Mentés) lehetőségre.
A készülék elkezdi a kísérlet futtatását.

Adatelemzési beállítások hozzárendelése a CFX96 Touch valós idejű PCR kimutatási rendszerhez

1. lépés: Az amplifikációs diagramok megtekintése minden célnál és minden cellában
- 1 A futtatás befejeztével nyissa meg a kísérletet a CFX Maestro szoftveralkalmazásban.
A kísérlet megnyílik a Data Analysis (Adatelemzés) ablakban.
- 2 Az ablak tetején kattintson a Quantification (Kvantifikálás) fülre, ha még nem választotta ki.
Az ablak megjeleníti az amplifikációs diagramokat, az eredmények táblázatát minden cellánál, valamint a lemeztérkép diagramját.

- 3 Alkalmazza a Fluorescence Drift Correction (Fluoreszcencia eltolás korrekció) funkciót.
 - A Data Analysis (Adatelemzés) ablakban kattintson a következőkre: **Settings > Baseline Settings > Apply Fluorescence Drift Correction** (Beállítások > Kiindulási beállítások > Fluoreszcencia eltolás korrekció alkalmazása).

A szoftver automatikusan javítja a fluoreszcencia jel eltolódását, amely jelen lehet a kiindulási ciklustartományban.

- 4 Ellenőrizze az amplifikációs diagramokat korai amplifikációval (azaz a 9. ciklus előtt). A korai amplifikációs tesztmintákat zárja ki az elemzésből, és végezzen ismételt tesztelést alacsonyabb koncentrációval.

A szokatlanul magas vírus RNS koncentrációjú tesztminták esetén a víruscélok amplifikálása már nagyon korai ciklusszámnál (< 9) kimutatható szintet érhet el. A kiindulási korrekciós számítások részeként a szoftver az ilyen korai amplifikációs jeleket háttérzajként értelmezheti, és ezekben a mintákban sikertelen lehet a Cq érték hozzárendelése a víruscélokhoz.

Figyelje meg az ilyen tesztminták jelenlétét az amplifikációs diagram megtekintésével a kiindulási korrekció nélkül (a **Baseline Setting** (Kiindulási beállítás) értéket állítsa a következőre: **No Baseline Subtraction** (Nincs kiindulási kivonás)). Ha bármelyik tesztmintában amplifikáció jelei láthatók a 9. ciklus előtt, távolítsa el azokat a cellákat az elemzésből a Plate Editor (Lemezszerkesztés) ablakból. Futtassa ismét a qRT-PCR reakciót a mintához úgy, hogy a nukleinsavat 1:100 arányban hígítja a megfelelő elúciós pufferrel.


2. lépés: A küszöbértékek kiértékelése

- 5 Ellenőrizze a választást a **Settings > Baseline Setting** (Beállítások > Kiindulási beállítás) részben annak biztosítása érdekében, hogy **Baseline Subtracted Curve Fit** (Kiindulási kivont görbe illesztés) értékre legyen állítva.
- 6 Kattintson jobb egérgombbal az Amplification (Amplifikáció) grafikonra, és válassza ki a **Show Threshold Values** (Küszöbértékek mutatása) lehetőséget (ha nincs még bejelölve).

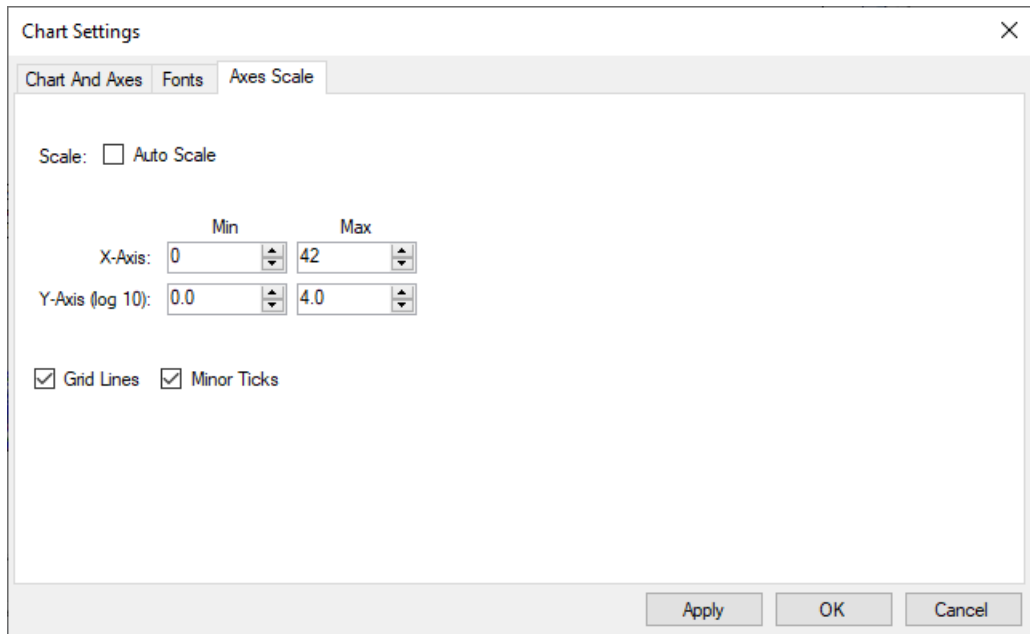
Minden cél küszöbvonal a vízszintes vonalként jelenik meg.

- 7 Az Amplification (Amplifikáció) grafikon jobb alsó sarka mellett jelölje be a Log jelölőnégyzetet.

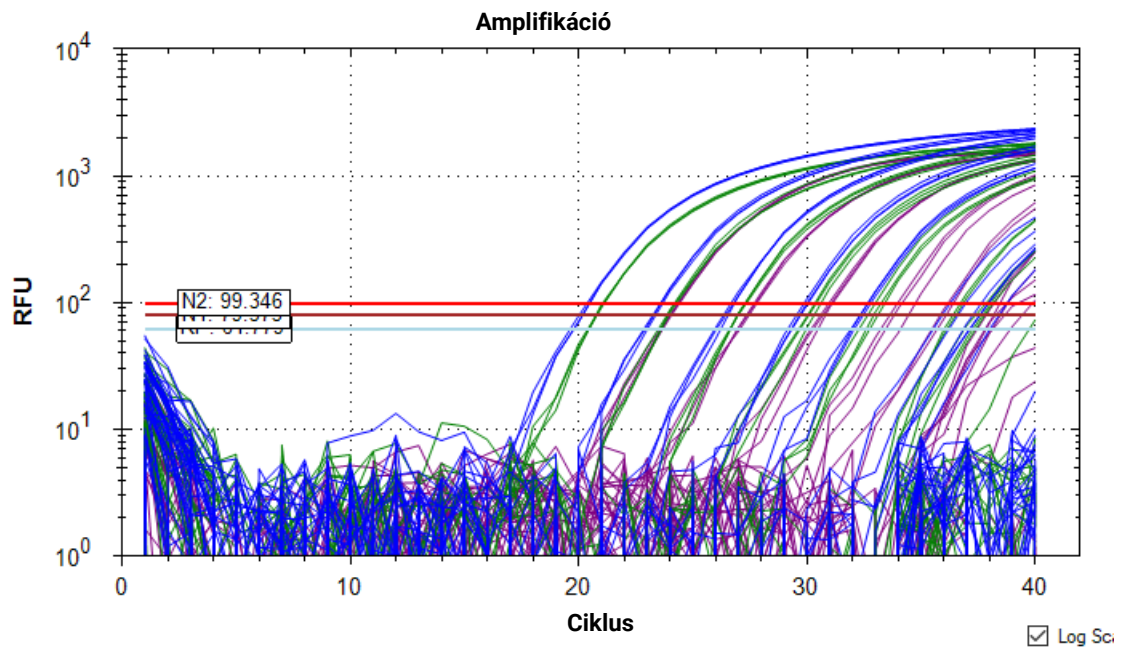
Ha az Amplification Plots (Amplifikációs) diagramokat logaritmus értékekkel tekinti meg, azzal jobb áttekintést kap a háttér jelzajról.

- 8 Az Y tengely minimális értékét állítsa 0,0-ra.
 - a Az Amplification (Amplifikáció) grafikon jobb oldalán kattintson a Chart Settings (Diagrambeállítások) ikonra. 
 - Megnyílik a Chart Settings (Diagrambeállítások) párbeszédablak.
 - b Kattintson az Axes Scale (Tengelyskála) fülre.
 - c Törölje az Auto Scale (Automatikus skála) jelölőnégyzetet.
 - d A **Y-Axis (log 10)** (Y tengely (log 10)) **Min** (Min) oszlopába írjon **0.0** (0,0) értéket, amint az a **33. ábra** mutatja.
 - e Kattintson az **OK** gombra.

A párbeszédablak bezárul, és az Y tengely skála 0,0-nál indul, ami lehetővé teszi a jelzaj megjelenítését a diagramokon. A **34. ábra** egy példát mutat.



33. ábra Maestro Chart Settings (Diagrambeállítások) párbeszédpanel – Axes Scale (Tengelyskála) fül



34. ábra Maestro Amplification (Amplifikációs) grafikon logaritmus skálán – a cél küszöbértékek vízszintes vonalakként megjelenítve

15. táblázat Az optimális küszöbérték-beállítás ellenőrzése a Design & Analysis szoftverben

Küszöbérték helyzete	Leírás	Megoldás
Optimális pozíció	A háttérzaj felett, és tartalmazza az összes diagramot az exponenciális amplifikáció fázisban	<ul style="list-style-type: none"> Hagyja a küszöbértékeket a jelenlegi értékükön.
Túl magas	Bizonyos diagramok nem érik el a küszöbértéket az exponenciális amplifikáció fázisban	<ul style="list-style-type: none"> Keresse meg a rendkívül magas háttérzaj értékű cellákat. Az ilyen kiugró értékű cellák miatt a szoftver túl magasra állíthatja be a küszöbértéket. A Plate Editor (Lemezszerkesztő) megnyitásához kattintson a Plate Setup > View/Edit Plate (Lemez beállítása > Lemez megtekintése/szerkesztése) lehetőségre. Válassza ki a kiugró értékű cellát a lemeztérképen. A Plate Editor (Lemezszerkesztő) jobb oldali paneljén jelölje be az Exclude Wells in Analysis (Cella kihagyása az elemzésből) címkéjű jelölőnégyzetet (a panel alján található). Kattintson az OK gombra. Ha a rendszer megkérdezi, hogy kívánja-e alkalmazni a módosításokat, kattintson a Yes (Igen) lehetőségre. A kiugró értékű cella kizárása után a szoftver újraszámítja a küszöbértéket. Másik lehetőségként az egér segítségével manuálisan is áthúzhatja a küszöbvonalat a grafikonon egy új pozícióba. Az Amplification (Amplifikációs) grafikon jobb oldalán kattintson a kiindulási küszöbérték ikonra a Baseline Threshold (Kiindulási küszöbérték) párbeszédablak megnyitásához. A Single Threshold (Egyetlen küszöbérték) alatt módosítsa a kiválasztást erről: Auto Calculated (Automatikusan kalkulált), erre: User Defined (Felhasználó által meghatározott). (Ez megakadályozza, hogy a szoftver újraszámolja a küszöbértéket, miután a kiugró értékű cellát ismét belevette az elemzésbe.) A párbeszédablak bezárásához kattintson az OK lehetőségre. A Plate Editor (Lemezszerkesztő) ismételt megnyitásához kattintson a Plate Setup > View/Edit Plate (Lemez beállítása > Lemez megtekintése/szerkesztése) lehetőségre. Válassza ki a kiugró értékű cellát, és törölje az Exclude Wells in Analysis (Cellák kizárása az elemzésből) jelölőnégyzetet. Kattintson az OK, majd a Yes (Igen) lehetőségre. Az Amplification (Amplifikációs) grafikon alatti lemeztérképen válassza ki az összes cellát, hogy a kiugró értékű cellát ismét belevegye az elemzésbe.* <p>* Ha a kiugró értékű cella amplifikációs diagramja nem mutat exponenciális amplifikációt egyik ciklusszámnál sem, akkor győződjön meg arról, hogy az alacsonyabbra állított küszöbérték miatt a szoftver nem rendel-e hozzá Cq értéket a cellához (amiatt, hogy a háttér jelzaj keresztezi a küszöbértéket). Ha igen, akkor próbálja módosítani az adott cella egyéb elemzési beállításait, pl. a Baseline Begin (Kiindulás indítás) és/vagy a Baseline End (Kiindulás vége) ciklusszámok beállításával.</p>
Túl alacsony	Bizonyos diagramok nincsenek a háttérzaj értéke felett.	<ul style="list-style-type: none"> Emelje a küszöbértéket éppen a háttérzaj szintje fölé.

3. lépés: Az eredmények ellenőrzése az NTC cellában

- 11 Az eredményeket megjelenítő táblázatban keresse meg a negatív kontroll minta (No Template Control, NTC) reakciót, amely az A12 cellában található.
- 12 Győződjön meg arról, hogy a Cq oszlopban mindhárom cél esetén „N/A” vagy $> 37,00$ Cq érték szerepeljen.

Ha az NTC reakció esetén a Cq érték $\leq 37,00$ bármelyik célra vonatkozóan, akkor a minta szennyezett lehet. Érvénytelenítse a futtatást, és ismételje meg a vizsgálatot az irányelvek szigorú betartásával.

Adatexportálás a CFX Maestro szoftverből

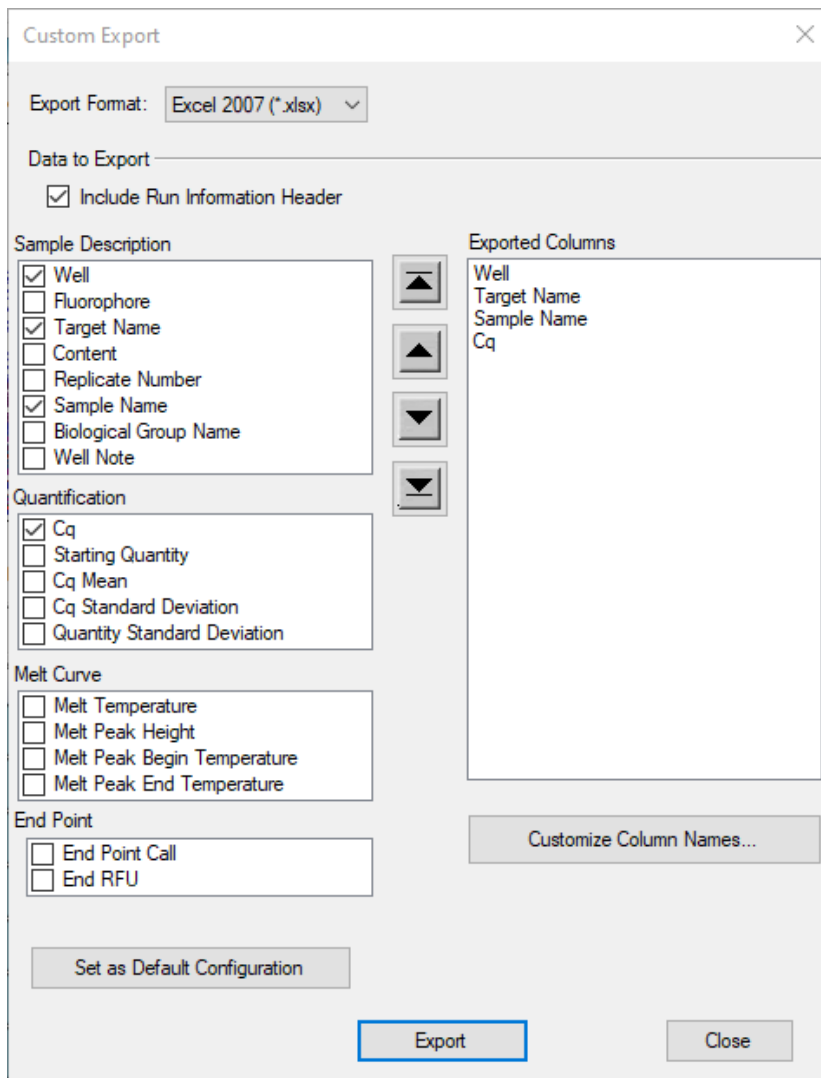
- 1 A Data Analysis (Adatelemzés) ablak tetején kattintson az **Export > Custom Export** (Exportálás > Egyedi exportálás) lehetőségre.

Megnyílik a Custom Export (Egyedi exportálás) párbeszédablak.

- 2 Az Export Format (Exportálási formátum) mezőben válasszon ki egy fájltypust az exportált adatoknak, pl. **Excel 2007 (*.xlsx)**.

Győződjön meg arról, hogy számítógépe rendelkezik a szükséges szoftverrel a kiválasztott fájltypus megnyitásához.

- 3 A párbeszédablakban jelölje be a **36. ábra** által mutatott jelölőnégyzeteket. Tekintse át az Exported Columns (Exportált oszlopok) részt, és győződjön meg arról, hogy felsorolja a következőket: **Well** (Cella), **Target Name** (Cél neve), **Sample Name** (Minta neve) és **Cq**.



36. ábra Egyedi adatexportálási beállítások a CFX Maestro alkalmazáshoz

4 Kattintson az **Export** (Exportálás) lehetőségre.

Megnyílik a Save As (Mentés másként) párbeszédablak.

5 Válasszon ki egy mappát a fájlnek.

6 Írja be a fájl nevét a File name (Fájlnév) mezőbe, vagy használja az alapértelmezettet.

7 Kattintson a **Save** (Mentés) gombra.

A párbeszédablak bezáródik, és a program exportálja az adatokat a kiválasztott fájlípusba, illetve menti a kijelölt mappába.

8 Nyissa meg a fájlt, és tekintse át a Cq adatokat minden tesztmintára és kontrollra vonatkozóan az eredmények értelmezéséhez. Lásd: [6. fejezet](#), „Elemzés és eredmények”.

6 Elemzés és eredmények

Az eredmények értelmezése **70**

A fejezet a vizsgálati eredmények értelmezésével kapcsolatos információkat tartalmazza a qRT-PCR adatok alapján.

Az eredmények értelmezése

Eredmények és értelmezés kontrollminták esetén

Ha a kontrollok bármelyike nem a **16. táblázat** alapján várt teljesítményt mutatja, akkor lehetséges, hogy a vizsgálatot nem megfelelően állították be, vagy a reagens, illetve a berendezés hibás működése lépett fel. Ilyen esetben érvénytelenítse a futtatást, és ismétlje meg a vizsgálatot.

Negatív kontroll minta (NTC)

Az NTC nukleázmentes vizet használ a qRT-PCR reakcióban az RNS helyett. A NTC reakciónak a három cél egyike esetén sem szabad olyan fluoreszcencia növekedési görbét mutatni, amely keresztezi a küszöbvonalat 37,00 cikluson belül. Ha a NTC reakció olyan növekedési görbét mutat, ahol $Cq \leq 37,00$, akkor a minta beszennyeződhetett. Érvénytelenítse a futtatást, és ismétlje meg a vizsgálatot az irányelvek szigorú betartásával.

SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx

A SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx (SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontroll Dx) qRT-PCR reakciója pozitív eredményt ad a 2019-nCoV_N1 és 2019-nCoV_N2 célokkal, miközben a Cq érték kisebb vagy egyenlő, mint 37,00, míg negatív eredményt ad (nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$ eredményként jelente) a humán RNáz P gén céllal.

Humán kontroll minta

A humán kontroll minta nem fertőző humán sejtekből áll, és az RNS-kivonás eljárási kontrolljaként használatos a sikeres RNS-kivonás, valamint a kivont reagens integritásának bizonyítására. A humán kontroll mintából kivont RNS qRT-PCR reakciójának pozitív eredményt kell adnia az RP céllal, miközben a Cq érték kisebb vagy egyenlő, mint 37,00. Az N1 és N2 SARS-CoV-2 céloknak negatív eredményt kell adniuk (amelyet „nincs kimutatott Cq ” vagy „ $Cq > 37,00$ ” eredményként jelent a rendszer).

16. táblázat A kontrollok várt teljesítménye

Kontroll típusa	Kontroll neve	A következő megfigyeléséhez	N1 céleredmény	N2 céleredmény	RP céleredmény
Pozitív	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Jelentős reagenselegtenség, beleértve a primer és a próba integritását	Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)
Negatív	NTC	Reagens- és/ vagy környezeti kontamináció	Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)
Kivonás	Humán kontroll minta	A líz és extrahálási eljárás elégtelensége, potenciális kontamináció extrahálás közben	Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Pozitív ($Cq \leq 37,00$)

Eredmények és értelmezés klinikai minták esetén

A **17. táblázat** felsorolja a vizsgálat várt eredményeit. Ha egy laboratórium nem várt eredményeket kap a vizsgálati kontrollok esetén, illetve határozatlan vagy érvénytelen eredmények esetén, amelyeket nem sikerül megoldani az ajánlott ismételt tesztelés során, akkor vegye fel a kapcsolatot a CDC-vel konzultáció és a minta esetleges beküldése céljából.

Humán RNáz P gén (RP) cél

Minden klinikai mintának olyan fluoreszcencia növekedési görbét mutatni az RP célra vonatkozóan, amely keresztezi a küszöbvonalat 37,00 cikluson belül ($Cq \leq 37,00$), így jelezve a humán RNáz P gén jelenlétét. Ha nem sikerül kimutatni az RP célt a klinikai mintákban, az a következőket jelezheti:

- A nukleinsav nem megfelelő kivonása a klinikai anyagokból, amely az RNS elvesztéséhez és/vagy az RNS lebomlásához vagy gátló anyagok átviteléhez vezet.
- Megfelelő humán celluláris anyag hiánya a gyenge begyűjtés vagy a minta integritásának elvesztése miatt.
- A vizsgálat nem megfelelő beállítása és végrehajtása.
- A reagens vagy a berendezés hibás működése.

Ha az RP vizsgálat nem ad pozitív eredményt a humán klinikai mintákra, azt a következőképpen kell értelmezni:

- Ha az N1 és N2 célok pozitívak ($Cq \leq 37,00$), még pozitív RP hiányában is, akkor az eredményt érvényesnek kell tekinteni. Lehetséges, hogy bizonyos minták nem mutatnak RNáz P növekedési görbét az eredeti klinikai minta alacsony sejtszáma vagy az RP amplifikáció hatásosságát csökkentő virális célok miatt, különösen a magas vírusszámú mintákban. A negatív RP jel nem zárja ki a SARS-CoV-2 vírus RNS jelenlétét egy klinikai mintában.
- Ha az RP cél negatív (nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$), miközben az N1 és N2 célok egyike vagy mindkettő negatív (nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$), akkor az eredményt érvénytelennek kell tekinteni a mintára vonatkozóan. Ha rendelkezésre áll megmaradt minta, ismétlje meg a kivonási eljárást és a tesztet. Ha az összes cél negatív marad az ismételt tesztelés után, jelentse érvénytelenként az eredményeket, és új mintát kell begyűjteni, ha lehetséges.

2019-nCoV_N1 és 2019-nCoV_N2 célok

- Ha az összes kontroll a várt teljesítményt adja, egy minta akkor tekinthető **pozitív**nak SARS-CoV-2-re, ha a következő feltételek fennállnak.
 - Mind az N1, mind az N2 cél növekedési görbéje keresztezi a határvonalat 37,00 cikluson belül ($Cq \leq 37,00$). Attól függetlenül, hogy az RP cél pozitív vagy nem (a leírást lásd fent), a SARS-CoV-2 eredmény érvényes.
- Ha az összes kontroll a várt teljesítményt adja, egy minta akkor tekinthető **negatív**nak SARS-CoV-2-re, ha MINDKÉT következő feltétel fennáll.
 - Az N1 és az N2 célok növekedési görbéje NEM keresztezi a határvonalat 37,00 cikluson belül (nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$).
 - Az RP cél növekedési görbéje KERESZTEZI a határvonalat 37,00 cikluson belül ($Cq \leq 37,00$).
- Ha az összes kontroll a várt teljesítményt adja, egy minta akkor tekinthető **határozatlannak** SARS-CoV-2-re, ha a következő feltételek BÁRMELYIKE fennáll.

- A 2019-nCoV célok egyikének növekedési görbéje keresztezi a határvonalat 37,00 cikluson belül ($Cq \leq 37,00$), miközben a másik 2019-nCoV cél növekedési görbéje nem keresztezi a határvonalat 37,00 cikluson belül (nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$). Az RP cél növekedési görbéje keresztezi a határvonalat 37,00 cikluson belül ($Cq \leq 37,00$).

Határozatlan minták esetén a mintából kivont RNS újra kell tesztelni. Ha nem áll rendelkezésre megmaradt RNS, vonja ki újra az RNS-t a megmaradt mintából, és ismétlje meg a tesztet. Ha ugyanilyen eredményt kap, jelentse a határozatlan eredményt.

- Ha a humán kontroll minta pozitív az N1-re vagy az N2-re vonatkozóan ($Cq \leq 37,00$), akkor kontamináció következhetett be az extrahálás vagy a mintafeldolgozás során. Érvénytelenítsen minden eredményt a humán kontroll mintával együtt kivont mintákra vonatkozóan. Végezze el a minták, valamint a humán kontroll minta ismételt extrahálását, és ismétlje meg a tesztet.

17. táblázat A SARS-CoV-2 qRT-PCR vizsgálat várt eredményei

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Humán RNáz P gén	Eredmény értelmezése*	Jelentés	Teendők
Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	Pozitív VAGY negatív	SARS-CoV-2 kimutatva	Pozitív SARS-CoV-2	Jelentse az eredményeket a CDC-nek és a küldőnek
Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	SARS-CoV-2 nincs kimutatva	Nincs kimutatva	Jelentse az eredményeket a küldőnek. Fontolja meg egyéb légzőszervi vírusok tesztelését. [†]
Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	Határozatlan eredmény	Határozatlan	Ismétlje meg a kivont minta tesztelését, és/vagy ismétlje meg az extrahálást és a qRT-PCR-t.
Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	Pozitív ($Cq \leq 37,00$)	Határozatlan eredmény	Határozatlan	Ismétlje meg a kivont minta tesztelését, és/vagy ismétlje meg az extrahálást és a qRT-PCR-t.
Ha a 2019-nCoV célok egyike vagy mindkettő negatív (nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)		Negatív (Nincs kimutatott Cq vagy $Cq > 37,00$)	Érvénytelen eredmény	Érvénytelen	Ismétlje meg az extrahálást és a qRT-PCR-t. Ha a megismételt eredmények továbbra is érvénytelenek, fontolja meg új minta gyűjtését a betegtől.

* A laboratóriumoknak a diagnosztikus eredményeket a specifikus jelentési rendszerüknek megfelelően kell jelenteniük.

[†] Még nem határozták meg az optimális mintatípusokat és az időzítést a vírus csúcskoncentrációjára vonatkozóan a 2019-nCoV által okozott fertőzés során. A vírus kimutatásához szükség lehet több minta begyűjtésére ugyanattól a betegtől. Az álnegatív eredmény lehetőségét különösen meg kell fontolni, ha a beteg friss expozíciója vagy klinikai tünetei 2019-nCoV fertőzés lehetőségét vetik fel, és minden egyéb betegség (pl. egyéb légzőszervi betegségek) diagnosztikus vizsgálati eredménye negatív. Ha még mindig fennáll a 2019-nCoV fertőzés gyanúja, meg kell fontolni az ismételt tesztelést a közegészségügyi hatóságokkal való konzultáció után.

7 Minőség-ellenőrzés

Minőség-ellenőrzés **74**

Ez a fejezet a vizsgálat minőség-ellenőrzési intézkedéseivel kapcsolatos információkat tartalmaz.

Minőség-ellenőrzés

- A minőség-ellenőrzési követelményeket a helyi, állami és szövetségi előírások vagy akkreditációs követelmények, valamint a felhasználó laboratóriumának standard minőség-ellenőrzési eljárásainak megfelelően kell végezni.
- A minőség-ellenőrzési eljárások célja a reagens és a vizsgálat teljesítményének megfigyelése.
- Tesztelje az összes pozitív kontrollt, mielőtt a diagnosztikus mintákat új készlettel futtatná, annak biztosítása érdekében, hogy minden reagens és készletösszetevő megfelelően működik.
- A helyes laboratóriumi gyakorlat (cGLP) ajánlásai szerint pozitív extrakciós kontrollt kell használni minden nukleinsav-izolációs tételnél.
- A humán kontroll mintának nukleinsav-kivonáson **kell** átesnie minden tesztelendő mintatétel esetén.
- **Mindig** legyen negatív kontroll minta (no template control, NTC) és SARS-CoV-2 szintetikus pozitív RNS kontroll minden amplifikációs és detektálási futtatásnál.
- A humán RNS-szintáz P gén próba/primer készlete (amely a 10× SARS-CoV-2 primer/próba keverék része) szabályozza a minta minőségét és extrahálását.

8 A vizsgálat korlátjai

Korlátozások **76**

Ez a fejezet leírja az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlettel végzett vizsgálat korlátjait.

Korlátozások

- 1** A vizsgálatot csak az eljárásban képzett személyzet végezheti. Az utasítások be nem tartása hibás eredményekhez vezethet.
- 2** A megbízható eredmények a megfelelő mintagyűjtéstől, -szállítástól, -tárolástól és -feldolgozástól függenek.
- 3** A helyes laboratóriumi gyakorlat, valamint a jelen használati utasításban meghatározott eljárások betartásával kerülje el a szennyeződést.
- 4** A negatív eredmény nem zárja ki a SARS-CoV-2 fertőzést, és nem használható a kezelés vagy egyéb kezelési döntések kizárólagos alapjaként.
- 5** A pozitív eredmény a releváns vírusból származó nukleinsav kimutatását jelzi. A nukleinsav még akkor is fennmaradhat, amikor a vírus már nem életképes.
- 6** Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit vizsgálat teljesítményét nazofaringeális tamponminta típusal határozták meg UTM és VCM szállítóközegben. Az orofaringeális tamponminta, az orr és a középső orrkagyló tamponmintái elfogadható mintatípust jelentenek az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlettel végzett vizsgálathoz, de a teljesítmény ezekkel a mintákkal még nincs megállapítva. Az orofaringeális tamponminták, az orr és a középső orrkagyló tamponmintáinak vizsgálata (amelyet saját kezűleg vagy egészségügyi szakember felügyelete alatt gyűjtöttek) csak a COVID-19 tüneteiben szenvedő betegekre korlátozódik.
- 7** Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit nem tartalmaz használati mintát humán kontroll mintaként. Az ilyen kontrollként használt mintát a laboratóriumnak kell validálnia.

9 Teljesítményjellemzők

Teljesítményjellemzők **78**

Ez a fejezet az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit teljesítményjellemzőit tartalmazza.

Teljesítményjellemzők

A következő adatok bemutatják az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit teljesítményjellemzőit. Minden használt mintakivonat a „Nukleinsavak kivonása” részben (19. oldal) javasolt minta bemeneti térfogatokat és az elúciós térfogatokat használja.

Analitikai érzékenység (kimutatási határ)

Az Agilent elvégzett egy kimutatási határ (Limit of Detection, LoD) vizsgálatot, hogy meghatározza azt a legalacsonyabb SARS-CoV-2 víruskoncentrációt (a vírus genom kópiák számában kifejezve), amelyet az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit legalább az esetek 95%-ában ki tud mutatni minden támogatott nukleinsav-kivonási eljárással, mindhárom támogatott valós idejű PCR rendszeren.

Az LoD vizsgálati mintapaneleket egy kereskedelmi forgalomban kapható, kvantifikált SARS-CoV-2 standard poolozott negatív klinikai mintákkal (negatív mátrix) való hígításával nyerték ki, hogy elérjék a kívánt SARS-CoV-2 célkoncentráció-sorozatot. Minden klinikai minta nazofaringeális tamponminta volt, amelyet korábban sürgősségi használati jóváhagyással rendelkező, majd az Agilent által is megerősített SARS-CoV-2 vizsgálattal teszteltek SARS-CoV-2-re.

Az előzetes teljes vizsgálati LoD-kísérletben számos víruskoncentrációt használtak, koncentrációnként három replikátummal. Az előzetes kísérletben vizsgált koncentrációtartomány 0,75–3 kópia/μl közötti. Az előzetes kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a végső LoD nagy valószínűséggel ebbe a tartományba esik, és a kivonási módszertől, illetve a valós idejű PCR rendszertől függ.

A végső teljes vizsgálati LoD igazoló kísérletet három cél bemeneti szinten végezték: 0,75, 1 és 1,5 kópia/μl. E három cél bemeneti szint mindegyike esetén 20 egyedi kivont replikátumot teszteltek az összes lehetséges kivonási módszer/valós idejű PCR rendszer kombinációjával.

A 18. táblázat bemutatja a kísérlet pozitív kimutatási arányát. A 20/20-as kimutatási arány azt jelzi, hogy mind a 20 kivont replikátum kimutatható volt az adott kivonási módszer és valós idejű PCR rendszer kombinációjával.

18. táblázat Végső kimutatási határ megerősítése – pozitív kimutatási arányok* minden nukleinsav-kivonási módszerrel minden valós idejű PCR rendszer esetén (Agilent AriaMx, ABI 7500 és Bio-Rad CFX96)

A SARS-CoV-2 vírus cél bemeneti szintje a kivonás előtt (kópia/μl)	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit készlet (QIASymphony DSP vírus/patogén midi készlet) QIASymphony-val (automatizált kivonás)			MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (vírus/patogén nukleinsav-izoláló készlet) KingFisher Flex-szel (automatizált kivonás)		
	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
1,5	19/19 (1)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1	1/10 (10)	20/20	17/18 (2)	19/19 (1)	18/19 (1)	18/18 (2)
0,75	3/13 (7)	15/16 (4)	18/18 (2)	15/16 (4)	19/19 (1)	16/16 (4)

* A kimutatási arányok a pozitív replikátumok számaként vannak kifejezve a pozitív és negatív replikátumok teljes számából. A zárójelben lévő számok (ha vannak) a határozatlan replikátumok számát jelölik. Ilyen esetekben a pozitív és negatív replikátumok teljes száma kevesebb, mint 20.

A **19. táblázat** minden kivonási módszer/valós idejű PCR rendszer kombináció esetén összefoglalja a végső LoD értékeket. Ezek a számok a μ literenkénti nukleinsav-kivonatban lévő víruskópiák számát jelzik, amelyeket az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit legalább az esetek 95%-ában kimutat.

19. táblázat Végső kimutatási határ összefoglalása -- LoD minden nukleinsav-kivonási módszer és minden valós idejű PCR rendszer esetén (Agilent AriaMx, ABI 7500 és Bio-Rad CFX96)

Nukleinsav-kivonási módszer	Teljes vizsgálati kimutatási határ (kópia/ μ l)		
	AriaMx	7500	CFX96
QIASymphony DSP Vírus/Pathogen Midi Kit készlet (QIASymphony DSP vírus/patogén midi készlet) QIASymphony-val (automatizált kivonás)	1,5	1	1,5
MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (vírus/patogén nukleinsav-izoláló készlet) KingFisher Flex-szel (automatizált kivonás)	1	1,5	1,5

Analitikai inkluzivitás

Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készletben az N1 és N2 víruscélok, valamint a humán RNáz P gén oligonukleotid primerek és próbák szekvenciái megegyeznek a kizárólag sürgősségi használatra szolgáló CDC 2019-új koronavírus (2019-nCoV) valós idejű RT-PCR diagnosztikus panel esetén használt szekvenciával. Ezen panel inkluzivitását korábban meghatározták.

Keresztreaktivitás

Az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készletben az N1 és N2 víruscélok, valamint a humán RNáz P gén oligonukleotid primerek és próbák szekvenciái megegyeznek a kizárólag sürgősségi használatra szolgáló CDC 2019-új koronavírus (2019-nCoV) valós idejű RT-PCR diagnosztikus panel esetén használt szekvenciával. Ezen panel keresztreaktivitását korábban meghatározták.

Klinikai értékelés

Klinikai értékelési vizsgálatot végeztek az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlettel, humán nazofaringeális tamponminták (NP) használatával. Minden tesztfeltétel esetén összesen 80 mintát teszteltek: 40 negatív NP mintát és 40 pozitív NP mintát. Az egyes minták pozitív vagy negatív státuszát egy sürgősségi használatra jóváhagyott (EUA) qRT-PCR SARS-CoV-2 vizsgálattal határozták meg. A klinikai értékelés célkitűzése az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlettel nyert teszteredmények klinikai jóváhagyásának (pozitív/negatív) értékelése volt a komparátor EUA qRT-PCR SARS-CoV-2 vizsgálathoz képest.

A nukleinsav-kivonást mindegyik minta esetén mindkét támogatott automatizált kivonási platformmal (QIAGEN QIASymphony DSP Vírus/Pathogen Midi Kit QIASymphony SP-vel (QIAGEN QIASymphony DSP vírus/patogén midi készlet QIASymphony SP-vel), valamint a Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit KingFisher Flex Purification Systemmel (Thermo Fisher Scientific MagMAX vírus/patogén II nukleinsav-izoláló készlet KingFisher Flex tisztító rendszerrel)) elvégezték, a gyártó protokollja és a jelen használati utasításban megadott ajánlások segítségével. A kivont mintát ezután mindhárom támogatott valós idejű PCR rendszerrel tesztelték (Agilent AriaMx, ABI 7500 és Bio-Rad CFX96) a jelen

használati utasításban leírtaknak megfelelően. Így minden mintát hat (6) különböző feltétellel teszteltek a vizsgálatban. Elfogadhatósági kritériumként legalább 95%-os pozitív és negatív egyezésre volt szükség az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlet és a komparátor vizsgálat között. Az egyezmény eredményeit a **20. táblázat** foglalja össze.

20. táblázat Pozitív százalékos egyezés (PPA), negatív százalékos egyezés (NPA) és teljes egyezés (OA) az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit készlet és a komparátor EUA qRT-PCR SARS-CoV-2 vizsgálat között

Kivonási platform:	QIASymphony	QIASymphony	QIASymphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
Valós idejű PCR rendszer:	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
PPA	97,4%	100,0%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%
NPA	100,0%	97,5%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%
OA	98,7%	98,8%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%

10





Hivatkozások

Termékcímkék **82**




Ez a fejezet az Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit termékcímkéit tartalmazza.


Termékcímkék


The label for Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents includes the Agilent logo, CE and IVD marks, and a QR code. It specifies the reference number K1180-64100, lot number ABC123, and an expiration date of 2022-04-29. Storage conditions are listed as -15°C and -25°C. The quantity is 400. Manufacturer information for Agilent Technologies, Inc. in Santa Clara, CA and the production site in Glostrup, Denmark, is provided. A barcode and UDI (01) 0 5700574 03375 0 (10) ABC123 (17) 220429 are also present.



Agilent     agilent.com/chem/sars-cov-2-qpcr-dx-kit
+44 161 492 7054


Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents


REF K1180-64100  2022-04-29  -15°C  **400**

LOT ABC123  -25°C

 Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, U.S.A.
Manufactured at
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, U.S.A.
www.agilent.com



  Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark





UDI  (01) 0 5700574 03375 0 (10) ABC123 (17) 220429

37. ábra K1180-64100 dobozcímkéje


The label for 2X Brilliant III qRT-PCR Master Mix Dx includes CE and IVD marks. It specifies the reference number 5191-6866, lot number ABC123, and an expiration date of 2020-12-31. Storage conditions are listed as -15°C and -25°C. The quantity is 2 ml.

2X Brilliant III  

qRT-PCR Master Mix Dx



REF 5191-6866  -15°C  -25°C



LOT ABC123

2 ml  2020-12-31


38. ábra 5191-6866 dobozcímkéje

The label for RT/RNase Block Dx includes CE and IVD marks. It specifies the reference number 5191-6870, lot number ABC123, and an expiration date of 2020-12-31. Storage conditions are listed as -15°C and -25°C. The quantity is 400 µl.

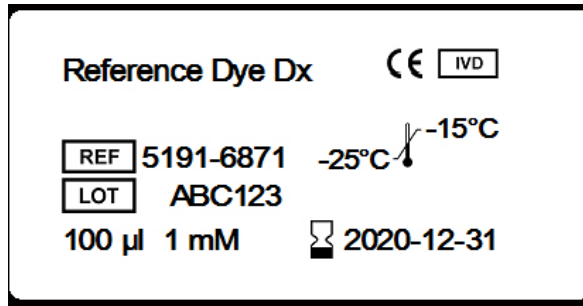
RT/RNase Block Dx  

REF 5191-6870  -15°C  -25°C

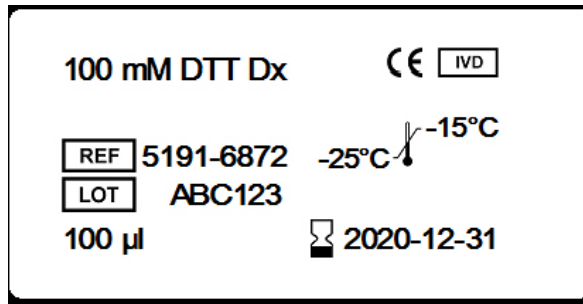
LOT ABC123

400 µl  2020-12-31

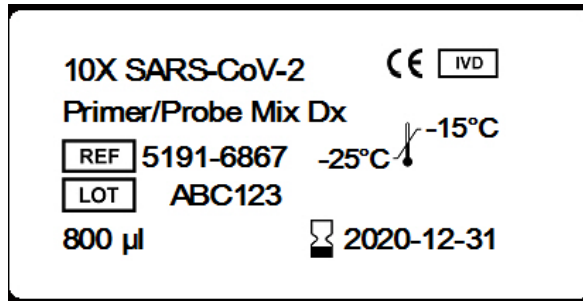
39. ábra 5191-6870 tubuscímkéje



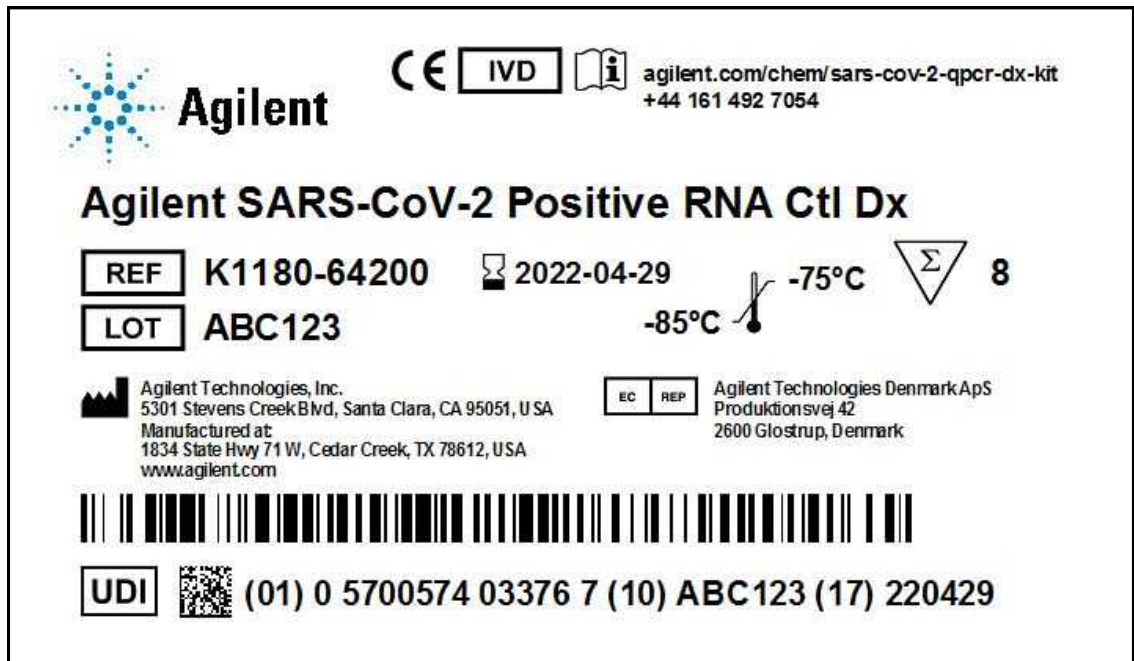
40. ábra 5191-6871 tubuscímkéje



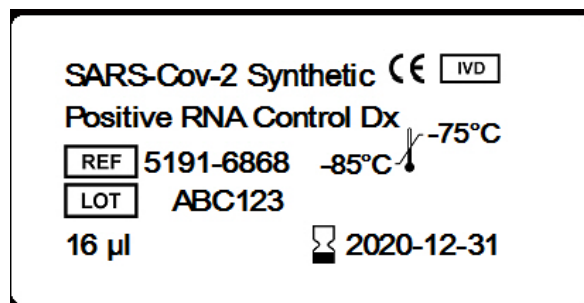
41. ábra 5191-6872 tubuscímkéje



42. ábra 5191-6867 tubuscímkéje



43. ábra K1180-64200 dobozcímkéje



44. ábra 5191-6868 tubuscímkéje

Gyártó:



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

Meghatalmazott képviselő az Európai Unióban:



Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark

Agilent technikai támogatás

Az országspecifikus telefonszámokért látogasson el a www.agilent.com/en/contact-us/page honlapra, vagy küldjön e-mailt a covid.support@agilent.com címre.

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Az Egyesült Államokban érvényes és a nemzetközi szerzői jogi törvényeknek megfelelően az Agilent Technologies, Inc. előzetes engedélye és írásos beleegyezése nélkül a kézikönyv egyetlen része sem reprodukálható semmilyen formában és semmilyen módon (beleértve az elektronikus tárolást, valamint az idegen nyelvre történő visszairást vagy fordítást is).

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

B2 változat, 2022. május

