



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



Οδηγίες χρήσης

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Μόνο για εξαγωγή. Δεν προορίζεται για πώληση στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Αναθεώρηση B2, Μάιος 2022

Πίνακας συμβόλων

	Ευρωπαϊκή συμμόρφωση		Προσοχή
	Ιατροτεχνολογικό προϊόν <i>in vitro</i> διαγνωστικών εξετάσεων		Αριθμός καταλόγου/ κωδικού
	Κατασκευαστής		Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Ημερομηνία λήξης		Περιέχει υλικό επαρκές για <N> εξετάσεις
	Κωδικός παρτίδας		Να μην επαναχρησιμοποιείται
	Περιορισμοί θερμοκρασίας		Αποκλειστικό αναγνωριστικό τεχνολογικού προϊόντος
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα		

Σημείωση για τον αγοραστή: Περιορισμένη άδεια χρήσης

Αυτό το προϊόν πωλείται βάσει συμφωνιών παραχώρησης αδειών χρήσης μεταξύ της Agilent και της Life Technologies Corporation. Η τιμή αγοράς αυτού του προϊόντος περιλαμβάνει περιορισμένα, μη μεταβιβάσιμα δικαιώματα που κατέχει η Life Technologies Corporation για χρήση μόνο αυτής της ποσότητας προϊόντος για *in vitro* εξέταση του ιού SARS-CoV-2 στον άνθρωπο σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης που συνοδεύουν αυτό το προϊόν. Δεν μεταβιβάζονται άλλα δικαιώματα. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την αγορά αδειών χρήσης βάσει του παραπάνω διπλώματος ευρεσιτεχνίας μπορούν να ληφθούν μετά από επικοινωνία με το Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Email: outlicensing@lifetech.com.

1 Πληροφορίες για το προϊόν Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Προοριζόμενη χρήση	6
Περιγραφή προϊόντος	7
Επισκόπηση προϊόντος/Αρχή της εξέτασης	7
Περιγραφή των βημάτων της εξέτασης	7
Υλικά μάρτυρα για χρήση με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit	7
Ροή εργασιών της ανάλυσης προσδιορισμού	9

2 Υλικά, ασφάλεια και χειρισμός

Παρεχόμενα υλικά	11
Αντιδραστήρια, υλικά, εξοπλισμός και λογισμικό που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	12
Προφυλάξεις ασφαλείας	15
Φύλαξη και χειρισμός	17
Συσκευασία προϊόντος	17
Φύλαξη, χειρισμός και σταθερότητα των αντιδραστηρίων	17
Συλλογή, χειρισμός και φύλαξη των δειγμάτων	17

3 Οδηγίες για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων

Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων	19
---------------------------	----

4 Οδηγίες για την προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR

Ρύθμιση του πειράματος qRT-PCR στο σύστημα Real-Time PCR	21
Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος AriaMx/AriaDx (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχει δημιουργηθεί ήδη ένα πρότυπο)	22
Δημιουργία πειράματος AriaMx/AriaDx από αποθηκευμένο πρότυπο	27
Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος ABI 7500 Fast (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχει δημιουργηθεί ήδη ένα πρότυπο)	28
Δημιουργία πειράματος ABI 7500 Fast από αποθηκευμένο πρότυπο	34
Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχουν δημιουργηθεί και αποθηκευτεί το πρωτόκολλο και τα αρχεία πλάκας)	35
Δημιουργία πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR από αποθηκευμένο αρχείο πρωτοκόλλου και αρχείο πλάκας	41
Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR	42

5 Οδηγίες για την εκτέλεση του προγράμματος qRT-PCR

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR	47
Εκτέλεση του προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα AriaMx/AriaDx	47
Αντιστοίχιση ρυθμίσεων ανάλυσης δεδομένων για το πείραμα AriaMx/AriaDx	48
Εξαγωγή των δεδομένων από το λογισμικό Aria	53

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο όργανο ABI 7500 Fast Real Time PCR	55
Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο όργανο ABI 7500 Fast Real Time PCR	55
Αντιστοίχιση ρυθμίσεων ανάλυσης δεδομένων για το πείραμα ABI 7500 Fast	55
Εξαγωγή δεδομένων Well Table από το λογισμικό Design & Analysis σε ένα αρχείο CSV	60
Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα ανίχνευσης Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR	62
Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα ανίχνευσης CFX96 Touch Real-Time PCR	62
Αντιστοίχιση ρυθμίσεων ανάλυσης δεδομένων για το σύστημα ανίχνευσης CFX96 Touch Real-Time PCR	62
Εξαγωγή των δεδομένων από το λογισμικό CFX Maestro	67

6 Ανάλυση και αποτελέσματα

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	70
Αποτελέσματα και ερμηνεία για δείγματα μάρτυρα	70
Αποτελέσματα και ερμηνεία για κλινικά δείγματα	71

7 Ποιοτικός έλεγχος

Ποιοτικός έλεγχος	75
-------------------	----

8 Περιορισμοί ανάλυσης προσδιορισμού

Περιορισμοί	77
-------------	----

9 Χαρακτηριστικά απόδοσης

Χαρακτηριστικά απόδοσης	79
Αναλυτική ευαισθησία (Όριο ανίχνευσης)	79
Αναλυτική συμπερίληψη	80
Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα	81
Κλινική αξιολόγηση	81

10 Πληροφορίες αναφοράς

Ετικέτες προϊόντος	83
--------------------	----

1

Πληροφορίες για το προϊόν Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Προοριζόμενη χρήση	6
Περιγραφή προϊόντος	7
Ροή εργασιών της ανάλυσης προσδιορισμού	9

Αυτό το κεφάλαιο περιέχει εισαγωγικές πληροφορίες για την ανάλυση προσδιορισμού.

Προοριζόμενη χρήση

Το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit είναι μια in vitro διαγνωστική εξέταση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) που προορίζεται για την ποιοτική ανίχνευση RNA του ιού SARS-CoV-2 κατόπιν απομόνωσης και καθαρισμού από δείγματα ρινοφαρυγγικού, ρινικού και στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος που λαμβάνονται από άτομα τα οποία πληρούν κλινικά ή/και επιδημιολογικά κριτήρια της νόσου COVID-19.*

Τα αποτελέσματα αφορούν την ταυτοποίηση RNA του ιού SARS-CoV-2. Το RNA του ιού SARS-CoV-2 ανιχνεύεται γενικά σε δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος κατά την οξεία φάση της λοίμωξης. Τα θετικά αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της παρουσίας RNA του ιού SARS-CoV-2. Ωστόσο, απαιτείται κλινική συσχέτιση με το ιστορικό του ασθενούς και άλλες διαγνωστικές πληροφορίες ώστε να προσδιοριστεί η κατάσταση λοίμωξης του ασθενούς. Τα θετικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη βακτηριακή λοίμωξη ή τη συλλοίμωξη από άλλους ιούς. Ο παράγοντας που ανιχνεύεται ενδέχεται να μην συνιστά την οριστική αιτία της νόσου.

Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μόνη βάση λήψης αποφάσεων για τη διαχείριση ασθενών. Τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να συνδυάζονται με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, με το ιστορικό του ασθενούς και με επιδημιολογικές πληροφορίες.

Το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit προορίζεται για χρήση από ειδικευμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό κλινικού εργαστηρίου με ειδική ενημέρωση και κατάρτιση στη λειτουργία του συστήματος Agilent και τις in vitro διαγνωστικές διαδικασίες.

* Η απόδοση της ανάλυσης προσδιορισμού Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit τεκμηριώθηκε με χρήση δείγματος ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος που συλλέγεται σε μέσα μεταφοράς UTM ή VCM. Τα στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα, τα ρινικά επιχρίσματα και τα επιχρίσματα μέσης ρινικής κόγχης θεωρούνται αποδεκτοί τύποι δειγμάτων για χρήση με την ανάλυση προσδιορισμού Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit αλλά η απόδοση με τους συγκεκριμένους τύπους δειγμάτων δεν έχει τεκμηριωθεί. Πρέπει να υποβάλλονται σε εξέταση μόνο στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα, ρινικά επιχρίσματα και επιχρίσματα μέσης ρινικής κόγχης (που συλλέγονται από προσωπικό παροχής υγειονομικής περίθαλψης ή υπό την επίβλεψη αυτού) από ασθενείς με συμπτώματα της νόσου COVID-19.

Περιγραφή προϊόντος

Επισκόπηση προϊόντος/Αρχή της εξέτασης

Το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit είναι μια εξέταση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR). Τα σετ εκκινητών και ιχνηθετών SARS-CoV-2 είναι σχεδιασμένα να ανιχνεύουν RNA του ιού SARS-CoV-2 σε δείγματα ρινοφαρυγγικού, ρινικού και στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος από ασθενείς που πιθανολογείται από τον θεράποντα ιατρό τους ότι νοσούν με COVID-19.

Περιγραφή των βημάτων της εξέτασης

Πραγματοποιείται απομόνωση και καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων από ~140–200 µl (ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης) δειγμάτων ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος με χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος εκχύλισης (Qiagen QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit με QIAAsymphony, ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II Kit με KingFisher Flex). Το καθαρό νουκλεϊκό οξύ (5 µl) μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA και, στη συνέχεια, ενισχύεται με αντίδραση qRT-PCR ενός βήματος με χρήση αντιδραστηρίων Agilent Brilliant III qRT-PCR σε όργανα συμβατά για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο. Κατά τη διαδικασία, ο ιχνηθέτης αναδιατάσσει μια συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο που βρίσκεται μεταξύ του πρόσθιου και του ανάστροφου εκκινητή. Κατά τη φάση επέκτασης του κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η δράση 5' νουκλεάσης της *Taq* πολυμεράσης υποβαθμίζει τον ιχνηθέτη, προκαλώντας διαχωρισμό της φθορίζουσας χρωστικής από τη χρωστική καταστολέα, παράγοντας φθορίζον σήμα. Με κάθε κύκλο, διαχωρίζονται πρόσθετα μόρια φθορίζουσας χρωστικής από τους αντίστοιχους ιχνηθέτες τους, αυξάνοντας την ένταση του φθορισμού. Η ένταση φθορισμού παρακολουθείται σε κάθε κύκλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με όργανα συμβατά για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast ή Bio-Rad CFX96).

Υλικά μάρτυρα για χρήση με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

- Απαιτείται αρνητικός μάρτυρας (no template control) για τον έλεγχο μόλυνσης στη διαδικασία της ανάλυσης προσδιορισμού που ενδέχεται να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ο οποίος πρέπει να χρησιμοποιείται τουλάχιστον μία φορά ανά πλάκα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ο χρήστης προσθέτει νερό στη θέση του εκχυλισμένου RNA, το οποίο χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας (no template control).
- Απαιτείται θετικός μάρτυρας για να διασφαλιστεί ότι δεν αλλοιώνεται ο μηχανισμός ανίχνευσης του στοχευόμενου RNA του ιού SARS-CoV-2, ο οποίος πρέπει να χρησιμοποιείται τουλάχιστον μία φορά ανά πλάκα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (50 αντίγραφα/αντίδραση). Ο θετικός μάρτυρας του κιτ είναι συνθετικό RNA αντίστοιχο των αλληλουχιών-στόχων του ιού.

- Απαιτείται μάρτυρας εκχύλισης (μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος, HSC) για να διασφαλιστεί ότι το RNA στο αρχικό δείγμα διατηρείται καλά κατά την εκχύλιση, ο οποίος πρέπει να χρησιμοποιείται τουλάχιστον μία φορά ανά παρτίδα εκχύλισης.
- Απαιτείται εσωτερικός μάρτυρας (ανθρώπινο γονίδιο RNase P) για να διασφαλιστεί ότι το RNA από το αρχικό δείγμα μπορεί να ανιχνευτεί στην αντίδραση qRT-PCR. Αναμένεται να ανιχνευτεί στον HSC καθώς και στα περισσότερα ανθρώπινα δείγματα με επαρκές κυτταρικό RNA. Στα ανθρώπινα δείγματα, ο εσωτερικός μάρτυρας ενδέχεται να μην ανιχνευτεί αν υπάρχει παρουσία ιικού RNA του SARS-CoV-2 σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Μάρτυρες που παρέχονται με το κιτ

Πίνακας 1 Μάρτυρας που παρέχεται με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Τύπος μάρτυρα	Ονομασία μάρτυρα	Επωνυμία προμηθευτή	Αρ. προϊόντος προμηθευτή
Θετικός	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

Απαιτούμενοι μάρτυρες που δεν παρέχονται με το κιτ

- Αρνητικός μάρτυρας εφαρμογών μοριακής βιολογίας, ύδωρ ελεύθερο νουκλεάσης, για χρήση ως αρνητικός μάρτυρας (no template control)
- Μάρτυρας εκχύλισης: διατίθεται πλήθος επιλογών για τον πελάτη, σύμφωνα με τις συστάσεις του CDC (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ)
 - Μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος, παρασκευασμένος από το CDC, KT0189
 - Αρνητικό υλικό ανθρώπινου δείγματος: Τα εργαστήρια μπορούν να προετοιμάσουν μια ποσότητα υλικού ανθρώπινου δείγματος (π.χ., ανθρώπινος ορός ή υπολείμματα από αρνητικά δείγματα δεξαμενής του αναπνευστικού συστήματος) για εκχύλιση και εκτέλεση μαζί με τα κλινικά δείγματα ως μάρτυρα εκχύλισης. Το υλικό θα πρέπει να προετοιμαστεί σε επαρκή ποσότητα για να χρησιμοποιηθεί σε πολλές αναλύσεις. Το υλικό θα πρέπει να εξεταστεί πριν από τη χρήση του ως μάρτυρας εκχύλισης για να διασφαλιστεί ότι παρέχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα για τον HSC που αναφέρονται στις παρούσες οδηγίες χρήσης.
 - Τεχνητό υλικό ανθρώπινου δείγματος: Τα εργαστήρια μπορούν να προετοιμάσουν τεχνητό υλικό ανθρώπινου δείγματος με εναιώρηση μιας ανθρώπινης κυτταρικής σειράς (π.χ., A549, Hela ή 293) σε PBS. Το υλικό θα πρέπει να προετοιμαστεί σε επαρκή ποσότητα για να χρησιμοποιηθεί σε πολλές αναλύσεις. Το υλικό θα πρέπει να εξεταστεί πριν από τη χρήση του ως μάρτυρας εκχύλισης για να διασφαλιστεί ότι παρέχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα για τον HSC που αναφέρονται στις παρούσες οδηγίες χρήσης.

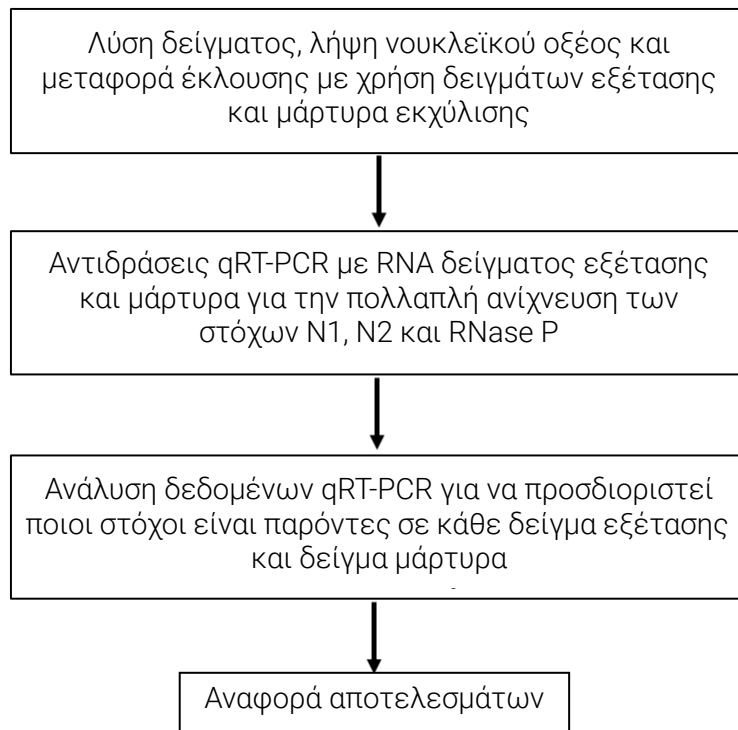
Ροή εργασιών της ανάλυσης προσδιορισμού

Για να ξεκινήσετε την ανάλυση προσδιορισμού, εκχυλίστε νουκλεϊκό οξύ από τα ρινοφαρυγγικά δείγματα εξέτασης μαζί με έναν κατάλληλο μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος.

Στη συνέχεια, εκτελέστε ένα πείραμα πολλαπλής qRT-PCR χρησιμοποιώντας τα δείγματα εκχυλισμένου RNA και τον παρεχόμενο θετικό μάρτυρα RNA. Συμπεριλάβετε αρνητικό μάρτυρα (NTC).

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης qRT-PCR, αναλύστε τα δεδομένα για ενίσχυση των ιικών στόχων N1 και N2 και του στόχου του ανθρώπινου γονιδίου RNase P.

Τέλος, αναφέρετε τα αποτελέσματα για τα δείγματα της εξέτασης.



Σχήμα 1 Ροή εργασιών της ανάλυσης προσδιορισμού SARS-CoV2 qRT-PCR Dx

2 Υλικά, ασφάλεια και χειρισμός

Παρεχόμενα υλικά **11**

Αντιδραστήρια, υλικά, εξοπλισμός και λογισμικό που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται **12**

Προφυλάξεις ασφαλείας **15**

Φύλαξη και χειρισμός **17**

Το κεφάλαιο αυτό περιγράφει τα αντιδραστήρια και άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση προσδιορισμού και παρέχει πληροφορίες για την ασφαλή διενέργεια της ανάλυσης προσδιορισμού.

Παρεχόμενα υλικά

Ο Πίνακας 2 παραθέτει τα υλικά που παρέχονται με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, καθώς και τις προδιαγραφές θερμοκρασίας για το καθένα. Ανατρέξτε στην ενότητα «Φύλαξη και χειρισμός» στη σελίδα 17 για επιπλέον οδηγίες σχετικά με τη φύλαξη των υλικών.

Πίνακας 2 Παρεχόμενα υλικά με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, αρ. προϊόντος K1180A

Υλικά	Ποσότητα	Στοιχεία	Θερμοκρασία φύλαξης
Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents, αρ. προϊόντος K1180-64100*	Επαρκούν για 400 αντιδράσεις qRT-PCR (δείγματα εξέτασης και μάρτυρες) <i>Λάβετε υπόψη ότι κάθε πλάκα αντίδρασης qRT-PCR πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 3 βοηθία για αντιδράσεις μαρτύρων.</i>	2x Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	Φύλαξη σε θερμοκρασία -20 °C με την παραλαβή.
		RT/RNase Block Dx	Φύλαξη σε θερμοκρασία -20 °C με την παραλαβή.
		Reference Dye Dx [†]	Φύλαξη σε θερμοκρασία -20 °C με την παραλαβή.
		100 mM DTT Dx	Φύλαξη σε θερμοκρασία -20 °C με την παραλαβή.
		10x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx [†]	Φύλαξη σε θερμοκρασία -20 °C με την παραλαβή.
Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, αρ. προϊόντος K1180-64200 [‡]	Επαρκεί για 8 αναλύσεις προσδιορισμού	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Φύλαξη σε θερμοκρασία -80 °C με την παραλαβή.

* Το κιτ αντιδραστηρίων SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents πωλείται επίσης ξεχωριστά με αρ. προϊόντος Agilent K1180B.

[†] Το αντιδραστήριο έχει ευαισθησία στο φως και πρέπει να διατηρείται μακριά από το φως όσο είναι δυνατόν.

[‡] Το SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx πωλείται επίσης ξεχωριστά με αρ. προϊόντος Agilent K1180C.

Αντιδραστήρια, υλικά, εξοπλισμός και λογισμικό που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Ο **Πίνακας 3** παραθέτει τις επιλογές για το στάδιο εκχύλισης RNA του πρωτοκόλλου, το οποίο διενεργείται σε όργανο αυτοματοποίησης. Η διαδικασία εκχύλισης RNA περιγράφεται στην ενότητα «**Οδηγίες για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων**» στη σελίδα 18.

Πίνακας 3 Επιλογές εκχύλισης RNA – Απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κιτ εκχύλισης RNA	Όργανο
QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, αρ. προϊόντος 937055	QIAGEN QIAAsymphony SP, αρ. προϊόντος 9001297 (αυτοματοποίηση)
Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher αρ. προϊόντος A48383	Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Purification System, αρ. προϊόντος 5400630 (αυτοματοποίηση)

Ο **Πίνακας 4** παραθέτει τις επιλογές για τον μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος. Πρόκειται για δείγμα μάρτυρα παρασκευασμένο από καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της διαδικασίας εκχύλισης για να καταδεικνύει την επιτυχή ανάκτηση νουκλεϊκού οξέος, καθώς και την ακεραιότητα του αντιδραστηρίου εκχύλισης.

Πίνακας 4 Επιλογές μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος – Απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος	Περιγραφή
Μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος (HSC), 10 φιαλίδια × 500 μl, CDC αρ. προϊόντος KT0189	Παρασκευάζεται και πωλείται από το CDC. Ο μάρτυρας HSC του CDC αποτελείται από μη λοιμογόνο υλικό καλλιέργειας ανθρώπινων κυττάρων (beta-Proiolactone treated) που παρέχεται ως υγρό εναιώρημα σε 0,01 M PBS σε pH 7,2–7,4.
Αρνητικό υλικό ανθρώπινου δείγματος	Παρασκευάζεται από το εργαστήριο. Τύπος μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος που αποτελείται από μια ποσότητα υλικού ανθρώπινου δείγματος (π.χ., ανθρώπινος ορός ή υπολείμματα από αρνητικά δείγματα δεξαμενής του αναπνευστικού συστήματος) για εκχύλιση και εκτέλεση μαζί με τα κλινικά δείγματα ως μάρτυρας εκχύλισης. Το υλικό θα πρέπει να προετοιμαστεί σε επαρκή ποσότητα για να χρησιμοποιηθεί σε πολλές αναλύσεις. Το υλικό θα πρέπει να εξεταστεί πριν από τη χρήση του ως μάρτυρας εκχύλισης για να διασφαλιστεί ότι παρέχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα για τον HSC που αναφέρονται στις παρούσες οδηγίες χρήσης.
Τεχνητό υλικό ανθρώπινου δείγματος	Παρασκευάζεται από το εργαστήριο. Τύπος μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος που αποτελείται από τεχνητό υλικό ανθρώπινου δείγματος και προετοιμάζεται με εναιώρηση μιας ανθρώπινης κυτταρικής σειράς (π.χ., A549, HeLa ή 293) σε PBS. Το υλικό θα πρέπει να προετοιμαστεί σε επαρκή ποσότητα για να χρησιμοποιηθεί σε πολλές αναλύσεις. Το υλικό θα πρέπει να εξετάζεται πριν από τη χρήση του ως μάρτυρας εκχύλισης, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι παρέχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα για τον μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος που αναφέρονται στις παρούσες οδηγίες χρήσης.

Ο Πίνακας 5 και ο Πίνακας 6 παραθέτουν τα επιπλέον αντιδραστήρια, τα υλικά, τον εξοπλισμό και το όργανο που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Πίνακας 5 Αντιδραστήρια και υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Αντιδραστήριο ή υλικό	Μορφή
Ύδωρ ελεύθερο νουκλεάσης, εφαρμογών μοριακής βιολογίας	Αντιδραστήριο
Διάλυμα χλωρίνης 10% (αραίωση 1:10 5,25–6% υποχλωριώδους χλωρίνης)	Υλικό
DNAZap, Ambion αρ. προϊόντος AM9890 ή αντίστοιχος απολυμαντικός παράγοντας	Υλικό
RNase AWAY, Fisher Scientific αρ. προϊόντος 21-236-21 ή αντίστοιχος απολυμαντικός παράγοντας	Υλικό
Γάντια χωρίς πούδρα μίας χρήσης και χειρουργικές ποδιές	Υλικό
Στείρα, ελεύθερα νουκλεάσης ρύγχη πιπέτας με φραγμό αερολύματος	Υλικό
Ελεύθερα νουκλεάσης σωληνάρια μικροφυγόκεντρου 1,5 ml	Υλικό
Ελεύθερα νουκλεάσης σωληνάρια μικροφυγόκεντρου 2 ml	Υλικό
Ελεύθερες νουκλεάσης πλάκες 96 βοθρίων, 200 μl <i>Χρησιμοποιείτε πλάκες συμβατές με το επιλεγμένο σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο</i>	Υλικό
Ελεύθερες νουκλεάσης αλυσίδες 8 σωληναρίων	Υλικό
Ελεύθερη νουκλεάσης αυτοκόλλητη σφράγιση πλάκας ή Ελεύθερες νουκλεάσης οπτικές αλυσίδες 8 πωμάτων για πλάκες PCR 96 βοθρίων <i>Χρησιμοποιείτε σφράγιση ή αλυσίδες συμβατές με το επιλεγμένο σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο</i>	Υλικό
MicroAmp Optical Film Compression Pads, Thermo Fisher Scientific, αρ. προϊόντος 4312639*	Υλικό

* Οι επιφάνειες συμπίεσης απαιτούνται μόνο όταν χρησιμοποιείτε αυτοκόλλητη σφράγιση για να σφραγίσετε τις πλάκες στο σύστημα AriaMx/AriaDx Real-Time PCR

Πίνακας 6 Όργανα, λογισμικό και εξοπλισμός που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Όργανο, λογισμικό ή εξοπλισμός	Μορφή
<p>Σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο</p> <ul style="list-style-type: none"> Σύστημα Agilent AriaMx Real-Time PCR (αρ. προϊόντος G8830A) ή Σύστημα AriaDx Real-Time PCR (αρ. προϊόντος K8930AA) Λογισμικό: Λογισμικό Aria έκδοση 1.71 ή 1.8 και Electronic Tracking Software (περιλαμβάνεται με τον αρ. προϊόντος K8930AA ή διατίθεται ξεχωριστά με αρ. προϊόντος G5380AA) Όργανο ABI 7500 Fast Real Time PCR με φορητό υπολογιστή (αρ. προϊόντος 4351106) ή επιτραπέζιο υπολογιστή (αρ. προϊόντος 4351107) Λογισμικό: Λογισμικό 7500 έκδοση 2.3 και Design & Analysis Software έκδοση 2.4.3 Σύστημα ανίχνευσης Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (αρ. προϊόντος 1855195) ή Σύστημα ανίχνευσης CFX96 Touch Real-Time PCR με Συσκευασία Starter (αρ. προϊόντος 1855196) Λογισμικό: Λογισμικό CFX Maestro έκδοση 2.0 4.1.2 (περιλαμβάνεται με τον αρ. προϊόντος 1855196 ή διατίθεται ξεχωριστά με αρ. προϊόντος 12004110) 	Όργανο με υπολογιστή και λογισμικό
Λογισμικό για την προβολή δεδομένων που εξάγονται από το λογισμικό PCR σε πραγματικό χρόνο, π.χ., Microsoft Excel	Λογισμικό
Αναμείκτης περιδίνησης	Εξοπλισμός
Μικροφυγόκεντρος	Εξοπλισμός
Φυγόκεντρος πλάκας για πλάκες 96 βοθρίων	Εξοπλισμός
Μικροπιπέτες P10, P20, P200 και P1000	Εξοπλισμός
Πιπέτες πολλαπλών καναλιών (5–50 μl)	Εξοπλισμός
Σχάρες για σωληνάρια μικροφυγόκεντρου	Εξοπλισμός
Δύο (2) ψυκτικές σχάρες 96 βοθρίων	Εξοπλισμός
Δοχείο με πάγο	Εξοπλισμός

Προφυλάξεις ασφαλείας

- 1 Η ροή εργασιών του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit θα πρέπει να διενεργείται από ειδικευμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό προς αποφυγή εσφαλμένων αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιείτε ξεχωριστούς χώρους για την προετοιμασία των δειγμάτων ασθενούς και των μαρτύρων για να αποφύγετε τυχόν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.
- 2 Η εξέταση έχει αδειοδοτηθεί αποκλειστικά για την ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος από τον ιό SARS-CoV-2 και όχι από άλλους ιούς ή παθογόνα.
- 3 Διαβάστε προσεκτικά όλο το κείμενο των οδηγιών χρήσης.
- 4 Τα δείγματα και οι μάρτυρες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται πάντα ως δυνητικά μολυσματικά ή/και βιολογικά επικίνδυνα υλικά σύμφωνα με τις διαδικασίες εργαστηριακής ασφάλειας. Ανατρέξτε στις προσωρινές κατευθυντήριες οδηγίες για τη βιοασφάλεια στα εργαστήρια κατά τον χειρισμό και την επεξεργασία δειγμάτων που σχετίζονται με τον νέο κορονοϊό (2019-nCoV) (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 Ακολουθείτε τις απαραίτητες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό των δειγμάτων. Χρησιμοποιείτε μέσα ατομικής προστασίας (ΜΑΠ) όπως ορίζουν οι τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες για τον χειρισμό δυνητικά μολυσματικών δειγμάτων. Σε περίπτωση υπερχείλισης, απολυμάνετε αμέσως.
- 6 Τα δείγματα ενδέχεται να είναι μολυσματικά. Χρησιμοποιείτε γενικές προφυλάξεις κατά τη διενέργεια της ανάλυσης προσδιορισμού. Ο διευθυντής εργαστηρίου οφείλει να τεκμηριώνει τον ορθό χειρισμό και τις μεθόδους απόρριψης. Μόνο επαρκώς εκπαιδευμένο προσωπικό στον χειρισμό μολυσματικών υλικών θα πρέπει να επιτρέπεται να διενεργεί τη διαγνωστική διαδικασία.
- 7 Σε περίπτωση πιθανολογούμενης λοίμωξης από τον ιό 2019-nCoV, σύμφωνα με τα τρέχοντα κλινικά κριτήρια προληπτικών ελέγχων που συνιστούν οι αρχές δημόσιας υγείας, τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται λαμβάνοντας τις κατάλληλες προφυλάξεις ελέγχου των λοιμώξεων.
- 8 Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά τον αναλώσιμο παρεχόμενο ή καθορισμένο εξοπλισμό εργαστηρίου.
- 9 Χρησιμοποιείτε πάντα ρύγχη πιπέτας με φραγμό αερολύματος. Τα ρύγχη που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι στείρα και ελεύθερα DNAσης και RNAσης.

- 10** Οι αναλύσεις προσδιορισμού που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι ευαίσθητες στην τυχαία εισαγωγή προϊόντων ενίσχυσης από προηγούμενες αντιδράσεις PCR. Τυχόν μόλυνση των δειγμάτων εξέτασης ή των αντιδραστήριων μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένο αποτέλεσμα. Η ροή εργασιών στο εργαστήριο πρέπει να είναι μονόδρομη. Χρησιμοποιείτε τις ακόλουθες βέλτιστες πρακτικές για την πρόληψη μόλυνσης από προϊόντα PCR των δειγμάτων σε όλη τη ροή εργασιών:
- Εκχωρήστε ξεχωριστούς σταθμούς εργασίας για τις διαδικασίες πριν και μετά την PCR και χρησιμοποιείτε ξεχωριστά αναλώσιμα και αντιδραστήρια αποκλειστικά για κάθε χώρο. Συγκεκριμένα, μην χρησιμοποιείτε ποτέ υλικά των διαδικασιών μετά την PCR στα στάδια της ροής εργασιών που προηγούνται της PCR. Χρησιμοποιείτε πάντα ειδικές πιπέτες για τις διαδικασίες πριν από την PCR με ελεύθερα νουκλεάσης ρύγχη ανθεκτικά στο αερόλυμα για τα διαλύματα των διαδικασιών πριν από την PCR.
 - Διατηρείτε τις επιφάνειες εργασίας καθαρές. Καθαρίζετε τις επιφάνειες των διαδικασιών πριν από την PCR καθημερινά και ανάμεσα στις αναλύσεις προσδιορισμού με διάλυμα χλωρίνης 10% ή/και προϊόντα όπως το DNAZap ή το RNase AWAY. Απομακρύνετε τα υπολείμματα χλωρίνης με αιθανόλη 70%.
 - Φοράτε καθαρή εργαστηριακή ποδιά και καθαρά γάντια χωρίς πούδρα. Τηρείτε ορθές πρακτικές υγιεινής εργαστηρίου όπως αλλάζοντας γάντια ύστερα από την επαφή με οποιοσδήποτε δυνητικά μολυσμένες επιφάνειες.
 - Αλλάζετε ρύγχη πιπέτας με φραγμό αερολύματος σε όλες τις μεταφορές υγρών που διενεργούνται με το χέρι.
 - Κατά την εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος από δείγματα χρησιμοποιείτε ορθή άσηπτη τεχνική για να ελαχιστοποιείτε τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης ανάμεσα στα δείγματα και να αποφεύγετε την ακούσια εισαγωγή νουκλεασών στα δείγματα.
 - Όταν είναι εφικτό, διατηρείτε τα αντιδραστήρια και τα σωληνάρια αντίδρασης με τοποθετημένα πώματα ή καλυμμένα.
- 11** Μην τρώτε, μην πίνετε, μην καπνίζετε και μην εφαρμόζετε καλλυντικά προϊόντα στους χώρους εργασίας.
- 12** Δεν επιτρέπονται τροποποιήσεις στα αντιδραστήρια της ανάλυσης προσδιορισμού, στο πρωτόκολλο της ανάλυσης προσδιορισμού ή στο όργανο.
- 13** Τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται και να υποβάλλονται σε χειρισμό όπως ορίζει ο **Πίνακας 2** στη σελίδα 11 και η ενότητα **«Φύλαξη και χειρισμός»** στη σελίδα 17.
- 14** Μην χρησιμοποιείτε το κιτ μετά από την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.
- 15** Απορρίπτετε τα απόβλητα σύμφωνα με τους τοπικούς, πολιτειακούς και ομοσπονδιακούς κανονισμούς.
- 16** Δελτία δεδομένων ασφαλείας διατίθενται στη διεύθυνση www.agilent.com.
- 17** Μην χρησιμοποιείτε υλικό που ενδέχεται να περιέχει θειοκυανική γουανιδίνη ή οποιοδήποτε υλικό περιέχει γουανιδίνη στο όργανο PCR σε πραγματικό χρόνο. Ενδέχεται να σχηματιστούν εξαιρετικά δραστικές ή/και τοξικές ενώσεις αν συνδυαστούν με υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη).
- 18** Τα θετικά αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της παρουσίας RNA του ιού SARS-CoV-2.

Φύλαξη και χειρισμός

Συσκευασία προϊόντος

Με την παραλαβή του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit επιθεωρήστε προσεκτικά το κουτί του προϊόντος για εμφανή σημάδια φθοράς. Αν εντοπίσετε φθορά στο κουτί του προϊόντος, επικοινωνήστε με την τεχνική υποστήριξη της Agilent.

Φύλαξη, χειρισμός και σταθερότητα των αντιδραστηρίων

- Ελέγχετε πάντα την ημερομηνία λήξης πριν από τη χρήση. Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια που έχουν λήξει.
- Προστατεύετε τους ιχνηθέτες φθορισμού από το φως.
- Οι εκκινητές, οι ιχνηθέτες (συμπεριλαμβανομένων των υποπολλαπλάσιων δειγμάτων) και το κύριο μείγμα ενζύμων πρέπει να αποψύχονται και να διατηρούνται πάντα σε πάγο ή σε ψυκτική σχάρα κατά την προετοιμασία και τη χρήση.
- Οι μάρτυρες πρέπει να αποψύχονται και να διατηρούνται πάντα σε πάγο ή σε ψυκτική σχάρα κατά την προετοιμασία και τη χρήση.
- Ο **Πίνακας 2** στη σελίδα 11 παραθέτει τις θερμοκρασίες φύλαξης των αντιδραστηρίων του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Συλλογή, χειρισμός και φύλαξη των δειγμάτων

Η ανεπαρκής ή ακατάλληλη συλλογή, φύλαξη και μεταφορά δειγμάτων είναι πιθανό να παράσχει ψευδή αποτελέσματα εξέτασης. Συνιστάται ιδιαίτερα η εκπαίδευση στη συλλογή δειγμάτων λόγω της σπουδαιότητας της ποιότητας των δειγμάτων. Το έγγραφο CLSI MM13-A αποτελεί μια ορθή πηγή αναφοράς.

- Συλλογή του δείγματος
 - Ανατρέξτε στις προσωρινές κατευθυντήριες οδηγίες για τη συλλογή, τον χειρισμό και την εξέταση κλινικών δειγμάτων από ασθενείς υπό διερεύνηση για τον νέο κορονοϊό 2019 (2019-nCoV) (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>
 - Ανατρέξτε στις οδηγίες του κατασκευαστή του μέσου συλλογής δείγματος για τις σωστές μεθόδους συλλογής.
- Μεταφορά δειγμάτων
 - Το κλινικό υλικό που συλλέγεται από ασθενείς τοποθετείται σε κατάλληλο σύστημα μεταφοράς. Αναφορικά με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit τα ρινοφαρυγγικά (NP) δείγματα τοποθετούνται σε μέσο μεταφοράς ιογενούς υλικού (VTM), μέσο μεταφοράς γενικής χρήσης (UTM), φυσιολογικό ορό, Amies με υγρό ή μέσο μεταφοράς δείγματος (STM).

3 Οδηγίες για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων

Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων **19**

Το κεφάλαιο αυτό περιλαμβάνει οδηγίες για την εκχύλιση RNA από δείγματα κλινικής εξέτασης και μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος.

Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων

Η απόδοση του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit εξαρτάται από την ποσότητα και ποιότητα του αρχικού RNA από ανθρώπινα δείγματα που υποβάλλεται σε καθαρισμό. Τα εμπορικά διαθέσιμα κιτ και οι εμπορικά διαθέσιμες διαδικασίες εκχύλισης RNA που ακολουθούν έχουν πιστοποιηθεί και επικυρωθεί για την ανάκτηση και τον καθαρισμό RNA για χρήση με το κιτ.

Στην εκχύλιση δείγματος πρέπει να τηρούνται οι συνιστώμενες διαδικασίες του κατασκευαστή (με εξαίρεση τις παρακάτω συγκεκριμένες συστάσεις). Σε κάθε παρτίδα εκχύλισης πρέπει να περιλαμβάνεται μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος.

QIAGEN QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, πρωτόκολλο αυτοματοποίησης

Σύσταση: Χρησιμοποιήστε 140 μl του δείγματος και εκτελέστε έκλουση με 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος.

MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, πρωτόκολλο αυτοματοποίησης

Σύσταση: Χρησιμοποιήστε 200 μl του δείγματος και εκτελέστε έκλουση με 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος.

4

Οδηγίες για την προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR

Ρύθμιση του πειράματος qRT-PCR στο σύστημα Real-Time PCR **21**

Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR **42**

Το κεφάλαιο αυτό περιλαμβάνει οδηγίες για την προετοιμασία των αντιδράσεων ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) για δείγματα εξέτασης και δείγματα μάρτυρα.

Ρύθμιση του πειράματος qRT-PCR στο σύστημα Real-Time PCR

Πριν προετοιμάσετε την πλάκα αντίδρασης qRT-PCR, ρυθμίστε το πείραμα στο σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο ώστε το όργανο να είναι έτοιμο να διενεργήσει την εκτέλεση μόλις ετοιμαστεί η πλάκα αντίδρασης.

Ακολουθήστε τις συγκεκριμένες οδηγίες που αφορούν το σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο που χρησιμοποιείτε.

Σύστημα Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR

- Ανατρέξτε στην ενότητα **«Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος AriaMx/AriaDx (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχει δημιουργηθεί ήδη ένα πρότυπο)»** στη σελίδα 22 αν δεν έχετε αρχείο προτύπου με τις απαραίτητες ρυθμίσεις.
- Αν έχετε αρχείο προτύπου που μπορείτε να χρησιμοποιήσετε, ανατρέξτε στην ενότητα **«Δημιουργία πειράματος AriaMx/AriaDx από αποθηκευμένο πρότυπο»** στη σελίδα 27.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Ενεργοποιήστε το όργανο AriaMx ή το AriaDx τουλάχιστον 3 ώρες πριν από τη χρήση. Το όργανο μπορεί να παραμένει ενεργοποιημένο συνεχώς για να διασφαλίζεται ότι είναι έτοιμο για χρήση ανά πάσα στιγμή.

Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του οργάνου, οι συνθήκες λειτουργίας είναι θερμοκρασία 20–30 °C, υγρασία 20–80% και υψόμετρο ≤2.000 μέτρα.

Όργανο ABI 7500 Fast Real Time PCR

- Ανατρέξτε στην ενότητα **«Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος ABI 7500 Fast (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχει δημιουργηθεί ήδη ένα πρότυπο)»** στη σελίδα 28 αν δεν έχετε αρχείο προτύπου με τις απαραίτητες ρυθμίσεις.
- Αν έχετε αρχείο προτύπου που μπορείτε να χρησιμοποιήσετε, ανατρέξτε στην ενότητα **«Δημιουργία πειράματος ABI 7500 Fast από αποθηκευμένο πρότυπο»** στη σελίδα 34.

Σύστημα ανίχνευσης Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR

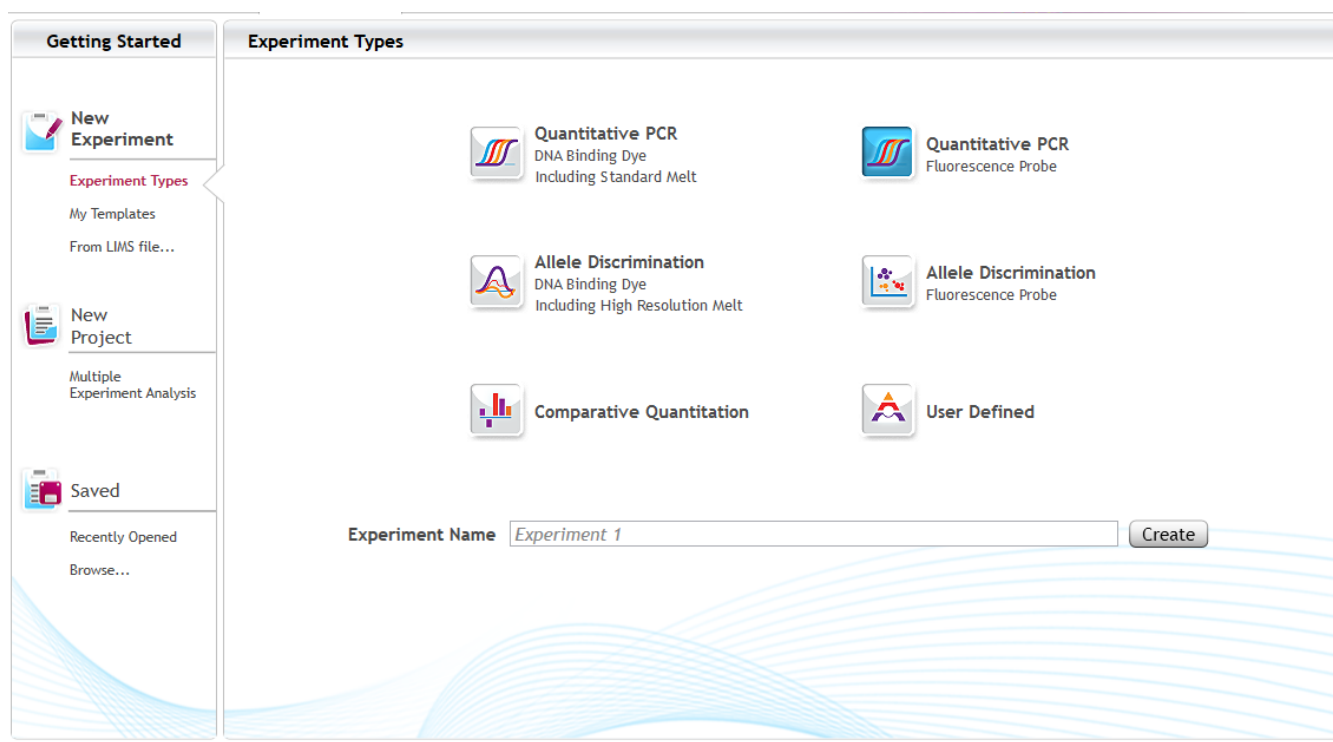
- Ανατρέξτε στην ενότητα **«Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχουν δημιουργηθεί και αποθηκευτεί το πρωτόκολλο και τα αρχεία πλάκας)»** στη σελίδα 35 αν δεν έχετε αποθηκευμένα αρχεία πρωτοκόλλου και πλάκας με τις απαραίτητες ρυθμίσεις.
- Αν έχετε αποθηκευμένα αρχεία πρωτοκόλλου και πλάκας, ανατρέξτε στην ενότητα **«Δημιουργία πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR από αποθηκευμένο αρχείο πρωτοκόλλου και αρχείο πλάκας»** στη σελίδα 41.

Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος AriaMx/AriaDx (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχει δημιουργηθεί ήδη ένα πρότυπο)

Αν υπάρχει ήδη πρότυπο για το πείραμα, μεταβείτε στην ενότητα «**Δημιουργία πειράματος AriaMx/AriaDx από αποθηκευμένο πρότυπο**» στη σελίδα 27.

Βήμα 1. Δημιουργήστε το πείραμα

- 1 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο, ανοίξτε την εφαρμογή λογισμικού Aria στην οθόνη Getting Started.
- 2 Στην ενότητα **New Experiment**, κάντε κλικ στο **Experiment Types** (αν δεν είναι ήδη επιλεγμένο).
- 3 Στο κέντρο της οθόνης, επιλέξτε **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2**.



Σχήμα 2 Οθόνη Getting Started της εφαρμογής Aria – με επιλεγμένο το στοιχείο **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**

- 4 Πληκτρολογήστε όνομα για το πείραμα στο πεδίο Experiment Name και κάντε κλικ στο **Create**.

Το νέο πείραμα ανοίγει στην οθόνη Plate Setup. Όλα τα βοηθία στον χάρτη πλάκας επιλέγονται από προεπιλογή.

Η επιλογή και των 96 βοηθίων είναι ορθή αν όλα τα βοηθία της πλάκας θα περιλαμβάνουν αντίδραση qRT-PCR. Αν κάποια από τα βοηθία της πλάκας θα είναι κενά, αποεπιλέξτε τα συγκεκριμένα βοηθία σε αυτό το βήμα.

Βήμα 2. Αντιστοιχίστε τους τύπους και τα ονόματα των βοθρίων

- 5 Στο παράθυρο Properties στη δεξιά πλευρά της οθόνης, ανοίξτε την αναπτυσσόμενη λίστα **Well type** και επιλέξτε **Unknown**.

Όλα τα βοθρία επισημαίνονται με την ένδειξη Unknown στον χάρτη πλάκας.

- 6 Αντιστοιχίστε το βοθρίο A12 στον αρνητικό μάρτυρα (NTC).
- Κάντε κλικ στο βοθρίο A12 στον χάρτη πλάκας για να επιλέξετε το συγκεκριμένο βοθρίο.
 - Στο παράθυρο Properties στη δεξιά πλευρά της οθόνης, ανοίξτε την αναπτυσσόμενη λίστα **Well type** και επιλέξτε **NTC**.

Το βοθρίο A12 επισημαίνεται με την ένδειξη NTC στον χάρτη πλάκας, ενώ όλα τα υπόλοιπα βοθρία παραμένουν με αντιστοίχιση Unknown ως τύπο βοθρίου.

- 7 Στον χάρτη πλάκας επιλέξτε ξανά όλα τα βοθρία.

Κάντε κλικ στο πλαίσιο ελέγχου στην πάνω αριστερή γωνία του χάρτη πλάκας για να επιλέξετε όλα τα βοθρία.

Η ρύθμιση της πλάκας εμφανίζεται πλέον όπως στο **Σχήμα 3**.

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

Σχήμα 3 Αντιστοιχίσεις τύπου βοθρίου στην οθόνη Plate Setup της εφαρμογής Aria

- 8 Αντιστοιχίστε ονόματα βοθρίων στα βοθρία μάρτυρα και, αν θέλετε, στα βοθρία που χρησιμοποιούνται για δείγματα εξέτασης. Τα ονόματα βοθρίων που αντιστοιχίζονται στα βοθρία μάρτυρα αναφέρει ο **Πίνακας 7**. Μπορείτε να αντιστοιχίσετε ονόματα βοθρίων χειροκίνητα ή εισάγοντας ένα αρχείο Excel ή ένα αρχείο κειμένου διαχωρισμένο με κόμματα που περιέχει τα αναγνωριστικά βοθρίων μαζί με τα αντιστοιχισμένα ονόματα βοθρίων.
- Για να αντιστοιχίσετε ονόματα βοθρίων χειροκίνητα, αλλάξτε τη ρύθμιση Show από **Type** σε **Name**. Επιλέξτε το βοθρίο ή τα βοθρία στην πλάκα και πληκτρολογήστε το όνομα για το επιλεγμένο βοθρίο ή τα βοθρία στο πεδίο Well Name.
 - Για να αντιστοιχίσετε ονόματα βοθρίων από αρχείο Excel ή αρχείο κειμένου, κάντε δεξί κλικ στον χάρτη πλάκας και επιλέξτε **Import Well Name**. Στο πλαίσιο διαλόγου που ανοίγει, επιλέξτε το αρχείο Excel ή το αρχείο κειμένου. Για τις προδιαγραφές που αφορούν τη μορφοποίηση του αρχείου, ανατρέξτε στη βοήθεια του συστήματος Aria.

Πίνακας 7 Αντιστοιχίσεις ονομάτων βοθρίων για τα βοθρία μάρτυρα

ID βοθρίου	Όνομα βοθρίου
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pos

* Αν έχετε πολλά δείγματα μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος που πρέπει να συμπεριληφθούν στην πλάκα, χρησιμοποιήστε πρόσθετα βοθρία στη στήλη 12 για τις συγκεκριμένες αντιδράσεις και ονομάστε τα βοθρία αντίστοιχα (π.χ., HSC1, HSC2 κ.λπ.).

Βήμα 3. Αντιστοιχίστε χρωστικές και στόχους

- 9 Στο παράθυρο Properties, στην ενότητα **Add Dyes**, επιλέξτε τα πλαίσια ελέγχου FAM, HEX και Cy5.

Εμφανίζονται χρωματικά κωδικοποιημένες κουκκίδες για κάθε επισημασμένη χρωστική σε όλα τα βοθρία του χάρτη πλάκας.

- 10 Στην αναπτυσσόμενη λίστα Reference Dye επιλέξτε **ROX**.

Εμφανίζεται μια χρωματικά κωδικοποιημένη κουκκίδα με την ένδειξη «R» σε όλα τα βοθρία του χάρτη πλάκας.

- 11 Κάντε κλικ στην αιχμή βέλους ► δίπλα στο στοιχείο **Targets**.

- 12 Στα πεδία Target Name που εμφανίζονται, πληκτρολογήστε ονόματα στόχων σύμφωνα με το **Σχήμα 4**.

Add Dyes		Targets
Use	Dye Name	Target Name
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM	N1
<input checked="" type="checkbox"/>	ROX	
<input checked="" type="checkbox"/>	HEX	N2
<input checked="" type="checkbox"/>	CY5	RP
<input type="checkbox"/>	CY3	
<input type="checkbox"/>	ATTO425	
Reference Dye		ROX

Σχήμα 4 Αντιστοιχίσεις χρωστικών και στόχων στην οθόνη Plate Setup της εφαρμογής Aria

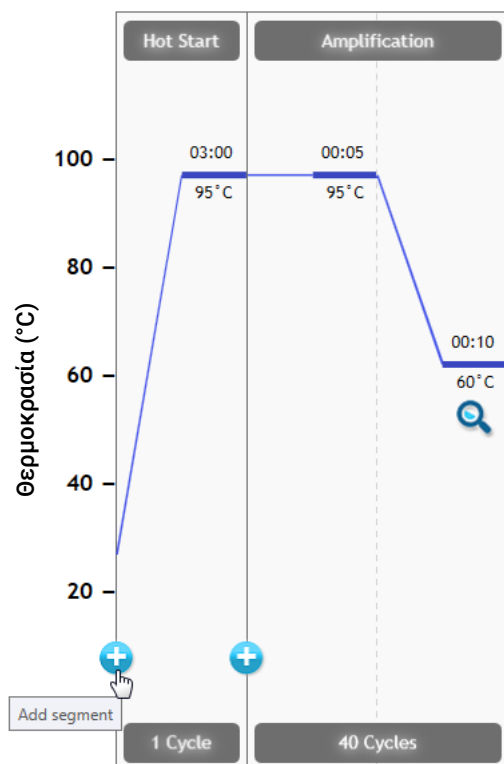
Βήμα 4. Ρυθμίστε το θερμικό προφίλ

13 Στην αριστερή πλευρά της οθόνης, στην ενότητα **Set Up**, κάντε κλικ στο **Thermal Profile**.

Ανοίγει η οθόνη Thermal Profile εμφανίζοντας το προεπιλεγμένο θερμικό προφίλ.

14 Προσθέστε τμήμα RT στην έναρξη του προγράμματος κύκλων.

- Στην οθόνη, μετακινήστε τον δείκτη πάνω στο τμήμα Hot Start. Κάντε κλικ στο εικονίδιο + (όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5**) που εμφανίζεται στην αριστερή πλευρά του τμήματος Hot Start.

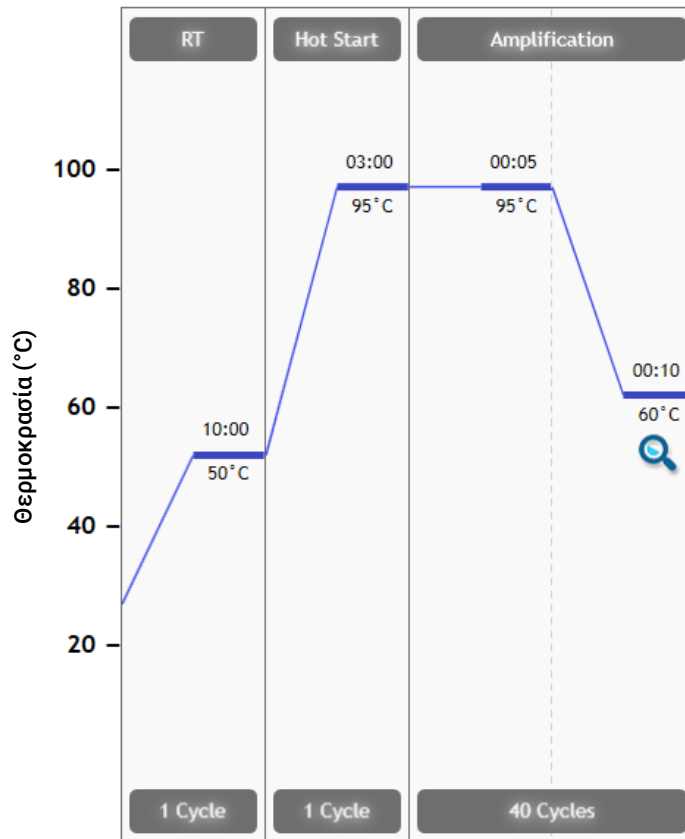


Σχήμα 5 Προσθήκη νέου τμήματος στην οθόνη Thermal Profile της εφαρμογής Aria

Το πρόγραμμα ανοίγει μια κράτηση θέσης για το νέο τμήμα, παραθέτοντας τους διαθέσιμους τύπους τμήματος.

b Στο τμήμα κράτησης θέσης, κάντε κλικ στο **RT**.

Το θερμικό προφίλ εμφανίζεται πλέον όπως στο **Σχήμα 6**.



Σχήμα 6 Το θερμικό προφίλ στην οθόνη Thermal Profile της εφαρμογής Aria

15 Βεβαιωθείτε ότι το θερμικό προφίλ στην οθόνη σας αντιστοιχεί στο πρόγραμμα θερμικών κύκλων που περιλαμβάνει ο **Πίνακας 8**.

Πίνακας 8 Πρόγραμμα θερμικών κύκλων για το σύστημα AriaMx/AriaDx Real-Time PCR

Αριθμός τμήματος	Αριθμός κύκλων	Διάρκεια	Θερμοκρασία
1	1	10 λεπτά	50 °C
2	1	3 λεπτά	95 °C
3	40	5 δευτερόλεπτα	95 °C
		10 δευτερόλεπτα	60 °C

Βήμα 5. Αποθηκεύστε το πείραμα ως πρότυπο

16 Επιλέξτε **File > Save As Template**.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Save As. Ο τύπος αρχείου έχει οριστεί ως **AriaMx Template Files** (επέκταση αρχείου *amxt*) ή **AriaDx Template Files** (επέκταση αρχείου *adxt*).

17 Επιλέξτε φάκελο για το νέο πρότυπο.

18 Στο πεδίο File name, πληκτρολογήστε **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

19 Κάντε κλικ στο **Save**.

Το πλαίσιο διαλόγου κλείνει και το πρόγραμμα αποθηκεύει το νέο αρχείο προτύπου στον φάκελο που επιλέξατε.

Στις μελλοντικές αναλύσεις προσδιορισμού χρησιμοποιήστε το αποθηκευμένο πρότυπο για να δημιουργήσετε και να ρυθμίσετε το πείραμα qRT-PCR όπως περιγράφεται στην ενότητα «**Δημιουργία πειράματος AriaMx/AriaDx από αποθηκευμένο πρότυπο**».

Σε αυτό το σημείο μπορείτε να συνεχίσετε στην ενότητα «**Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR**» στη σελίδα 42.

Δημιουργία πειράματος AriaMx/AriaDx από αποθηκευμένο πρότυπο

Αν δεν έχει δημιουργηθεί πρότυπο του πειράματος με την απαιτούμενη ρύθμιση πλάκας και το απαιτούμενο θερμικό προφίλ, ανατρέξτε στην ενότητα «**Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος AriaMx/AriaDx (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχει δημιουργηθεί ήδη ένα πρότυπο)**» στη σελίδα 22.

1 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο, ανοίξτε την εφαρμογή λογισμικού Aria στην οθόνη Getting Started.

2 Στην ενότητα **New Experiment**, κάντε κλικ στο **My Templates**.

3 Στο πεδίο Experiment Name, πληκτρολογήστε ένα όνομα για το νέο πείραμα.

4 Επιλέξτε το πρότυπο **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** και δημιουργήστε το πείραμα.

- Αν το πρότυπο βρίσκεται στον προεπιλεγμένο φάκελο, κάντε κλικ απευθείας στο πρότυπο για να το επιλέξετε και ύστερα κάντε κλικ στην επιλογή **Create** (ή διπλό κλικ απευθείας στο πρότυπο). Το πρόγραμμα δημιουργεί το νέο πείραμα και ανοίγει το πείραμα στην οθόνη Plate Setup.
- Αν το πρόγραμμα δεν βρίσκεται στον τρέχοντα επιλεγμένο φάκελο, κάντε κλικ στο εικονίδιο **Browse to Template** (που φαίνεται παρακάτω) για να ανοίξετε το παράθυρο αναζήτησης. Περιηγηθείτε στον φάκελο που περιέχει το αρχείο προτύπου **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**. Επιλέξτε το αρχείο και κάντε κλικ στην επιλογή **Open**. Το πρόγραμμα δημιουργεί το νέο πείραμα και ανοίγει το πείραμα στην οθόνη Plate Setup.



Σε αυτό το σημείο μπορείτε να συνεχίσετε στην ενότητα «**Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR**» στη σελίδα 42.

Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος ABI 7500 Fast (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχει δημιουργηθεί ήδη ένα πρότυπο)

Αν υπάρχει ήδη πρότυπο για το πείραμα, μεταβείτε στην ενότητα «**Δημιουργία πειράματος ABI 7500 Fast από αποθηκευμένο πρότυπο**» στη σελίδα 34.

Βήμα 1. Δημιουργήστε το πείραμα

- 1 Ενεργοποιήστε το όργανο ABI 7500 Fast.
- 2 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο, ανοίξτε την εφαρμογή λογισμικού του συστήματος 7500.
- 3 Στην οθόνη Home, στην ενότητα **Set Up**, κάντε κλικ στο **Advanced Setup**.
Ανοίγει η οθόνη Experiment.
- 4 Στο **Experiment Menu** στην αριστερή πλευρά της οθόνης, στην ενότητα **Setup**, κάντε κλικ στο **Experiment Properties** (αν δεν είναι ήδη επιλεγμένο).
Οι ρυθμίσεις Experiment Properties εμφανίζονται στο κέντρο της οθόνης.
- 5 Απαντήστε στις ερωτήσεις στην οθόνη χρησιμοποιώντας τις επιλογές και τις καταχωρήσεις που περιλαμβάνει ο **Πίνακας 9**.

Πίνακας 9 Ρυθμίσεις Experiment Properties

Ερώτηση	Επιλογές/Καταχωρήσεις
How do you want to identify this experiment? (Ποια στοιχεία ταυτοποίησης θα ορίσετε για το πείραμα;)	<ul style="list-style-type: none">• Experiment Name: Πληκτρολογήστε ένα μοναδικό όνομα για το πείραμα• Barcode: Αφήστε το πεδίο κενό• User Name: Πληκτρολογήστε το όνομά σας• Comments: Πληκτρολογήστε τα σχόλια που θέλετε ή αφήστε το πεδίο κενό
Which instrument are you using to run the experiment? (Ποιο όργανο θα χρησιμοποιήσετε για την εκτέλεση του πειράματος;)	7500 Fast (96 Wells)
What type of experiment do you want to set up? (Τι είδος πειράματος θα δημιουργήσετε;)	Quantitation – Standard Curve
Which reagents do you want to use to detect the target sequence? (Ποια αντιδραστήρια θα χρησιμοποιήσετε για την ανίχνευση της αλληλουχίας-στόχου;)	TaqMan® Reagents
Which ramp speed do you want to use in the instrument run? (Ποια ταχύτητα αυξομείωσης θα χρησιμοποιήσετε στο όργανο για την εκτέλεση;)	Fast

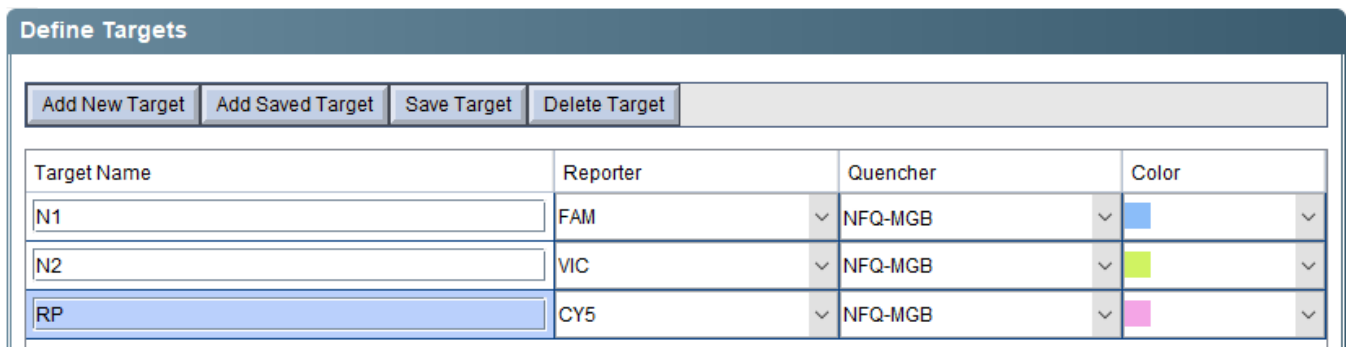
Βήμα 2. Καθορίστε τους στόχους και τα δείγματα

- 6 Στο **Experiment Menu** στην αριστερή πλευρά της οθόνης, στην ενότητα **Setup**, επιλέξτε **Plate Setup**. Βεβαιωθείτε ότι η καρτέλα **Define Targets and Samples** είναι επιλεγμένη στο πάνω μέρος.

Τα εργαλεία για τον καθορισμό των στόχων και των δειγμάτων εμφανίζονται στο κέντρο της οθόνης.

- 7 Στον πίνακα Define Targets, δημιουργήστε στόχους για τα N1, N2 και RP όπως φαίνεται στο **Σχήμα 7**. Κάντε κλικ στο στοιχείο **Add New Target** για να προσθέσετε γραμμή στον πίνακα, εφόσον χρειάζεται.

Στο στοιχείο **Quencher** επιλέξτε **NFQ-MGB** για όλους τους στόχους. Στο στοιχείο **Color** χρησιμοποιήστε την προεπιλογή ή επιλέξτε το χρώμα που θέλετε.



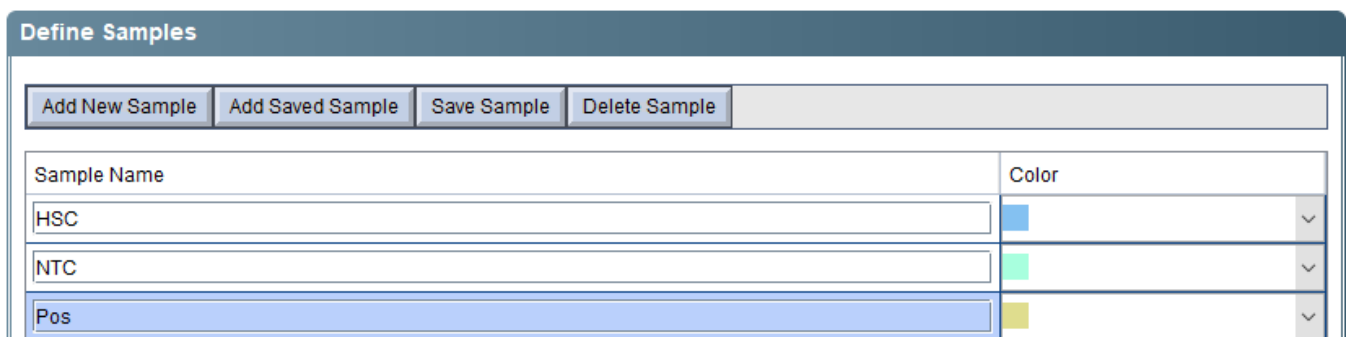
Target Name	Reporter	Quencher	Color
N1	FAM	NFQ-MGB	Blue
N2	VIC	NFQ-MGB	Green
RP	CY5	NFQ-MGB	Pink

Σχήμα 7 Καθορισμός στόχων στην οθόνη Plate Setup του λογισμικού 7500

- 8 Στον πίνακα Define Samples δημιουργήστε ονόματα δειγμάτων όπως φαίνεται στο **Σχήμα 8**. Κάντε κλικ στο στοιχείο **Add New Sample** για να προσθέσετε γραμμή στον πίνακα, εφόσον χρειάζεται.

Τα τρία δείγματα είναι ο μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος (**HSC**), ο αρνητικός μάρτυρας (no template control) (**NTC**) και ο θετικός μάρτυρας (**Pos**) με θετικό μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2. Λάβετε υπόψη ότι στα δείγματα εξέτασης δεν αντιστοιχίζεται όνομα δείγματος.

Στο στοιχείο **Color** χρησιμοποιήστε την προεπιλογή ή επιλέξτε το χρώμα που θέλετε.



Sample Name	Color
HSC	Blue
NTC	Green
Pos	Yellow

Σχήμα 8 Καθορισμός δειγμάτων στην οθόνη Plate Setup του λογισμικού 7500

Βήμα 3. Αντιστοιχίστε τους στόχους και τις εργασίες

- 9 Στο πάνω μέρος της οθόνης, κάντε κλικ στην καρτέλα **Assign Targets and Samples**. Βεβαιωθείτε ότι είναι επιλεγμένη η καρτέλα **View Plate Layout**.

Η οθόνη εμφανίζει τον χάρτη της πλάκας 96 βοθρίων.

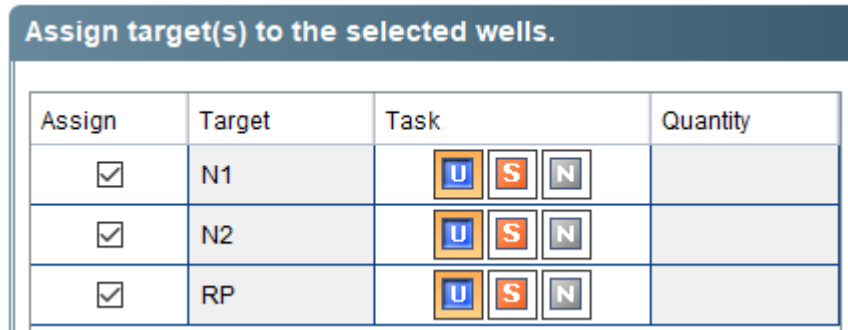
- 10 Στον χάρτη πλάκας επιλέξτε και τα 96 βοθρία.

Τα επιλεγμένα βοθρία επισημαίνονται με μπλε χρώμα και ένα λευκό οβάλ στο κέντρο.

Η επιλογή και των 96 βοθρίων είναι ορθή αν όλα τα βοθρία της πλάκας θα περιλαμβάνουν αντίδραση qRT-PCR. Αν κάποια από τα βοθρία της πλάκας θα είναι κενά, μην επιλέξετε τα συγκεκριμένα βοθρία σε αυτό το βήμα.

- 11 Στον πίνακα στην ενότητα **Assign target(s) to the selected wells**, επιλέξτε και τα τρία πλαίσια ελέγχου στη στήλη Assign για να δηλώσετε ότι και οι τρεις στόχοι θα παρακολουθούνται και θα αναφέρονται σε όλα τα βοθρία. Στη στήλη Task βεβαιωθείτε ότι έχετε επιλέξει «U» και για τους τρεις στόχους. Ανατρέξτε στο **Σχήμα 9**.

Ο χάρτης πλάκας εμφανίζει ένα σύμβολο για κάθε στόχο και στα 96 βοθρία.



Assign	Target	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	N1	U S N	
<input checked="" type="checkbox"/>	N2	U S N	
<input checked="" type="checkbox"/>	RP	U S N	

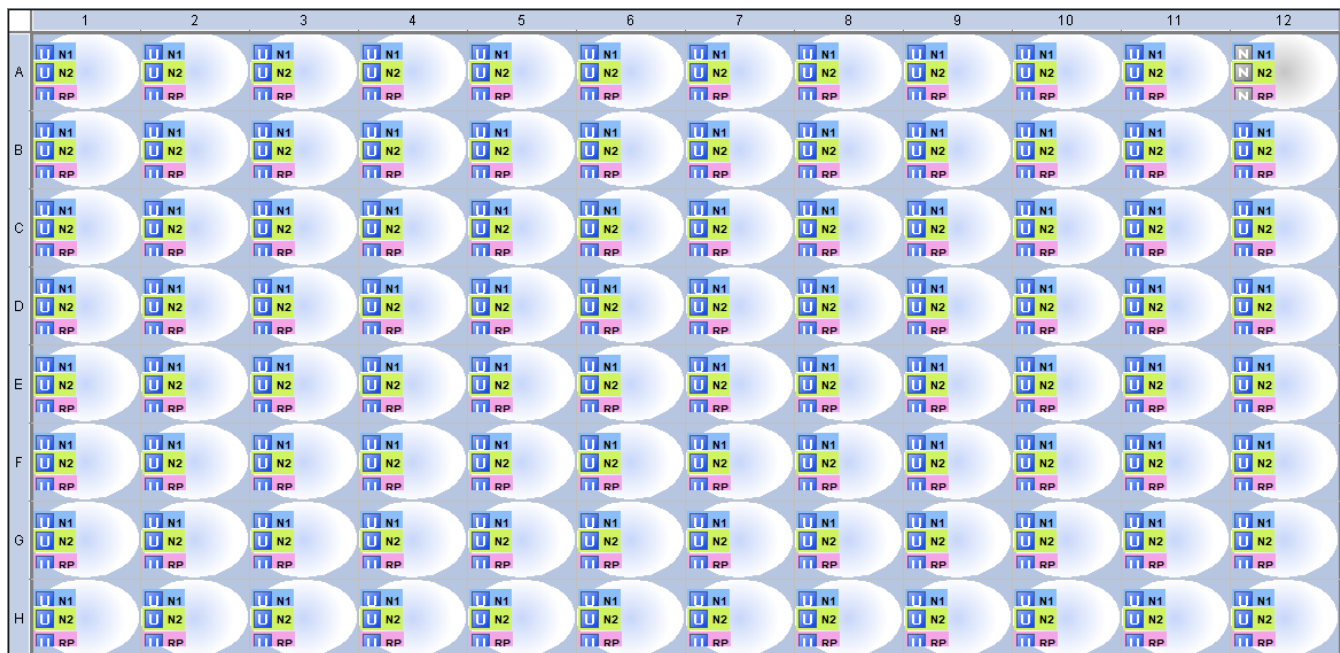
Σχήμα 9 Αντιστοιχίσεις στόχων στην καρτέλα View Plate Layout του λογισμικού 7500

- 12 Αλλάξτε την αντιστοιχισμένη εργασία για το βοθρίο αρνητικού μάρτυρα (no template control).

a Στον χάρτη πλάκας επιλέξτε το βοθρίο A12.

b Στον πίνακα στην ενότητα **Assign target(s) to the selected wells**, αλλάξτε την επιλογή στη στήλη Task σε «N» και για τους τρεις στόχους. Βεβαιωθείτε ότι τα πλαίσια ελέγχου στη στήλη Assign παραμένουν επιλεγμένα.

Ο χάρτης πλάκας εμφανίζεται πλέον όπως στο **Σχήμα 10**.



Σχήμα 10 Χάρτης πλάκας στην οθόνη Plate Setup του συστήματος 7500

Βήμα 4. Αντιστοιχίστε δείγματα μάρτυρα

13 Αντιστοιχίστε τον αρνητικό μάρτυρα (no template control) στο βοθρίο A12.

- Επιλέξτε το βοθρίο A12 στον χάρτη πλάκας.
- Στον πίνακα στην ενότητα **Assign sample(s) to the selected wells**, επιλέξτε **NTC**.

Το όνομα δείγματος NTC εμφανίζεται στο επιλεγμένο βοθρίο.

14 Αντιστοιχίστε τον μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος στο βοθρίο B12.

- Επιλέξτε το βοθρίο B12 στον χάρτη πλάκας.

Αν έχετε πολλά δείγματα μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος που πρέπει να συμπεριληφθούν στην πλάκα, επιλέξτε τον απαραίτητο αριθμό πρόσθετων βοθρίων στη στήλη 12 του χάρτη πλάκας.

- Στον πίνακα στην ενότητα **Assign sample(s) to the selected wells**, επιλέξτε **HSC**.

Το όνομα δείγματος HSC εμφανίζεται στο επιλεγμένο βοθρίο ή τα επιλεγμένα βοθρία.

15 Αντιστοιχίστε το δείγμα θετικού μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 στο βοθρίο H12.

- Επιλέξτε το βοθρίο H12 στον χάρτη πλάκας.
- Στον πίνακα στην ενότητα **Assign sample(s) to the selected wells**, επιλέξτε **Pos**.

Το όνομα δείγματος Pos εμφανίζεται στο επιλεγμένο βοθρίο.

Βήμα 5. Αντιστοιχίστε τη χρωστική αναφοράς

16 Στον πίνακα στην ενότητα **Select the dye to use as the passive reference**, επιλέξτε **ROX**.

Βήμα 6. Ρυθμίστε τη μέθοδο εκτέλεσης

17 Στο **Experiment Menu** στην αριστερή πλευρά της οθόνης, στην ενότητα **Setup**, κάντε κλικ στο **Run Method**. Κάντε κλικ στην καρτέλα **Tabular View** στο πάνω μέρος.

Τα εργαλεία για τον καθορισμό του όγκου αντίδρασης και του θερμικού προφίλ εμφανίζονται στο κέντρο της οθόνης.

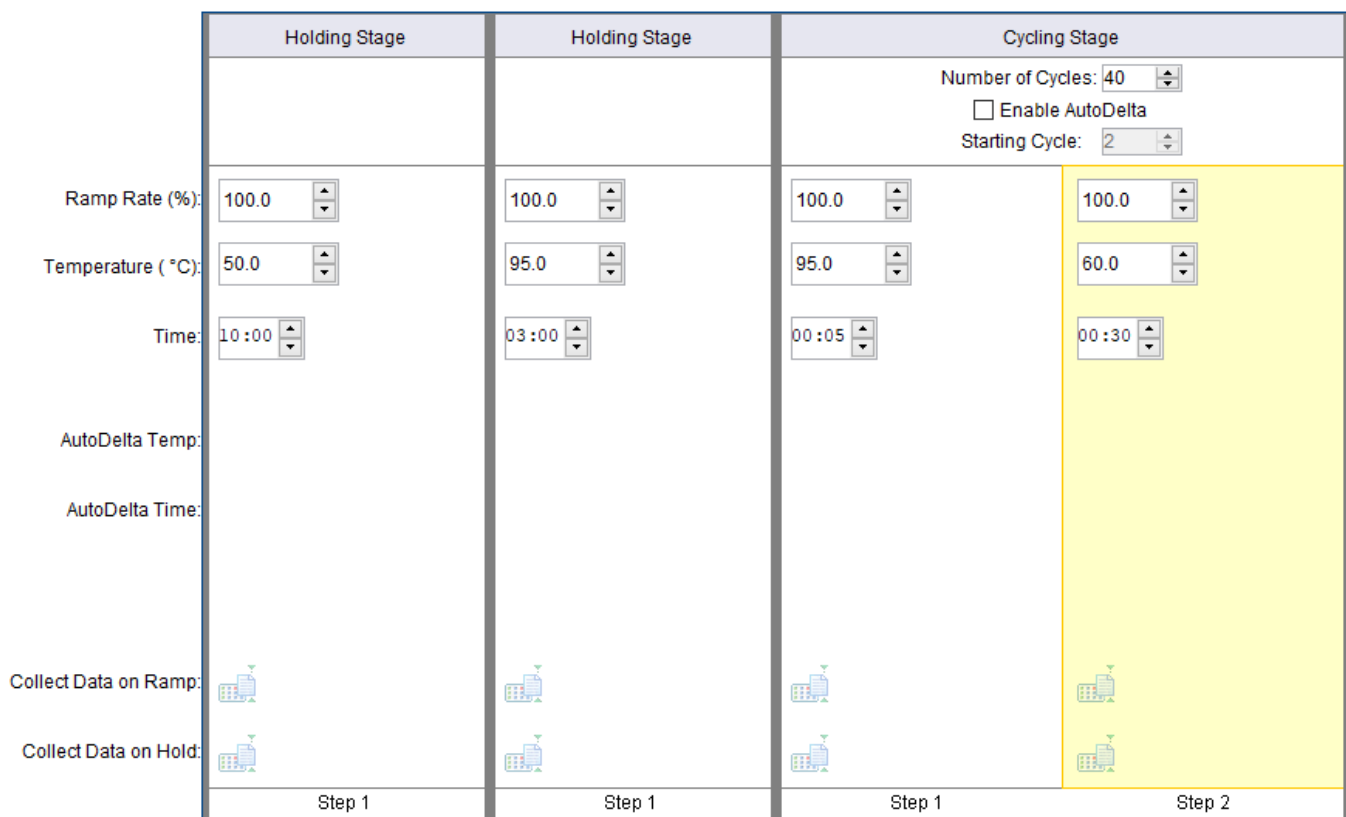
18 Βεβαιωθείτε ότι το πεδίο **Reaction Volume Per Well** έχει οριστεί σε 20 μl. Σε διαφορετική περίπτωση, πληκτρολογήστε **20** στο πεδίο.

19 Προσαρμόστε το θερμικό προφίλ ώστε να αντιστοιχεί σε εκείνο στο **Σχήμα 11**. Τις ρυθμίσεις συνοψίζει επίσης ο **Πίνακας 10**.

Αν πρέπει να προσθέσετε ένα νέο στάδιο σταθεροποίησης στην αρχή του θερμικού προφίλ στο βήμα αντίστροφης μεταγραφάσης 50 °C ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα.

- Επιλέξτε το στάδιο στο αριστερό άκρο της εικόνας θερμικού προφίλ.
- Επιλέξτε **Add Stage > Holding**.

Προστίθεται ένα νέο στάδιο σταθεροποίησης στην αρχή του θερμικού προφίλ. Προσαρμόστε τη θερμοκρασία και τη διάρκεια ώστε να αντιστοιχούν σε εκείνες στο **Σχήμα 11**.



Σχήμα 11 Θερμικό προφίλ στην οθόνη Run Method του λογισμικού 7500

Πίνακας 10 Ρυθμίσεις θερμικού προφίλ για το όργανο 7500 Fast Real Time PCR

Αριθμός τμήματος	Αριθμός κύκλων	Διάρκεια	Θερμοκρασία
1	1	10 λεπτά	50 °C
2	1	3 λεπτά	95 °C
3	40	5 δευτερόλεπτα	95 °C
		30 δευτερόλεπτα	60 °C

Βήμα 7. Αποθηκεύστε το πείραμα

20 Στο πάνω μέρος της οθόνης, κάντε κλικ στην αιχμή κάτω βέλους δίπλα στο κουμπί **Save** για να επεκτείνετε το μενού των επιλογών αποθήκευσης.

21 Επιλέξτε **Save As** στο μενού.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Save As.

22 Επιλέξτε φάκελο για το νέο αρχείο πειράματος.

23 Στο πεδίο File name, πληκτρολογήστε ένα όνομα για το πείραμα.

24 Βεβαιωθείτε ότι ο τύπος αρχείου έχει οριστεί σε **Experiment Document Single files (*.eds)**.

25 Κάντε κλικ στο **Save**.

Το πλαίσιο διαλόγου κλείνει και το πρόγραμμα αποθηκεύει το αρχείο πειράματος στον φάκελο που επιλέξατε.

Βήμα 8. Αποθηκεύστε το πείραμα ως πρότυπο για μελλοντική χρήση

26 Κάντε κλικ στην αιχμή κάτω βέλους δίπλα στο κουμπί **Save** για να επεκτείνετε το μενού των επιλογών αποθήκευσης.

27 Επιλέξτε **Save As Template** στο μενού.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Save As Template.

28 Επιλέξτε φάκελο για το νέο πρότυπο.

29 Στο πεδίο File name, πληκτρολογήστε **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

30 Βεβαιωθείτε ότι ο τύπος αρχείου έχει οριστεί σε **Experiment Document Template files (*.edt)**.

31 Κάντε κλικ στο **Save**.

Το πλαίσιο διαλόγου κλείνει και το πρόγραμμα αποθηκεύει το νέο αρχείο προτύπου στον φάκελο που επιλέξατε.

Στις μελλοντικές αναλύσεις προσδιορισμού χρησιμοποιήστε το αποθηκευμένο πρότυπο για να δημιουργήσετε και να ρυθμίσετε το πείραμα qRT-PCR όπως περιγράφεται στην ενότητα «**Δημιουργία πειράματος ABI 7500 Fast από αποθηκευμένο πρότυπο**».

Σε αυτό το σημείο μπορείτε να συνεχίσετε στην ενότητα «**Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR**» στη σελίδα 42.

Δημιουργία πειράματος ABI 7500 Fast από αποθηκευμένο πρότυπο

Αν δεν έχει δημιουργηθεί πρότυπο του πειράματος με την απαιτούμενη ρύθμιση πλάκας και το απαιτούμενο θερμικό προφίλ, ανατρέξτε στην ενότητα «**Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος ABI 7500 Fast (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχει δημιουργηθεί ήδη ένα πρότυπο)**» στη σελίδα 28.

Βήμα 1. Δημιουργήστε το πείραμα

- 1 Ενεργοποιήστε το όργανο ABI 7500 Fast.
- 2 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο, ανοίξτε την εφαρμογή λογισμικού του συστήματος 7500.
- 3 Στην οθόνη Home, στην ενότητα **Set Up**, κάντε κλικ στο **Template**.
Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Open.
- 4 Στο πλαίσιο διαλόγου περιηγηθείτε στον φάκελο που έχει αποθηκευτεί το πρότυπο.
- 5 Κάντε διπλό κλικ απευθείας στο αρχείο **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt**.
Γίνεται εκκίνηση λειτουργίας του οργάνου.
Το λογισμικό του συστήματος 7500 ανοίγει στην οθόνη Experiment, στο παράθυρο Plate Setup.

Βήμα 2. Αποθηκεύστε το πείραμα

- 6 Στο πάνω μέρος της οθόνης, κάντε κλικ στην αιχμή κάτω βέλους δίπλα στο κουμπί **Save** για να επεκτείνετε το μενού των επιλογών αποθήκευσης.
- 7 Επιλέξτε **Save As** στο μενού.
Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Save As.
- 8 Επιλέξτε φάκελο για το νέο αρχείο πειράματος.
- 9 Στο πεδίο File name, πληκτρολογήστε ένα όνομα για το πείραμα.
- 10 Βεβαιωθείτε ότι ο τύπος αρχείου έχει οριστεί σε **Experiment Document Single files (*.eds)**.
- 11 Κάντε κλικ στο **Save**.
Το πλαίσιο διαλόγου κλείνει και το πρόγραμμα αποθηκεύει το αρχείο πειράματος στον φάκελο που επιλέξατε.
Σε αυτό το σημείο μπορείτε να συνεχίσετε στην ενότητα «**Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR**» στη σελίδα 42.

Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχουν δημιουργηθεί και αποθηκευτεί το πρωτόκολλο και τα αρχεία πλάκας)

Αν υπάρχουν ήδη το κατάλληλο πρωτόκολλο και τα αρχεία πλάκας, μεταβείτε στην ενότητα «Δημιουργία πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR από αποθηκευμένο αρχείο πρωτοκόλλου και αρχείο πλάκας» στη σελίδα 41.

Βήμα 1. Δημιουργήστε το πείραμα

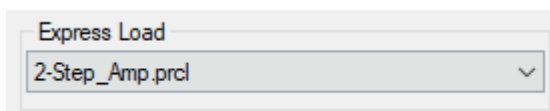
- 1 Ενεργοποιήστε το όργανο CFX96 Touch Real-Time PCR.
- 2 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο, ανοίξτε την εφαρμογή λογισμικού του Bio-Rad CFX Maestro.
- 3 Στο Startup Wizard, από την αναπτυσσόμενη λίστα **Select instrument** επιλέξτε **CFX96** και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στην επιλογή **User-defined**.

Ανοίγει η οθόνη Run Setup στην καρτέλα Protocol. Το προεπιλεγμένο θερμικό προφίλ εμφανίζεται στο κέντρο της οθόνης.

Βήμα 2. Ρυθμίστε το θερμικό προφίλ

- 4 Στην αναπτυσσόμενη λίστα Express Load επιλέξτε **2-Step_Amp.prcl**.

Το θερμικό προφίλ ενημερώνεται με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις ενός πρωτοκόλλου ενίσχυσης 2 σταδίων, κατάλληλου για χρήση με ιχνηθέτες φθορισμού.



Σχήμα 12 Η λίστα Express Load με επιλογή **2-Step_Amp.prcl** στην καρτέλα Protocol της εφαρμογής CFX Maestro

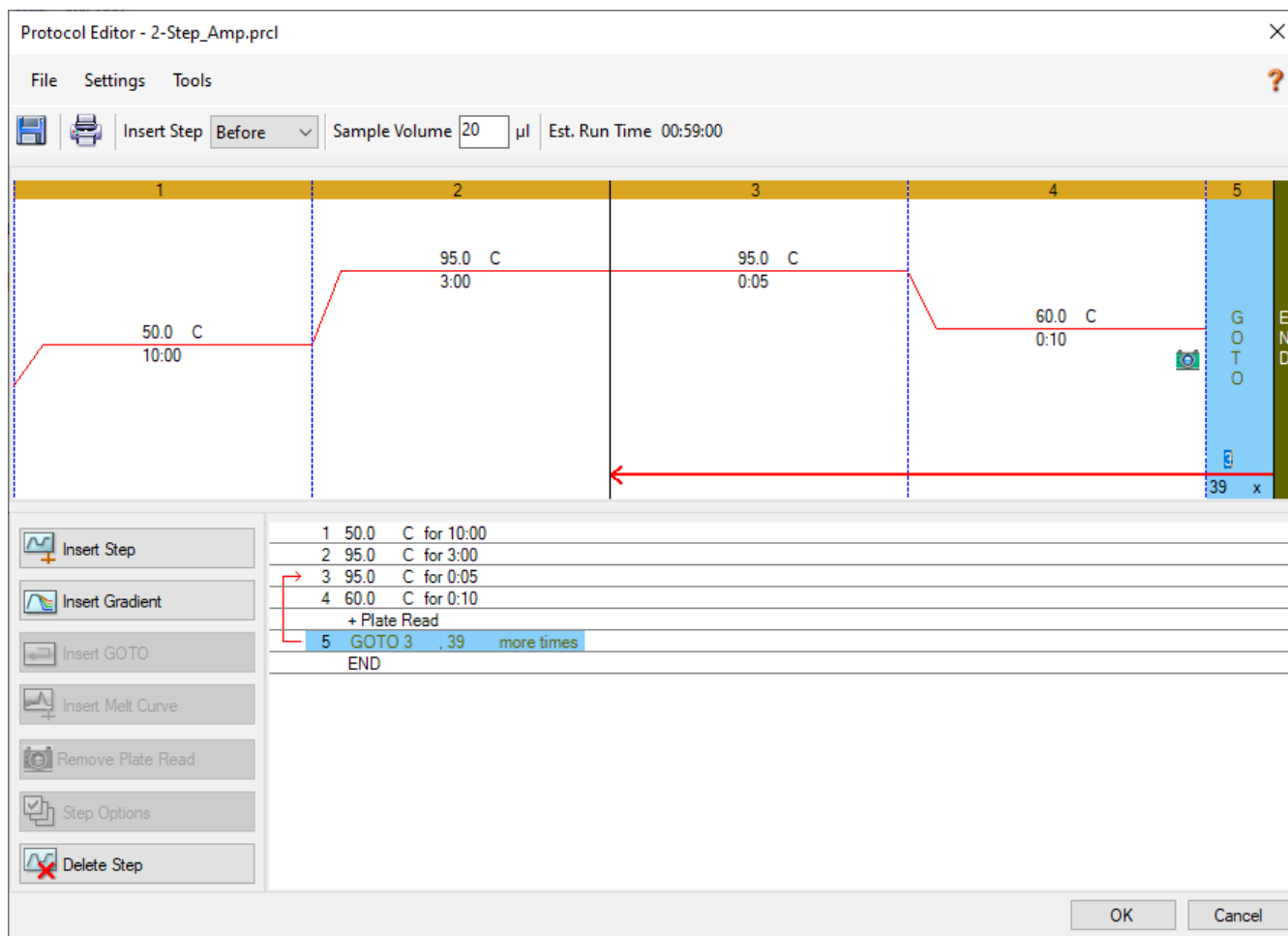
- 5 Επιλέξτε **Edit Selected**.

Ανοίγει το παράθυρο Protocol Editor.

- 6 Στο παράθυρο Protocol Editor προσθέστε ένα βήμα στην αρχή του θερμικού προφίλ για τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης.
 - a Επιλέξτε το βήμα 1 στην εικόνα θερμικού προφίλ.
 - b Στην αναπτυσσόμενη λίστα Insert Step επιλέξτε **Before**.
 - c Κάντε κλικ στο **Insert Step**.

Προστίθεται ένα νέο βήμα 1 πριν από το επιλεγμένο βήμα.

- d Επεξεργαστείτε τις ρυθμίσεις του νέου βήματος και ορίστε 50 °C για 10 λεπτά.
- 7 Προσαρμόστε και τα υπόλοιπα βήματα του θερμικού προφίλ ώστε να αντιστοιχούν σε εκείνα στο **Σχήμα 13**. Τις ρυθμίσεις συνοψίζει επίσης ο **Πίνακας 11**. Βεβαιωθείτε ότι το βήμα GOTO (βήμα 5) έχει ρυθμιστεί στις 39 επαναλήψεις.



Σχήμα 13 Το θερμικό προφίλ στο παράθυρο Protocol Editor της εφαρμογής CFX Maestro

Πίνακας 11 Πρόγραμμα θερμικών κύκλων για το όργανο Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR

Αριθμός τμήματος	Αριθμός κύκλων	Διάρκεια	Θερμοκρασία
1	1	10 λεπτά	50 °C
2	1	3 λεπτά	95 °C
3	40	5 δευτερόλεπτα	95 °C
		10 δευτερόλεπτα	60 °C

Βήμα 3. Αποθηκεύστε το αρχείο πρωτοκόλλου.

8 Κάντε κλικ στο **Save**.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Save As και σας ζητά να αποθηκεύσετε το αρχείο πρωτοκόλλου του πειράματος. Το αρχείο πρωτοκόλλου περιλαμβάνει τις ρυθμίσεις της καρτέλας Protocol από την οθόνη Run Setup.

9 Επιλέξτε φάκελο για το αρχείο πρωτοκόλλου.

10 Στο πεδίο File name, πληκτρολογήστε **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol**.

11 Βεβαιωθείτε ότι ο τύπος αρχείου έχει οριστεί σε **Protocol File (*.prcl)**.

12 Κάντε κλικ στο **Save**.

Το πλαίσιο διαλόγου κλείνει και το πρόγραμμα αποθηκεύει το αρχείο πρωτοκόλλου στον φάκελο που επιλέξατε.

13 Κάντε κλικ στο **OK** για να κλείσετε το παράθυρο Protocol Editor.

Στις μελλοντικές αναλύσεις προσδιορισμού χρησιμοποιήστε το αποθηκευμένο αρχείο πρωτοκόλλου για να ρυθμίσετε την καρτέλα Protocol όπως περιγράφεται στην ενότητα **«Δημιουργία πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR από αποθηκευμένο αρχείο πρωτοκόλλου και αρχείο πλάκας»**.

Βήμα 4. Επιλέξτε φθοριοφόρα και αντιστοιχίστε ονόματα στόχων

14 Στο κάτω μέρος της οθόνης Run Setup, κάντε κλικ στο **Next**.

Από την οθόνη Run Setup μεταβαίνετε στην καρτέλα Plate. Η εικόνα του χάρτη πλάκας εμφανίζεται στο κέντρο της οθόνης.

15 Βεβαιωθείτε ότι η αναπτυσσόμενη λίστα Scan Mode έχει οριστεί σε **All Channels**.

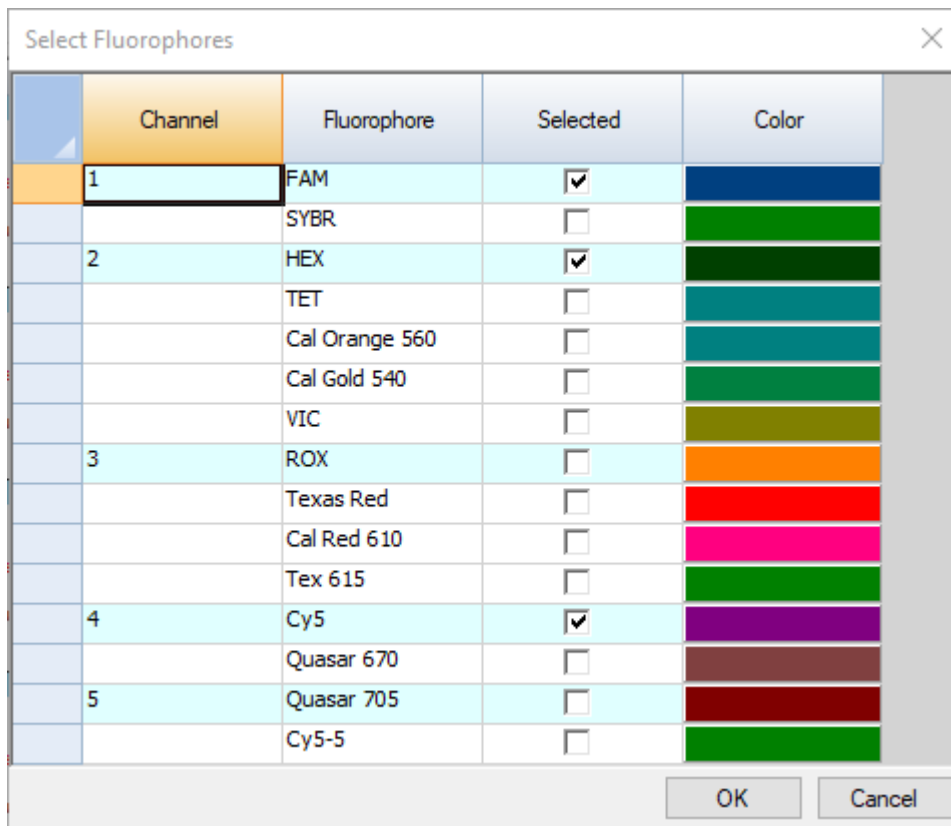
16 Επιλέξτε **Edit Selected**.

Ανοίγει το παράθυρο Plate Editor.

17 Στο παράθυρο Plate Editor, κάντε κλικ στο **Select Fluorophores**.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Select Fluorophores.

18 Στο πλαίσιο διαλόγου επιλέξτε τα πλαίσια ελέγχου για τα φθοριοφόρα **FAM**, **HEX** και **Cy5**. Αποεπιλέξτε τα πλαίσια ελέγχου όλων των άλλων φθοριοφόρων. Ανατρέξτε στο **Σχήμα 14**.



Σχήμα 14 Επιλογή φθοριοφόρων στο πλαίσιο διαλόγου Select Fluorophores της εφαρμογής CFX Maestro

19 Κάντε κλικ στο **OK**.

Κλείνει το πλαίσιο διαλόγου Select Fluorophores. Τα τρία επιλεγμένα φθοριοφόρα εμφανίζονται στη δεξιά πλευρά του παραθύρου Plate Editor στην ενότητα **Target Names**.

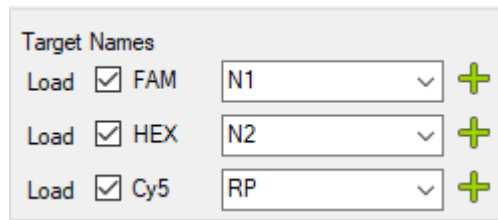
20 Επιλέξτε όλα τα βοθρία στον χάρτη πλάκας.

Τα επιλεγμένα βοθρία επισημαίνονται με μπλε χρώμα.

Η επιλογή και των 96 βοθρίων είναι ορθή αν όλα τα βοθρία της πλάκας θα περιλαμβάνουν αντίδραση qRT-PCR. Αν κάποια από τα βοθρία της πλάκας θα είναι κενά, μην επιλέξετε τα συγκεκριμένα βοθρία σε αυτό το βήμα.

21 Στην ενότητα **Target Names** βεβαιωθείτε ότι είναι επιλεγμένα και τα τρία φθοριοφόρα και ότι όλα τα βοθρία εμφανίζουν τα ονόματα και των τριών φθοριοφόρων.

22 Στα πεδία δίπλα στα ονόματα των φθοριοφόρων, πληκτρολογήστε ονόματα στόχων για τα φθοριοφόρα όπως φαίνεται στο **Σχήμα 15**. Πατήστε **Enter** μετά από κάθε όνομα που πληκτρολογείτε για να καταχωριστεί το όνομα στα βοθρία της πλάκας.



Σχήμα 15 Αντιστοιχίσεις ονομάτων στόχων στο παράθυρο Plate Editor της εφαρμογής CFX Maestro

Βήμα 5. Αντιστοιχίστε τύπους δειγμάτων και ονόματα δειγμάτων

23 Αντιστοιχίστε τον τύπο δείγματος αρνητικού μάρτυρα No Template Control.

- Επιλέξτε το βοθρίο A12 στον χάρτη πλάκας.
- Στην αναπτυσσόμενη λίστα Sample Type επιλέξτε **NTC**.

Η επισήμανση **NTC** εμφανίζεται στο πάνω μέρος του βοθρίου A12.

24 Βεβαιωθείτε ότι τα υπόλοιπα βοθρία αντιστοιχίζονται σε τύπο δείγματος Unkownn όπως δηλώνει και η επισήμανση **Unk** στο πάνω μέρος των βοθρίων, βλ. **Σχήμα 16**.

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

Σχήμα 16 Αντιστοιχίσεις τύπων δειγμάτων στο παράθυρο Plate Editor της εφαρμογής CFX Maestro

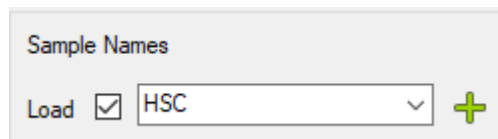
25 Αντιστοιχίστε όνομα δείγματος για το δείγμα του μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος στο βοθρίο B12.

a Επιλέξτε το βοθρίο B12 στον χάρτη πλάκας.

Αν έχετε πολλά δείγματα μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος που πρέπει να συμπεριληφθούν στην πλάκα, επιλέξτε τον απαραίτητο αριθμό πρόσθετων βοθρίων στη στήλη 12 του χάρτη πλάκας.

b Στο πεδίο στην ενότητα **Sample Names** πληκτρολογήστε **HSC**, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 17**. Πατήστε **Enter**.

Το όνομα δείγματος HSC εμφανίζεται στο επιλεγμένο βοθρίο ή τα επιλεγμένα βοθρία.



Σχήμα 17 Προσθήκη του ονόματος δείγματος HSC στο παράθυρο Plate Editor της εφαρμογής CFX Maestro

26 Αντιστοιχίστε όνομα δείγματος για το δείγμα θετικού μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 στο βοθρίο H12.

a Επιλέξτε το βοθρίο H12 στον χάρτη πλάκας.

b Στο πεδίο στην ενότητα **Sample Names** πληκτρολογήστε **Pos**. Πατήστε **Enter**.

Το όνομα δείγματος Pos εμφανίζεται στο βοθρίο H12.

Βήμα 6. Αποθηκεύστε το αρχείο πλάκας

27 Κάντε κλικ στο **Save**.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Save As και σας ζητά να αποθηκεύσετε το αρχείο πλάκας του πειράματος. Το αρχείο πλάκας περιλαμβάνει τις ρυθμίσεις της καρτέλας Plate από την οθόνη Run Setup.

28 Επιλέξτε φάκελο για το αρχείο πλάκας.

29 Στο πεδίο File name, πληκτρολογήστε το όνομα **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate**.

30 Βεβαιωθείτε ότι ο τύπος αρχείου έχει οριστεί σε **Plate File (*.pltd)**.

31 Κάντε κλικ στο **Save**.

Το πλαίσιο διαλόγου κλείνει και το πρόγραμμα αποθηκεύει το αρχείο πλάκας στον φάκελο που επιλέξατε.

32 Κάντε κλικ στο **OK** για να κλείσετε το παράθυρο Plate Editor.

33 Στο κάτω μέρος της οθόνης Run Setup, κάντε κλικ στο **Next**.

Από την οθόνη Run Setup μεταβαίνετε στην καρτέλα Start Run.

Στις μελλοντικές αναλύσεις προσδιορισμού χρησιμοποιήστε το αποθηκευμένο αρχείο πλάκας για να ρυθμίσετε την καρτέλα Plate όπως περιγράφεται στην ενότητα **«Δημιουργία πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR από αποθηκευμένο αρχείο πρωτοκόλλου και αρχείο πλάκας»**.

Σε αυτό το σημείο μπορείτε να συνεχίσετε στην ενότητα **«Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR»** στη σελίδα 42.

Δημιουργία πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR από αποθηκευμένο αρχείο πρωτοκόλλου και αρχείο πλάκας

Αν δεν έχει δημιουργηθεί πείραμα με την απαιτούμενη ρύθμιση πλάκας και το απαιτούμενο θερμικό προφίλ, ανατρέξτε στην ενότητα «**Δημιουργία και ρύθμιση πειράματος Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (απαιτείται σε περίπτωση που δεν έχουν δημιουργηθεί και αποθηκευτεί το πρωτόκολλο και τα αρχεία πλάκας)**» στη σελίδα 35.

Βήμα 1. Δημιουργήστε το πείραμα

- 1 Ενεργοποιήστε το όργανο CFX96 Touch Real-Time PCR.
- 2 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο, ανοίξτε την εφαρμογή λογισμικού του Bio-Rad CFX Maestro.
- 3 Στο Startup Wizard, από την αναπτυσσόμενη λίστα **Select instrument** επιλέξτε **CFX96** και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στην επιλογή **User-defined**.

Ανοίγει η οθόνη Run Setup στην καρτέλα Protocol. Το προεπιλεγμένο θερμικό προφίλ εμφανίζεται στο κέντρο της οθόνης.

Βήμα 2. Φορτώστε το αρχείο πρωτοκόλλου

- 4 Επιλέξτε **Select Existing**.
Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Select Protocol.
- 5 Στο πλαίσιο διαλόγου περιηγηθείτε στον φάκελο που έχει αποθηκευτεί το αρχείο **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prcl**.
- 6 Κάντε διπλό κλικ απευθείας στο αρχείο πρωτοκόλλου.
Οι ρυθμίσεις του αρχείου πρωτοκόλλου φορτώνονται στο πείραμα.

Βήμα 3. Φορτώστε το αρχείο πλάκας

- 7 Στο κάτω μέρος της οθόνης Run Setup, κάντε κλικ στο **Next**.
Από την οθόνη Run Setup μεταβαίνετε στην καρτέλα Plate. Η εικόνα του χάρτη πλάκας εμφανίζεται στο κέντρο της οθόνης.
- 8 Επιλέξτε **Select Existing**.
Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Select Plate.
- 9 Στο πλαίσιο διαλόγου περιηγηθείτε στον φάκελο που έχει αποθηκευτεί το αρχείο **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.pltd**.
- 10 Κάντε διπλό κλικ απευθείας στο αρχείο πλάκας.
Οι ρυθμίσεις του αρχείου πλάκας φορτώνονται στο πείραμα.
- 11 Στο κάτω μέρος της οθόνης Run Setup, κάντε κλικ στο **Next**.
Από την οθόνη Run Setup μεταβαίνετε στην καρτέλα Start Run.
Σε αυτό το σημείο μπορείτε να συνεχίσετε στην ενότητα «**Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR**» στη σελίδα 42.

Προετοιμασία των αντιδράσεων qRT-PCR

ΠΡΟΣΟΧΗ

Προετοιμάζετε την πλάκα qRT-PCR αμέσως πριν από τη χρήση και διατηρείτε την πάντα σε πάγο ή ψυκτική σχάρα μέχρι να φορτωθεί στο όργανο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο.

Βήμα 1. Προετοιμάστε το μείγμα αντιδραστηρίων και την πλάκα της qRT-PCR στον σταθμό εργασίας των διαδικασιών πριν από την PCR

1 Αποψύξτε τα κατεψυγμένα αντιδραστήρια qRT-PCR σε πάγο. Ο **Πίνακας 12** περιλαμβάνει μια λίστα με τα απαραίτητα αντιδραστήρια. Διατηρήστε τα 10x SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx και Reference Dye Dx προστατευμένα από το φως.

2 Προετοιμάστε αραιώση 1:500 του Reference Dye Dx της συσκευασίας με ύδωρ ελεύθερο νουκλεάσης (για μια τελική συγκέντρωση 30 nM στις αντιδράσεις). Διατηρήστε όλα τα διαλύματα που περιέχουν τη χρωστική αναφοράς προστατευμένα από το φως.

Το αραιωμένο Reference Dye Dx, αν φυλαχθεί σε σωληνάριο που προστατεύει από το φως σε θερμοκρασία 4 °C, μπορεί να χρησιμοποιηθεί εντός της ημέρας για τη ρύθμιση πρόσθετων αναλύσεων προσδιορισμού.

3 Προετοιμάστε το μείγμα αντιδραστηρίων συνδυάζοντας τα στοιχεία που αναφέρει ο **Πίνακας 12** με τη σειρά που παρατίθενται. Προετοιμάστε ενιαίο μείγμα αντιδραστηρίων για όλα τα δείγματα (3 μάρτυρες και έως 93 δείγματα εξέτασης) χρησιμοποιώντας πολλαπλά στοιχεία της λίστας. Διατηρήστε το μείγμα αντιδραστηρίων σε πάγο και προστατευμένο από το φως. Προετοιμάστε το μείγμα αντιδραστηρίων αμέσως πριν από τη χρήση.

- Αν προετοιμάζετε 96 αντιδράσεις, προετοιμάστε το μείγμα αντιδραστηρίων σε σωληνάριο 2 ml.
- Αν προετοιμάζετε 48 αντιδράσεις, προετοιμάστε το μείγμα αντιδραστηρίων σε σωληνάριο 1,5 ml.

Για λόγους ευκολίας, ο **Πίνακας 12** περιλαμβάνει τους όγκους για την προετοιμασία μίας (1) αντίδρασης, 48 αντιδράσεων και 96 αντιδράσεων.

Πίνακας 12 Μείγμα αντιδραστηρίων qRT-PCR

Στοιχείο	Όγκος για 1 αντίδραση	Όγκος για 48 αντιδράσεις (συμπεριλαμβανομένης της περισσειας)	Όγκος για 96 αντιδράσεις (συμπεριλαμβανομένης της περισσειας)
Ύδωρ ελεύθερο νουκλεάσης	1,5 μl	81 μl	162 μl
2x Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 μl	540 μl	1080 μl
10x 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
Αραιωμένο Reference Dye Dx (από το βήμα 2)	0,3 μl	16,2 μl	32,4 μl
RT/RNase Block Dx	1 μl	54 μl	108 μl

- 4 Αναμείξτε ελαφρά το μείγμα αντιδραστηρίων σε αναμείκτη περιδίνησης χωρίς να δημιουργήσετε φυσαλίδες και, στη συνέχεια, τοποθετήστε το σωληνάριο σε μικροφυγόκεντρο για 5 δευτερόλεπτα.
- 5 Κατανείμετε 15 μl του μείγματος αντιδραστηρίων στα βοθρία της πλάκας 96 βοθρίων ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία.
 - a Τοποθετήστε μια καθαρή αλυσίδα 8 σωληναρίων σε μια ψυκτική σχάρα 96 βοθρίων.
 - b Διανείμετε 190 μl του μείγματος αντιδραστηρίων (αν εκτελείτε 96 αντιδράσεις) ή 100 μl του μείγματος αντιδραστηρίων (αν εκτελείτε 48 αντιδράσεις) σε καθένα από τα 8 σωληνάκια της αλυσίδας. Διασπάστε αν χρειάζεται τις μεγάλες φυσαλίδες που ίσως συγκεντρώνονται στον πυθμένα των σωληναρίων.
 - c Με μια πιπέτα πολλαπλών καναλιών μεταφέρετε 15 μl του μείγματος αντιδραστηρίων από την αλυσίδα 8 βοθρίων στις στήλες της πλάκας 96 βοθρίων. Διατηρήστε την πλάκα σε πάγο ή σε ψυκτική σχάρα 96 βοθρίων, και προστατευμένη από το φως, σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Αν εκτελείτε μόνο 48 αντιδράσεις, αφήστε κενές τις στήλες 1 έως 6.

- 6 Καλύψτε την πλάκα και μεταφέρετέ την στον σταθμό εργασίας των διαδικασιών πριν από την PCR όπου λαμβάνει χώρα η προσθήκη δειγμάτων. Διατηρήστε την πλάκα σε πάγο ή σε ψυκτική σχάρα.

Βήμα 2. Προσθέστε τα δείγματα μάρτυρα και τα δείγματα εξέτασης στην πλάκα qRT-PCR στον σταθμό εργασίας των διαδικασιών πριν από την PCR (χώρος προσθήκης δειγμάτων)

- 7 Αραιώστε τον θετικό μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 σε απόθεμα εργασίας 10 αντιγράφων/μl.
 - a Προσθέστε 99 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεάσης σε καθαρό σωληνάριο 1,5 ml. Σε αυτό το σωληνάριο προσθέστε 1 μl μη αραιωμένου θετικού μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2. Αναμείξτε καλά σε αναμείκτη περιδίνησης και, στη συνέχεια, τοποθετήστε για λίγο σε μικροφυγόκεντρο.
 - b Προσθέστε 99 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεάσης σε ένα άλλο καθαρό σωληνάριο 1,5 ml. Σε αυτό το σωληνάριο προσθέστε 1 μl του αραιωμένου θετικού μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 που προετοιμάστηκε στο **βήμα a**. Αναμείξτε καλά σε αναμείκτη περιδίνησης και, στη συνέχεια, τοποθετήστε για λίγο σε μικροφυγόκεντρο.

Το σωληνάριο περιέχει το απόθεμα εργασίας του θετικού μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 με συγκέντρωση 10 αντιγράφων/μl.

Το απόθεμα εργασίας, αν φυλαχθεί σε θερμοκρασία 4 °C, μπορεί να χρησιμοποιηθεί εντός της ημέρας για τη ρύθμιση πρόσθετων αναλύσεων προσδιορισμού. Επιστρέψτε το αρχικό απόθεμα θετικού μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 σε θερμοκρασία -80 °C.

8 Ρυθμίστε τις αντιδράσεις μάρτυρα όπως φαίνεται στο **Σχήμα 18**.

- Για τον αρνητικό μάρτυρα (NTC) προσθέστε 5 μl ύδατος ελεύθερου νουκλεάσης στο βοθρίο A12.
- Για τον μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος (HSC) υποβάλετε για λίγο σε περιδίνηση το RNA που παρασκευάστηκε από τον μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος. Στη συνέχεια, προσθέστε 5 μl του RNA στο βοθρίο B12.

Αν έχετε πολλά δείγματα HSC που πρέπει να συμπεριληφθούν στην πλάκα, χρησιμοποιήστε πρόσθετα βοθρία στη στήλη 12 όταν ρυθμίζετε την πλάκα στο λογισμικό του οργάνου qRT-PCR.

- Για τον θετικό μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 (Pos) προσθέστε 5 μl του αραιωμένου θετικού μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 στο βοθρίο H12.

9 Ρυθμίστε τις αντιδράσεις για τα δείγματα εξέτασης (S1 έως S93) όπως φαίνεται στο **Σχήμα 18**. Αλλάζετε συχνά γάντια προς αποφυγή μόλυνσεων.

- Υποβάλετε για λίγο σε περιδίνηση τα δείγματα RNA που παρασκευάστηκαν από τα δείγματα εξέτασης. Στη συνέχεια τοποθετήστε σε μικροφυγόκεντρο για 5 δευτερόλεπτα.
- Για κάθε δείγμα προσθέστε 5 μl σε ένα βοθρίο της πλάκας qRT-PCR. Παρακολουθείτε προσεκτικά ποιο δείγμα προστέθηκε σε κάθε βοθρίο. Αλλάζετε ρύγχη ύστερα από κάθε προσθήκη.
- Αν η πλάκα qRT-PCR πρόκειται να σφραγιστεί με αυτοκόλλητη σφράγιση, αναμείξτε τις αντιδράσεις πριν από τη σφράγιση πιπετάροντας για λίγο πάνω-κάτω τα μείγματα χωρίς να δημιουργείτε φυσαλίδες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Αν εκτελείτε μόνο 48 αντιδράσεις, αφήστε κενά τα βοθρία της πλάκας με σήμανση S1 έως S48.

10 Σφραγίστε την πλάκα με αυτοκόλλητη σφράγιση ή με πώματα σωληναρίων σε αλυσίδα.

11 Αν η πλάκα σφραγιστεί με πώματα σωληναρίων σε αλυσίδα, αναμείξτε για λίγο σε αναμείκτη περιδίνησης. (Μην χρησιμοποιείτε αναμείκτη περιδίνησης σε πλάκες σφραγισμένες με αυτοκόλλητη σφράγιση.)

12 Περιδινήστε για λίγο την πλάκα σε φυγόκεντρο πλάκας.

13 Αν χρησιμοποιείτε το σύστημα Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR και έχετε σφραγίσει την πλάκα με αυτοκόλλητη σφράγιση, προσθέστε πάνω από την πλάκα μια επιφάνεια συμπίεσης.

14 Συνεχίστε στην εκτέλεση της qRT-PCR στο σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο που χρησιμοποιείτε.

- Βλ. «**Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR**» στη σελίδα 47
- Βλ. «**Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο όργανο ABI 7500 Fast Real Time PCR**» στη σελίδα 55
- Βλ. «**Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα ανίχνευσης Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR**» στη σελίδα 62

	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

Σχήμα 18 Ρύθμιση πλάκας για τα δείγματα εξέτασης 1–93 και τα δείγματα μάρτυρα (αρνητικός μάρτυρας No Template Control [NTC], μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος [HSC] και μάρτυρας συνθετικού θετικού RNA Dx [Pos])

5

Οδηγίες για την εκτέλεση του προγράμματος qRT-PCR

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR **47**

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο όργανο ABI 7500 Fast Real Time PCR **55**

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα ανίχνευσης Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR **62**

Αυτό το κεφάλαιο περιλαμβάνει οδηγίες για την εκτέλεση του προγράμματος κύκλων qRT-PCR στο επιλεγμένο όργανο Real Time PCR.

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR

Αυτή η ενότητα περιγράφει τη διαδικασία για την εκτέλεση του προγράμματος qRT-PCR σε ένα σύστημα Agilent AriaMx ή AriaDx Real-Time PCR.

Εκτέλεση του προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα AriaMx/AriaDx

- 1 Βεβαιωθείτε ότι το όργανο AriaMx/AriaDx είναι ενεργοποιημένο.
- 2 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος στο όργανο, ανοίξτε το πείραμα που δημιουργήσατε νωρίτερα στην εφαρμογή Aria.
- 3 Μεταβείτε στην οθόνη Thermal Profile, στην οθόνη Run Status ή στην οθόνη Raw Data Plots.
- 4 Κάντε κλικ στο **Run**.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Instrument Explorer.

- 5 Εντοπίστε το όργανο που θα χρησιμοποιήσετε για την ανάλυση και κάντε κλικ στο **Send Config**. (Για οδηγίες σχετικά με την αναζήτηση και την προσθήκη οργάνων, ανατρέξτε στον Οδηγό ρύθμισης και χρήσης AriaMx ή AriaDx)
 - Αν είναι η πρώτη φορά που συνδέεστε σε ένα όργανο μετά την τελευταία εκκίνηση του προγράμματος Aria, θα ανοίξει το πλαίσιο διαλόγου Login. Επιλέξτε το Username από την αναπτυσσόμενη λίστα, πληκτρολογήστε τον κωδικό πρόσβασης σύνδεσης στο πεδίο Password και κάντε κλικ στο **Login**. Για να συνδεθείτε με διαφορετικό λογαριασμό χρήστη, κάντε δεξί κλικ στο όνομα του οργάνου και κάντε κλικ στο **Log off current user**. Στη συνέχεια, μπορείτε να συνδεθείτε χρησιμοποιώντας τον επιθυμητό λογαριασμό χρήστη.
 - Αν το πείραμα δεν έχει ακόμη αποθηκευτεί, θα σας ζητηθεί να αποθηκεύσετε το πείραμα πριν συνεχίσετε.
- 6 Μεταφέρετε την πλάκα αντίδρασης στο όργανο και τοποθετήστε την στο σύστημα θερμαντικής πλάκας.
- 7 Στην οθόνη αφής του οργάνου, ανοίξτε το πείραμα που έχει προετοιμαστεί στην οθόνη Thermal Profile και πατήστε **Run Experiment**.

Το όργανο ξεκινά την εκτέλεση του πειράματος.

- 8 Επιστρέψτε στο πρόγραμμα του υπολογιστή. Το πρόγραμμα σας μεταφέρει στην οθόνη Run Status όπου μπορείτε να παρακολουθήσετε την πρόοδο της ανάλυσης.

Δεν απαιτείται παρακολούθηση της ανάλυσης. Αν κλείσετε το λογισμικό Aria πριν από την ολοκλήρωση της ανάλυσης, σημειώστε τη θέση όπου θα αποθηκευτεί το αρχείο πειράματος μετά την ανάλυση.

Αντιστοίχιση ρυθμίσεων ανάλυσης δεδομένων για το πείραμα AriaMx/AriaDx

Βήμα 1. Προβολή διαγραμμάτων ενίσχυσης για όλους τους στόχους σε όλα τα βοηθία

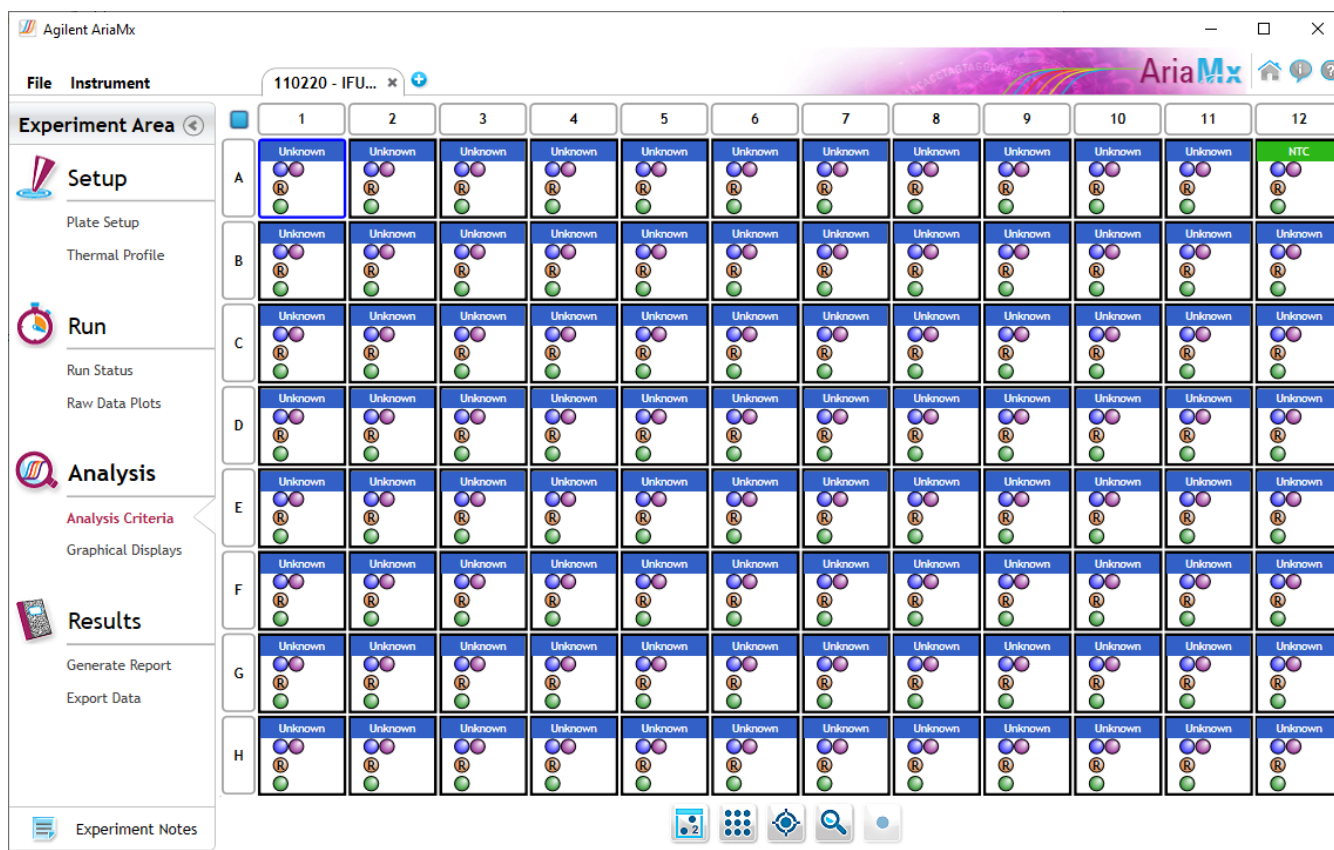
- 1 Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, ανοίξτε το αρχείο πειράματος στο λογισμικό Aria.
- 2 Κάντε κλικ στο **Analysis Criteria** στην αριστερή πλευρά της οθόνης.

Ανοίγει η οθόνη Analysis Criteria, με ρυθμίσεις για τον καθορισμό των ρυθμίσεων ανάλυσης.

- 3 Βεβαιωθείτε ότι όλα τα βοηθία, οι τύποι βοηθίων και οι στόχοι έχουν επιλεγεί για ανάλυση, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 19**.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Αν η πλάκα περιέχει κενά βοηθία, βεβαιωθείτε ότι έχουν αντιστοιχιστεί στον τύπο κενού βοηθίου στην καρτέλα Plate Setup.



Σχήμα 19 Οθόνη Analysis Criteria στο Aria

- 4 Κάντε κλικ στο **Graphical Displays** στην αριστερή πλευρά της οθόνης.

Ανοίγει η οθόνη Graphical Displays, η οποία εμφανίζει τα δεδομένα με εργαλεία για τη ρύθμιση των παραμέτρων ανάλυσης.

- 5 Βεβαιωθείτε ότι στην οθόνη εμφανίζεται το γράφημα Amplification Plots και ότι οι προεπιλεγμένες παράμετροι ανάλυσης αντιστοιχούν σε αυτές που παρουσιάζονται στο **Σχήμα 20**.

Αν δεν εμφανίζεται ολόκληρος ο πίνακας των παραμέτρων ανάλυσης που φαίνεται στο **Σχήμα 20**, τότε κάντε κλικ στην αιχμή κάτω βέλους που βρίσκεται κάτω από τη ρύθμιση **Smoothing** για να επεκτείνετε το πλαίσιο.

Λάβετε υπόψη ότι οι προεπιλεγμένες τιμές Threshold Fluorescence στο πείραμά σας πιθανότατα θα διαφέρουν από αυτές που εμφανίζονται στο **Σχήμα 20**. Το λογισμικό υπολογίζει τις προεπιλεγμένες τιμές με βάση το επίπεδο του θορύβου φθορισμού στο εύρος των κύκλων υποβάθρου. Συνεπώς, οι προεπιλεγμένες τιμές θα διαφέρουν μεταξύ των πειραμάτων.

Amplification Plots

Fluorescence Term: R, Rn, ΔR, ΔRn

Smoothing: On, Off

Baseline Correction: Adjust

Crosstalk Correction: Adjust

Graph Type: Linear, Log

Threshold Fluorescence:

<input checked="" type="checkbox"/>	N1	-	0.021	+	🔒	↻
<input checked="" type="checkbox"/>	N2	-	0.028	+	🔒	↻
<input checked="" type="checkbox"/>	RP	-	0.038	+	🔒	↻

Background Based Threshold

Cycle Range: - 5 + thru - 9 +

Sigma Multiplier: - 10 +

Σχήμα 20 Προεπιλεγμένες ρυθμίσεις για το Amplification Plots στο λογισμικό Aria (οι τιμές Threshold Fluorescence θα διαφέρουν μεταξύ των πειραμάτων)

- 6 Στην περιοχή **Background Based Threshold**, βεβαιωθείτε ότι το προεπιλεγμένο εύρος κύκλων είναι 5 έως 9.
- 7 Ελέγξτε αν υπάρχουν διαγράμματα ενίσχυσης με πρώιμη ενίσχυση (δηλ. πριν από τον κύκλο 9). Εξαιρέστε τυχόν δείγματα εξέτασης με πρώιμη ενίσχυση από την ανάλυση και επαναλάβετε την εξέταση σε χαμηλότερη συγκέντρωση.

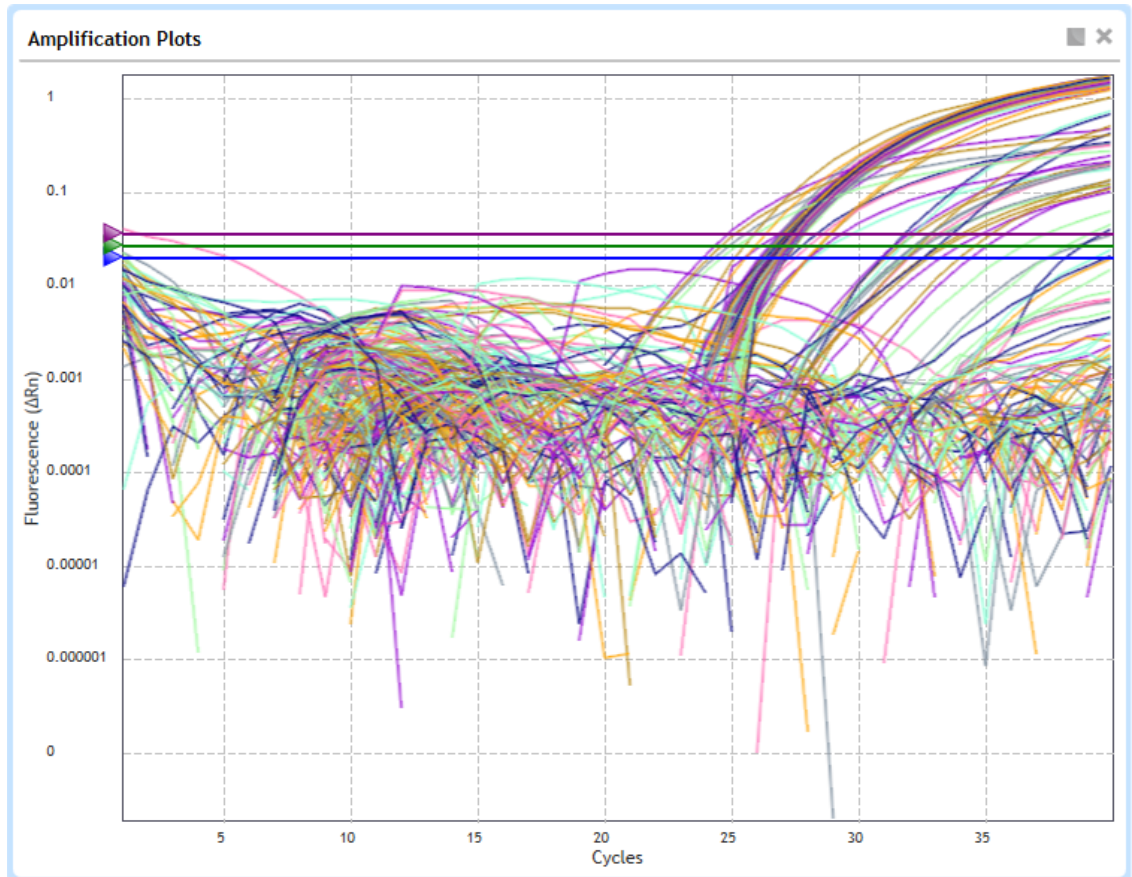
Στα δείγματα εξέτασης με ασυνήθιστα υψηλές συγκεντρώσεις ιικού RNA, η ενίσχυση των ικών στόχων μπορεί να φτάσει σε ανιχνεύσιμα επίπεδα σε πολύ πρώιμο αριθμό κύκλου (<9). Στο πλαίσιο των υπολογισμών διόρθωσης γραμμής βάσης, το λογισμικό μπορεί να ερμηνεύσει τα σήματα πρώιμης ενίσχυσης αυτού του τύπου ως θόρυβο υποβάθρου και να μην αντιστοιχίσει μια τιμή C_q στους ιικούς στόχους σε αυτά τα δείγματα.

Ελέγξτε αν υπάρχουν δείγματα εξέτασης αυτού του τύπου εμφανίζοντας το γράφημα Amplification Plots χωρίς διόρθωση γραμμής βάσης (Fluorescence Term R ή Rn). Αν κάποιος από τα δείγματα εξέτασης παρουσιάζει ενδείξεις ενίσχυσης πριν από τον κύκλο 9, τότε αφαιρέστε αυτά τα βοηθία από την ανάλυση καταργώντας την επιλογή τους στην οθόνη Analysis Criteria. Επαναλάβετε την ανάλυση της αντίδρασης qRT-PCR για το δείγμα αραιώνοντας το νουκλεϊκό οξύ σε αναλογία 1:100 χρησιμοποιώντας το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.


Βήμα 2. Αξιολόγηση τιμών ουδού


- 8 Στη ρύθμιση Graph Type, εκτελέστε εναλλαγή της επιλογής από **Linear** σε **Log**. Βεβαιωθείτε ότι η επιλογή Fluorescence Term έχει οριστεί σε ΔRn .

Η προβολή του γραφήματος Amplification Plots σε λογαριθμικές τιμές βελτιώνει την προβολή του θορύβου σήματος υποβάθρου. Ένα παράδειγμα φαίνεται στο **Σχήμα 21**. Η γραμμή ουδού για κάθε στόχο εμφανίζεται ως οριζόντια γραμμή.









Σχήμα 21 Γράφημα Amplification Plots στο Aria σε λογαριθμική κλίμακα — οι ουδοί-στόχοι εμφανίζονται ως οριζόντιες γραμμές

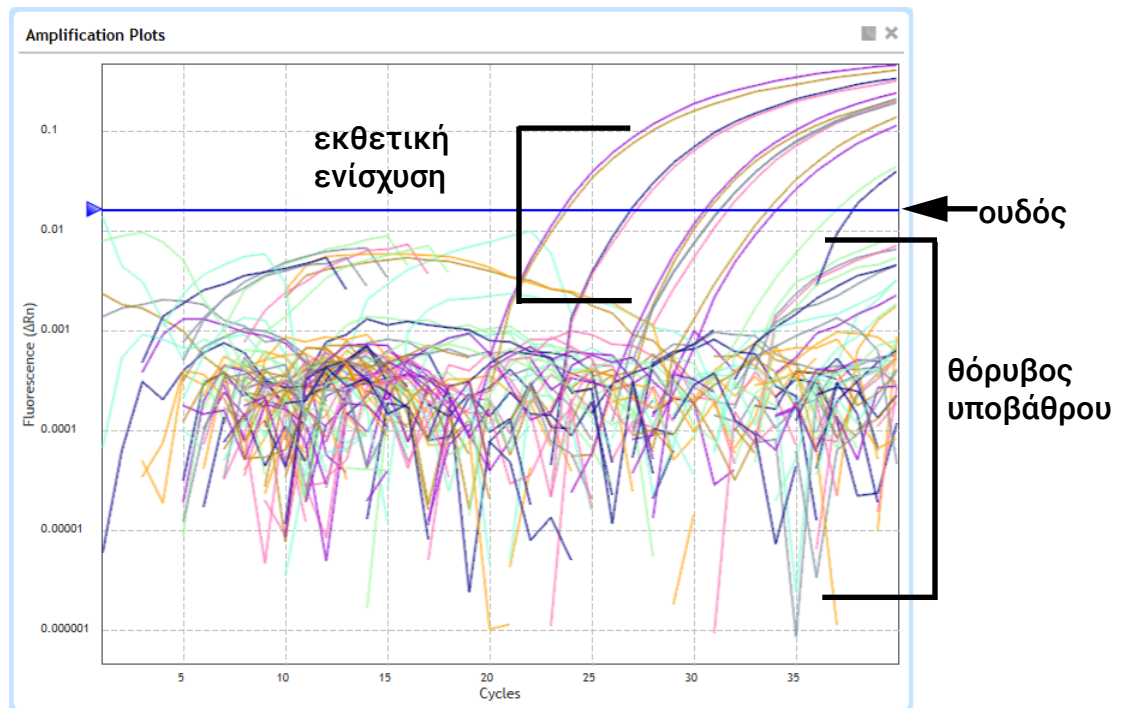
- 9 Αξιολογήστε οπτικά τα διαγράμματα ενίσχυσης και τον προεπιλεγμένο ουδό για τον στόχο N1.
- Κάντε κλικ στο εικονίδιο εμφάνισης στόχων που βρίσκεται κάτω από το γράφημα. 
 - Στο μενού που θα ανοίξει, αποεπιλέξτε τα πλαίσια για όλους τους άλλους στόχους, ώστε να εμφανίζεται μόνο ο στόχος N1 στο γράφημα Amplification Plots.
 - Καθορίστε αν ο ουδός είναι αρκετά υψηλός ώστε να είναι πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου και αρκετά χαμηλός, ώστε να συμπεριληφθούν διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης (ανατρέξτε στο **Σχήμα 23**). Με βάση αυτήν την αξιολόγηση, προχωρήστε σύμφωνα με τις οδηγίες που περιλαμβάνει ο **Πίνακας 13**.

- 10 Επαναλάβετε το **βήμα 9** για τον στόχο N2 και ξανά για τον στόχο RP.
- 11 Στην περιοχή **Threshold Fluorescence**, βεβαιωθείτε ότι και οι τρεις στόχοι έχουν επισημανθεί και ότι και οι τρεις τιμές Threshold Fluorescence είναι κλειδωμένες, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 22**.
- 12 Κάντε κλικ στο εικονίδιο εμφάνισης στόχων που βρίσκεται κάτω από το γράφημα. Βεβαιωθείτε ότι έχουν επιλεγεί όλοι οι στόχοι. 

Threshold Fluorescence:

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

Σχήμα 22 Επιλεγμένοι στόχοι και κλειδωμένες τιμές Threshold Fluorescence



Σχήμα 23 Γράφημα Amplification Plots στο Aria για στόχο N1

Πίνακας 13 Επαλήθευση βέλτιστης ρύθμισης ουδού στο λογισμικό Aria

Θέση ουδού	Περιγραφή	Ενέργεια
Βέλτιστη θέση	Πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου και περιλαμβάνει όλα τα διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης	<ul style="list-style-type: none"> Κλειδώστε την τιμή Threshold Fluorescence στη δεξιά πλευρά της οθόνης κάνοντας κλικ στο εικονίδιο λουκέτου. <p>Όταν η τιμή είναι κλειδωμένη, το εικονίδιο λουκέτου βρίσκεται στην κλειστή θέση. Το κλειδίωμα της τιμής δεν επιτρέπει την αλλαγή της σε περίπτωση μεταβολής κάποιου κριτηρίου ανάλυσης.</p>
Πολύ υψηλή	Ορισμένα διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης δεν περνούν τη γραμμή ουδού	<ul style="list-style-type: none"> Αναζητήστε βοθρία με εξαιρετικά υψηλό θόρυβο υποβάθρου. Λόγω αυτών των βοθρίων με ακραίες τιμές, το λογισμικό μπορεί να ρυθμίσει τον ουδό σε πολύ υψηλή τιμή. Επιστρέψτε στην οθόνη Analysis Criteria για να εξαιρέσετε το συγκεκριμένο βοθρίο από την ανάλυση. Το λογισμικό θα υπολογίσει εκ νέου τον ουδό μόλις εξαιρεθεί το βοθρίο με ακραίες τιμές. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήστε το ποντίκι για να μετακινήσετε χειροκίνητα τη γραμμή ουδού στο γράφημα, σε νέα θέση. Βεβαιωθείτε ότι ο νέος ουδός βρίσκεται σε βέλτιστη θέση και κλειδώστε την τιμή Threshold Fluorescence, όπως περιγράφεται παραπάνω. Όταν η νέα τιμή κλειδωθεί, επιστρέψτε ξανά στην οθόνη Analysis Criteria για να συμπεριλάβετε ξανά το βοθρίο με ακραίες τιμές στην ανάλυση.* <p>* Αν το διάγραμμα ενίσχυσης για το βοθρίο με ακραίες τιμές δεν εμφανίζει εκθετική ενίσχυση σε κανέναν αριθμό κύκλου, τότε βεβαιωθείτε ότι ο χαμηλότερος ουδός δεν οδηγεί σε αντιστοίχιση μιας τιμής Cq στο βοθρίο από το λογισμικό (επειδή ο θόρυβος σήματος υποβάθρου τέμνει τη γραμμή ουδού). Αν συμβεί κάτι τέτοιο, προσπαθήστε να τροποποιήσετε άλλες ρυθμίσεις ανάλυσης για το συγκεκριμένο βοθρίο, π.χ. προσαρμόζοντας τη ρύθμιση Baseline Correction.</p>
Πολύ χαμηλή	Ορισμένα διαγράμματα δεν είναι πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου	<ul style="list-style-type: none"> Αυξήστε τον ουδό σε τιμή ακριβώς πάνω από το επίπεδο θορύβου υποβάθρου.

Βήμα 3. Επαλήθευση των αποτελεσμάτων στο βοθρίο NTC

13 Στο Results Table, εντοπίστε την αντίδραση αρνητικού μάρτυρα (NTC) που βρίσκεται στο βοθρίο A12.

14 Βεβαιωθείτε ότι στη στήλη Cq και για τους τρεις στόχους εμφανίζεται η ένδειξη «No Cq» ή τιμή Cq >37,00.

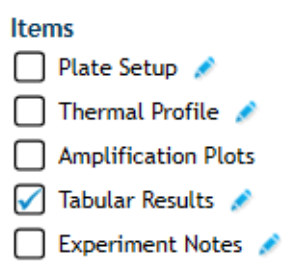
Αν η αντίδραση NTC έχει τιμή Cq $\leq 37,00$ για έναν από τους στόχους, τότε ενδέχεται να έχει προκληθεί μόλυνση του δείγματος. Ακυρώστε τη διαδικασία και επαναλάβετε την ανάλυση προσδιορισμού τηρώντας αυστηρά τις κατευθυντήριες οδηγίες.

Εξαγωγή των δεδομένων από το λογισμικό Aria

Βήμα 1. Ορισμός και αποθήκευση ρυθμίσεων εξαγωγής

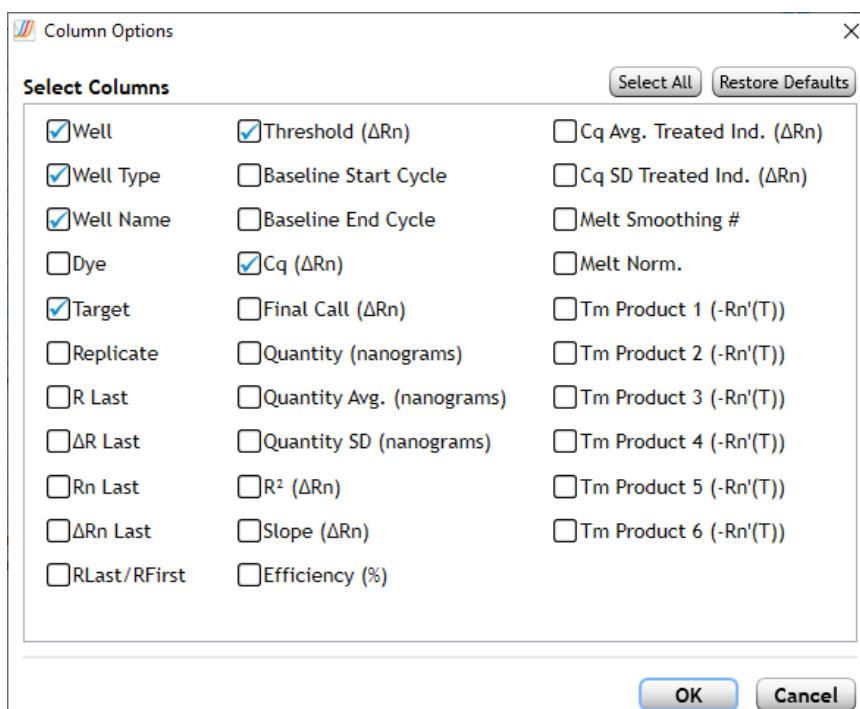
Αν οι ρυθμίσεις εξαγωγής έχουν ήδη αποθηκευτεί, μεταβείτε απευθείας στο «**Βήμα 2. Εξαγωγή δεδομένων**» στη σελίδα 54.

- 1 Στην αριστερή πλευρά της οθόνης, στην περιοχή **Results**, κάντε κλικ στο **Export Data**.
Ανοίγει η οθόνη Export Data.
- 2 Στον πίνακα Export Configuration, επιλέξτε έναν τύπο αρχείου για τα εξαγόμενα δεδομένα, π.χ. **Excel**.
- 3 Στην περιοχή **Items**, βεβαιωθείτε ότι το πλαίσιο ελέγχου Tabular Results είναι επιλεγμένο. Αποεπιλέξτε τα πλαίσια ελέγχου για όλα τα υπόλοιπα στοιχεία. Ανατρέξτε στο **Σχήμα 24**.



Σχήμα 24 Οθόνη Export Data στο λογισμικό Aria – Στοιχεία προς εξαγωγή

- 4 Κάντε κλικ στο εικονίδιο μολυβιού δίπλα στα **Tabular Results** για να προσαρμόσετε τις στήλες δεδομένων που θα συμπεριληφθούν.
Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Column Options.
- 5 Προσαρμόστε τις ρυθμίσεις ώστε μόνο οι στήλες που έχουν επιλεγεί για συμπερίληψη να είναι αυτές που εμφανίζονται στο **Σχήμα 25**.



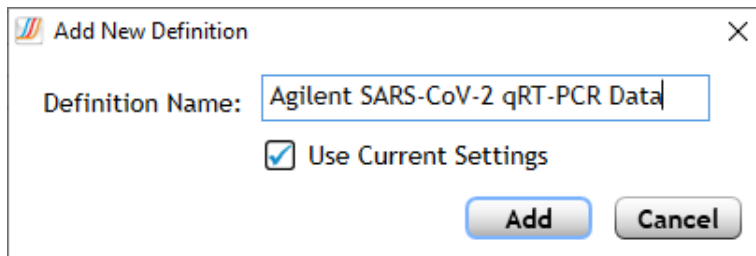
Επιλεγμένες
στήλες:

Well
Well Type
Well Name
Target
Threshold
Cq

Σχήμα 25 Πλαίσιο διαλόγου Column Options στο Aria

- 6 Κάντε κλικ στο **OK** για να αποθηκεύσετε τις αλλαγές σας και κλείστε το πλαίσιο διαλόγου.
- 7 Αποθηκεύστε τις ρυθμίσεις εξαγωγής ως νέο ορισμό.
 - a Στον πίνακα Export Configuration, επεκτείνετε την αναπτυσσόμενη λίστα Definition.
 - b Κάντε κλικ στο **Add New**.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Add New Definition.
 - c Στο πεδίο Definition Name, πληκτρολογήστε **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**. Ανατρέξτε στο **Σχήμα 26**.
 - d Βεβαιωθείτε ότι το πλαίσιο ελέγχου Use Current Settings είναι επιλεγμένο.
 - e Κάντε κλικ στο **Add**.



Σχήμα 26 Πλαίσιο διαλόγου Add New Definition στο Aria

Βήμα 2. Εξαγωγή δεδομένων

- 8 Στον πίνακα Export Configuration, βεβαιωθείτε ότι η αναπτυσσόμενη λίστα Definition έχει οριστεί σε **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**.
- 9 Κάντε κλικ στο **Export Data**.

Η αναφορά ανοίγει στην προεπιλεγμένη εφαρμογή για τον επιλεγμένο τύπο αρχείου.
- 10 Ελέγξτε τα δεδομένα Cq για κάθε δείγμα εξέτασης και μάρτυρα για να ερμηνεύσετε τα αποτελέσματα. Βλ. **Κεφάλαιο 6**, «Ανάλυση και αποτελέσματα».

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο όργανο ABI 7500 Fast Real Time PCR

Αυτή η ενότητα περιγράφει τη διαδικασία για την εκτέλεση του προγράμματος qRT-PCR σε ένα όργανο Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR.

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο όργανο ABI 7500 Fast Real Time PCR

- 1 Βεβαιωθείτε ότι το όργανο ABI 7500 Fast είναι ενεργοποιημένο.
- 2 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος στο όργανο, ανοίξτε το πείραμα που δημιουργήσατε νωρίτερα στο λογισμικό 7500.
- 3 Στο όργανο, πιέστε την πόρτα του δίσκου για να ανοίξετε το καπάκι. Τοποθετήστε την πλάκα αντίδρασης στο σύστημα θερμοαντιδραστήριας πλάκας του οργάνου.
- 4 Πιέστε την πόρτα του δίσκου για να κλείσετε το καπάκι.
- 5 Στον υπολογιστή, κάντε κλικ στο **START RUN**.
Το όργανο ξεκινά την εκτέλεση του πειράματος.

Αντιστοίχιση ρυθμίσεων ανάλυσης δεδομένων για το πείραμα ABI 7500 Fast

Βήμα 1. Προβολή διαγραμμάτων ενίσχυσης για όλους τους στόχους σε όλα τα βοηθία

- 1 Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, ανοίξτε το πείραμα στην εφαρμογή λογισμικού Design & Analysis.
- 2 Στο πάνω μέρος της οθόνης, κάντε κλικ στην καρτέλα Quality Check, εάν δεν είναι ήδη επιλεγμένη. Στην αναπτυσσόμενη λίστα, βεβαιωθείτε ότι έχει επιλεγεί το **Amplification Plot**.

Στην οθόνη εμφανίζονται τα διαγράμματα ενίσχυσης, ένας πίνακας των αποτελεσμάτων σε κάθε βοηθίο και ένα διάγραμμα του χάρτη πλακών.

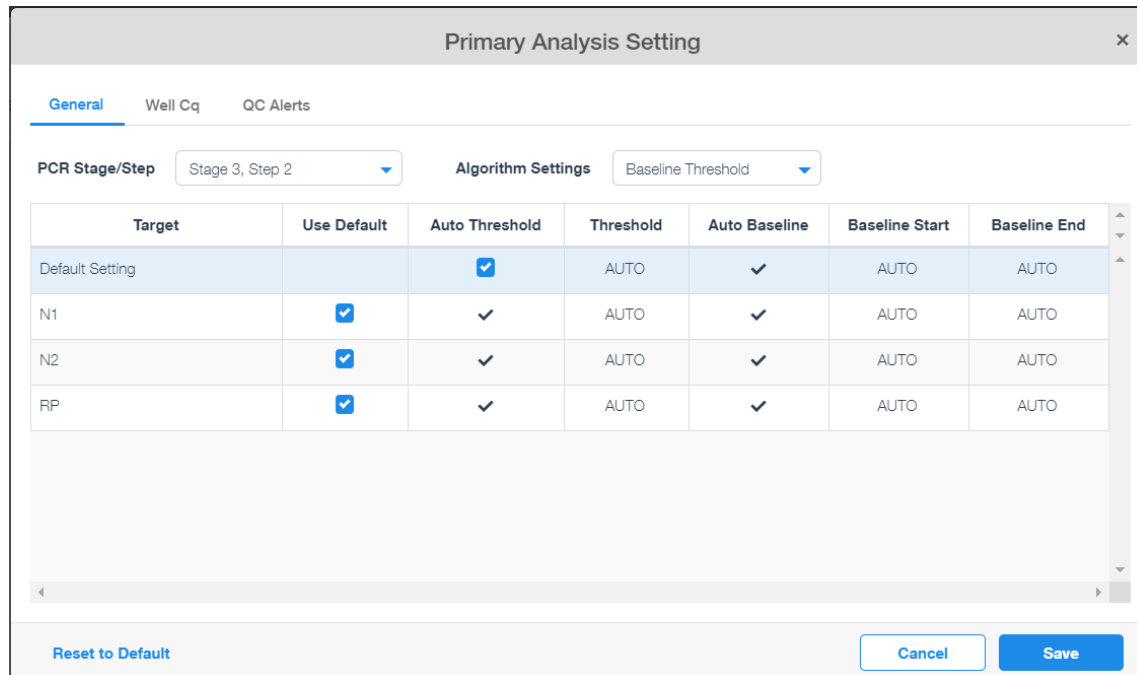
ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Αν η πλάκα περιέχει κενά βοηθία, παραλείψτε όλους τους στόχους για τα συγκεκριμένα βοηθία από την ανάλυση και αναλύστε ξανά.

- 3 Κάντε κλικ στο **Actions > Primary Analysis Setting**.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Primary Analysis Settings. Οι προεπιλεγμένες ρυθμίσεις σε αυτό το πλαίσιο διαλόγου εμφανίζονται στο **Σχήμα 27**.

- 4 Βεβαιωθείτε ότι η ρύθμιση αντιστοιχεί σε αυτές που εμφανίζονται στο **Σχήμα 27**. Αν είναι απαραίτητο, κάντε κλικ στο **Reset to Default**.



Σχήμα 27 Προεπιλεγμένες ρυθμίσεις στο πλαίσιο διαλόγου Primary Analysis Setting του Design & Analysis

5 Κάντε κλικ στο **Save**.

Το πλαίσιο διαλόγου Primary Analysis Setting κλείνει.

6 Βεβαιωθείτε ότι στη γωνία του κουμπιού Analyze υπάρχει ένα πράσινο σημάδι επιλογής. Διαφορετικά, κάντε κλικ στο **Analyze**.

7 Ελέγξτε αν υπάρχουν διαγράμματα ενίσχυσης με πρώιμη ενίσχυση (δηλ. πριν από τον κύκλο 9). Παραλείψτε τυχόν δείγματα εξέτασης με πρώιμη ενίσχυση από την ανάλυση και επαναλάβετε την εξέταση σε χαμηλότερη συγκέντρωση.

Στα δείγματα εξέτασης με ασυνήθιστα υψηλές συγκεντρώσεις ιικού RNA, η ενίσχυση των ικών στόχων μπορεί να φτάσει σε ανιχνεύσιμα επίπεδα σε πολύ πρώιμο αριθμό κύκλου (<9). Στο πλαίσιο των υπολογισμών διόρθωσης γραμμής βάσης, το λογισμικό μπορεί να ερμηνεύσει τα σήματα πρώιμης ενίσχυσης αυτού του τύπου ως θόρυβο υποβάθρου και να μην αντιστοιχίσει μια τιμή Cq στους ικούς στόχους σε αυτά τα δείγματα.

Ελέγξτε αν υπάρχουν δείγματα εξέτασης αυτού του τύπου εμφανίζοντας το γράφημα Amplification Plot χωρίς διόρθωση γραμμής βάσης (ρυθμίστε το **Y Value** σε **Rn**). Αν κάποιο από τα δείγματα εξέτασης εμφανίζει ενδείξεις ενίσχυσης πριν από τον κύκλο 9, τότε αφαιρέστε αυτά τα βοηθία από την ανάλυση παραλείποντάς τα στην οθόνη Quality Check. Επαναλάβετε την ανάλυση της αντίδρασης qRT-PCR για το δείγμα αραιώνοντας το νουκλειϊκό οξύ σε αναλογία 1:100 χρησιμοποιώντας το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.

Βήμα 2. Αξιολόγηση τιμών ουδού

8 Κάντε κλικ στο εικονίδιο Settings ακριβώς πάνω από το γράφημα Amplification Plot.

Το πλαίσιο διαλόγου Settings ανοίγει στην καρτέλα General.

9 Βεβαιωθείτε ότι η ρύθμιση Y Value έχει οριστεί σε **ΔRn**.

10 Στην αναπτυσσόμενη λίστα Y Scale, εκτελέστε εναλλαγή της επιλογής από **Linear** σε **Log**, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 28**.

Η προβολή του γραφήματος Amplification Plots σε λογαριθμικές τιμές βελτιώνει την προβολή του θορύβου σήματος υποβάθρου. Ένα παράδειγμα φαίνεται στο **Σχήμα 29**. Η γραμμή ουδού για κάθε στόχο εμφανίζεται ως οριζόντια γραμμή.

General X Axis Y Axis

Plot Title Amplification Plot

Color By Target

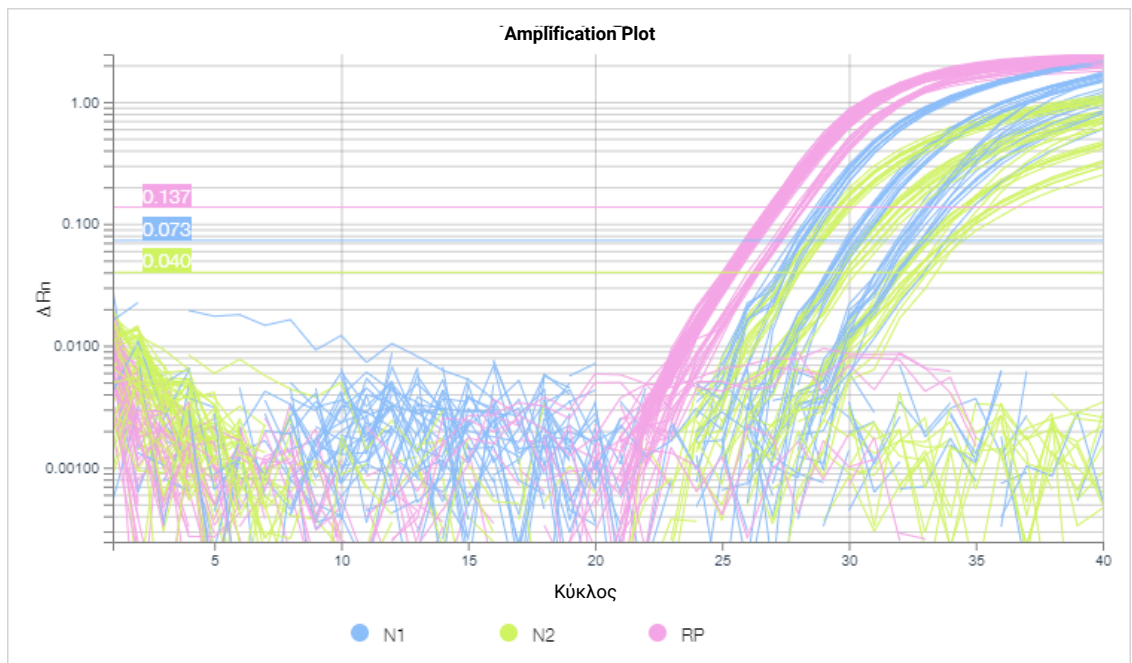
Y Value ΔRn Rn

Y Scale Log

Show Legend Cq Mark
 Unselected Tooltip
 Replicates of selected
 Threshold Baseline

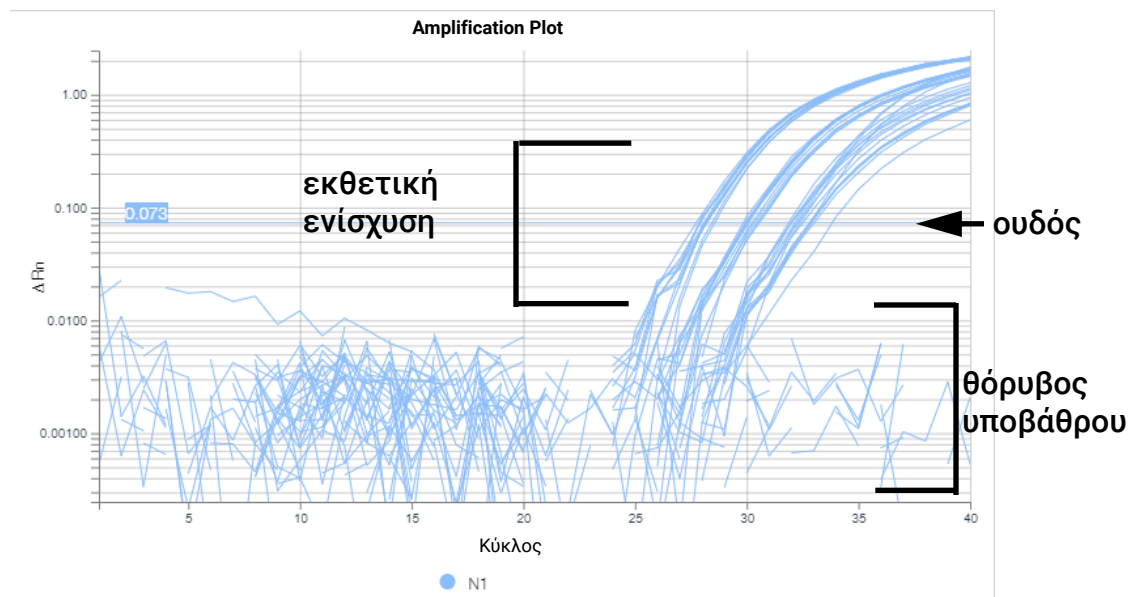
[Reset Setting](#)

Σχήμα 28 Ρυθμίσεις General για το γράφημα Amplification Plot στο Design & Analysis



Σχήμα 29 Γράφημα Amplification Plots στο Design & Analysis σε λογαριθμική κλίμακα – οι ουδοί-στόχοι εμφανίζονται ως οριζόντιες γραμμές

- 11** Αξιολογήστε οπτικά τα διαγράμματα ενίσχυσης και τον προεπιλεγμένο ουδό για τον στόχο N1.
- Στην αριστερή πλευρά της οθόνης, επεκτείνετε την αναπτυσσόμενη λίστα Targets.
 - Επιλέξτε μόνο τον στόχο N1 και, στη συνέχεια, συμπύξτε την αναπτυσσόμενη λίστα.
 - Καθορίστε αν ο ουδός είναι αρκετά υψηλός ώστε να είναι πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου και αρκετά χαμηλός, ώστε να συμπεριληφθούν διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης (ανατρέξτε στο **Σχήμα 30**). Με βάση αυτήν την αξιολόγηση, προχωρήστε σύμφωνα με τις οδηγίες που περιλαμβάνει ο **Πίνακας 14**.
- 12** Επαναλάβετε το **βήμα 11** για τον στόχο N2 και ξανά για τον στόχο RP.
- 13** Στην αριστερή πλευρά της οθόνης, στην περιοχή **Targets**, κάντε κλικ στο **Clear all** για να καταργήσετε το φιλτράρισμα κατά στόχο.



Σχήμα 30 Γράφημα Amplification Plots στο Design & Analysis για στόχο N1

Πίνακας 14 Επαλήθευση βέλτιστης ρύθμισης ουδού στο λογισμικό Design & Analysis

Θέση ουδού	Περιγραφή	Ενέργεια
Βέλτιστη θέση	Πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου και περιλαμβάνει όλα τα διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης	<ul style="list-style-type: none"> Αφήστε τους ουδούς στις τρέχουσες τιμές τους.
Πολύ υψηλή	Ορισμένα διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης δεν περνούν τη γραμμή ουδού	<ul style="list-style-type: none"> Αναζητήστε βοθρία με εξαιρετικά υψηλό θόρυβο υποβάθρου. Λόγω αυτών των βοθρίων με ακραίες τιμές, το λογισμικό μπορεί να ρυθμίσει τον ουδό σε πολύ υψηλή τιμή. Επιλέξτε το βοθρίο με ακραίες τιμές στον χάρτη πλάκας. Στη γραμμή εργαλείων ακριβώς πάνω από τον χάρτη πλάκας, κάντε κλικ στο κουμπί με τις τρεις κουκκίδες. Στο μενού που θα ανοίξει, κάντε κλικ στο Omit Wells. Κάντε κλικ στο Analyze. Το λογισμικό θα υπολογίσει εκ νέου τον ουδό μόλις εξαιρεθεί το βοθρίο με ακραίες τιμές. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήστε το ποντίκι για να μετακινήσετε χειροκίνητα τη γραμμή ουδού στο γράφημα, σε νέα θέση. Επιλέξτε όλα τα βοθρία στον χάρτη πλάκας για να εμφανίσετε όλα τα διαγράμματα ενίσχυσης. Βεβαιωθείτε ότι ο νέος ουδός βρίσκεται σε βέλτιστη θέση. Κάντε ξανά κλικ στο κουμπί με τις τρεις κουκκίδες. Στο μενού που θα ανοίξει, κάντε κλικ στο Unomit Wells για να συμπεριλάβετε ξανά το βοθρίο με ακραίες τιμές στην ανάλυση.* <p>* Αν το διάγραμμα ενίσχυσης για το βοθρίο με ακραίες τιμές δεν εμφανίζει εκθετική ενίσχυση σε κανέναν αριθμό κύκλου, τότε βεβαιωθείτε ότι ο χαμηλότερος ουδός δεν οδηγεί σε αντιστοίχιση μιας τιμής Cq στο βοθρίο από το λογισμικό (επειδή ο θόρυβος σήματος υποβάθρου τέμνει τη γραμμή ουδού). Αν συμβεί κάτι τέτοιο, προσπαθήστε να τροποποιήσετε άλλες ρυθμίσεις ανάλυσης για το συγκεκριμένο βοθρίο, π.χ. προσαρμόζοντας τους αριθμούς κύκλου Baseline Start ή/και Baseline End.</p>
Πολύ χαμηλή	Ορισμένα διαγράμματα δεν είναι πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου	<ul style="list-style-type: none"> Αυξήστε τον ουδό σε τιμή ακριβώς πάνω από το επίπεδο θορύβου υποβάθρου.

Βήμα 3. Επαλήθευση των αποτελεσμάτων στο βοθρίο NTC

14 Στο Well Table, εντοπίστε την αντίδραση αρνητικού μάρτυρα (NTC) που βρίσκεται στο βοθρίο A12.

15 Βεβαιωθείτε ότι στη στήλη Cq και για τους τρεις στόχους εμφανίζεται η ένδειξη «Undetermined» ή τιμή Cq >37,00.

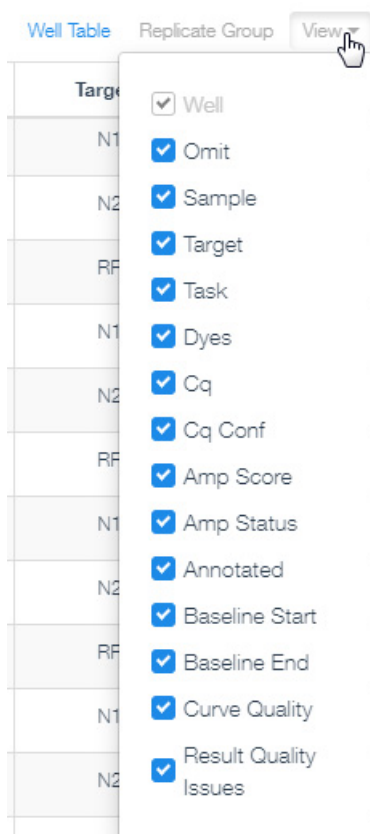
Αν η αντίδραση NTC έχει τιμή Cq ≤ 37,00 για έναν από τους στόχους, τότε ενδέχεται να έχει προκληθεί μόλυνση του δείγματος. Ακυρώστε τη διαδικασία και επαναλάβετε την ανάλυση προσδιορισμού τηρώντας αυστηρά τις κατευθυντήριες οδηγίες.

Εξαγωγή δεδομένων Well Table από το λογισμικό Design & Analysis σε ένα αρχείο CSV

Βήμα 1. Προσαρμογή των στηλών που περιλαμβάνονται στο Well Table

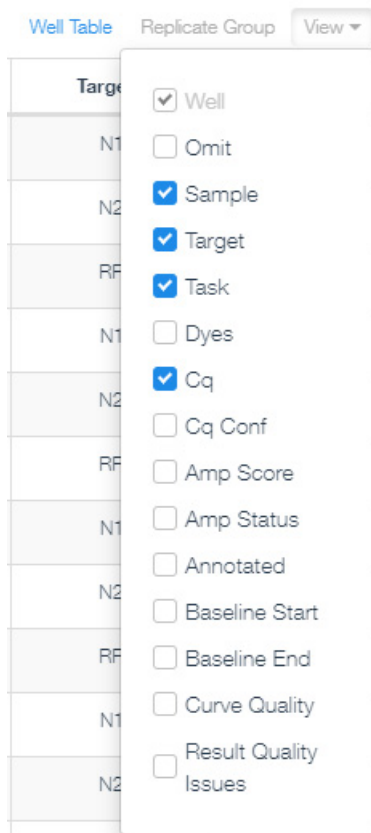
- 1 Στη γραμμή εργαλείων ακριβώς πάνω από το Well Table, κάντε κλικ στο **View**.

Ανοίγει ένα μενού, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 31**, με όλες τις διαθέσιμες στήλες πίνακα.



Σχήμα 31 Μενού View για το Well Table στο Design & Analysis – προεπιλεγμένη επιλογή στηλών

- 2 Προσαρμόστε τις ρυθμίσεις ώστε οι μόνες στήλες που έχουν επιλεγεί για συμπερίληψη να είναι οι στήλες Well, Sample, Target, Task και Cq. Ανατρέξτε στο **Σχήμα 32**.



Επιλεγμένες στήλες:

Sample

Target

Task

Cq

Σχήμα 32 Μενού View για το Well Table στο Design & Analysis – προσαρμοσμένη επιλογή στηλών

3 Κάντε κλικ στο **View** για να συμπτύξετε το μενού.

Βήμα 2. Εξαγωγή δεδομένων

4 Στη γραμμή εργαλείων ακριβώς πάνω από το Well Table, κάντε κλικ στο κουμπί της γραμμής εργαλείων με τις τρεις κουκκίδες. ●●●

5 Στο μενού που θα ανοίξει, κάντε κλικ στο **Export**.

Ανοίγει ένα πλαίσιο διαλόγου για αποθήκευση του αρχείου CSV.

6 Επιλέξτε έναν φάκελο για το αρχείο.

7 Στο πεδίο File name, πληκτρολογήστε ένα όνομα για το αρχείο.

8 Κάντε κλικ στο **Save**.

Το πλαίσιο διαλόγου κλείνει, το πρόγραμμα εξαγάγει τα δεδομένα στο αρχείο τύπου CSV και τα αποθηκεύει στον καθορισμένο φάκελο.

9 Ανοίξτε το αρχείο και ελέγξτε τα δεδομένα Cq για κάθε δείγμα εξέτασης και μάρτυρα για να ερμηνεύσετε τα αποτελέσματα. Βλ. [Κεφάλαιο 6](#), «Ανάλυση και αποτελέσματα».

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα ανίχνευσης Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR

Αυτή η ενότητα περιγράφει τη διαδικασία για την εκτέλεση του προγράμματος qRT-PCR σε ένα σύστημα ανίχνευσης Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR.

Εκτέλεση προγράμματος qRT-PCR στο σύστημα ανίχνευσης CFX96 Touch Real-Time PCR

- 1 Βεβαιωθείτε ότι το όργανο CFX96 Touch είναι ενεργοποιημένο.
- 2 Από τον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος στο όργανο, ανοίξτε το πείραμα που δημιουργήσατε νωρίτερα στην εφαρμογή λογισμικού CFX Maestro.
- 3 Μεταβείτε στην καρτέλα Start Run της οθόνης Run Setup.
Αν το όργανο είναι ενεργοποιημένο, αλλά δεν εμφανίζεται στην περιοχή **Block Name**, τότε κάντε κλικ στο **Detect Instrument (s)** στην πάνω αριστερή γωνία της οθόνης.
- 4 Στον πίνακα, επιλέξτε το όργανο που θα χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση του πειράματος.
- 5 Κάντε κλικ στο **Open Lid**.
Το καπάκι του οργάνου ανοίγει.
- 6 Τοποθετήστε την πλάκα αντίδρασης στο σύστημα θερμαντικής πλάκας του οργάνου.
- 7 Στον υπολογιστή, κάντε κλικ στο **Close Lid**.
Το καπάκι του οργάνου κλείνει.
- 8 Κάντε κλικ στο **Start Run**.
- 9 Αποθηκεύστε το αρχείο ανάλυσης στον επιθυμητό φάκελο. Καταχωρίστε ένα όνομα αρχείου και κάντε κλικ στο **Save**.
Το όργανο ξεκινά την εκτέλεση του πειράματος.

Αντιστοίχιση ρυθμίσεων ανάλυσης δεδομένων για το σύστημα ανίχνευσης CFX96 Touch Real-Time PCR

Βήμα 1. Προβολή διαγραμμάτων ενίσχυσης για όλους τους στόχους σε όλα τα βοηθία

- 1 Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, ανοίξτε το πείραμα στην εφαρμογή λογισμικού CFX Maestro.
Το πείραμα ανοίγει στο παράθυρο Data Analysis.
- 2 Στο πάνω μέρος της οθόνης, κάντε κλικ στην καρτέλα Quantification, εάν δεν είναι ήδη επιλεγμένη.
Στο παράθυρο εμφανίζονται τα διαγράμματα ενίσχυσης, ένας πίνακας των αποτελεσμάτων σε κάθε βοθηό και ένα διάγραμμα του χάρτη πλακών.

- 3 Ενεργοποιήστε τη λειτουργία Fluorescence Drift Correction.
 - Στο πάνω μέρος του παραθύρου Data Analysis, κάντε κλικ στο **Settings > Baseline Settings > Apply Fluorescence Drift Correction**.

Το λογισμικό διορθώνει αυτόματα τυχόν μετατόπιση του σήματος φθορισμού που ενδέχεται να υπάρχει στο εύρος κύκλων γραμμής βάσης.

- 4 Ελέγξτε αν υπάρχουν διαγράμματα ενίσχυσης με πρώιμη ενίσχυση (δηλ. πριν από τον κύκλο 9). Εξαιρέστε τυχόν δείγματα εξέτασης με πρώιμη ενίσχυση από την ανάλυση και επαναλάβετε την εξέταση σε χαμηλότερη συγκέντρωση.

Στα δείγματα εξέτασης με ασυνήθιστα υψηλές συγκεντρώσεις ιικού RNA, η ενίσχυση των ιικών στόχων μπορεί να φτάσει σε ανιχνεύσιμα επίπεδα σε πολύ πρώιμο αριθμό κύκλου (<9). Στο πλαίσιο των υπολογισμών διόρθωσης γραμμής βάσης, το λογισμικό μπορεί να ερμηνεύσει τα σήματα πρώιμης ενίσχυσης αυτού του τύπου ως θόρυβο υποβάθρου και να μην αντιστοιχίσει μια τιμή C_q στους ιικούς στόχους σε αυτά τα δείγματα.

Ελέγξτε αν υπάρχουν δείγματα εξέτασης αυτού του τύπου εμφανίζοντας τα διαγράμματα ενίσχυσης χωρίς διόρθωση γραμμής βάσης (ρυθμίστε το **Baseline Setting** σε **No Baseline Subtraction**). Αν κάποιο από τα δείγματα εξέτασης παρουσιάζει ενδείξεις ενίσχυσης πριν από τον κύκλο 9, τότε αφαιρέστε αυτά τα βοηθία από την ανάλυση από το παράθυρο Plate Editor. Επαναλάβετε την ανάλυση της αντίδρασης qRT-PCR για το δείγμα αραιώνοντας το νουκλεϊκό οξύ σε αναλογία 1:100 χρησιμοποιώντας το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.


Βήμα 2. Αξιολόγηση τιμών ουδού

- 5 Ελέγξτε την επιλογή στο **Settings > Baseline Setting** για να βεβαιωθείτε ότι έχει ρυθμιστεί σε **Baseline Subtracted Curve Fit**.
- 6 Κάντε δεξιά κλικ στο γράφημα Amplification και επιλέξτε το **Show Threshold Values** (εάν δεν έχει ήδη επιλεγεί).

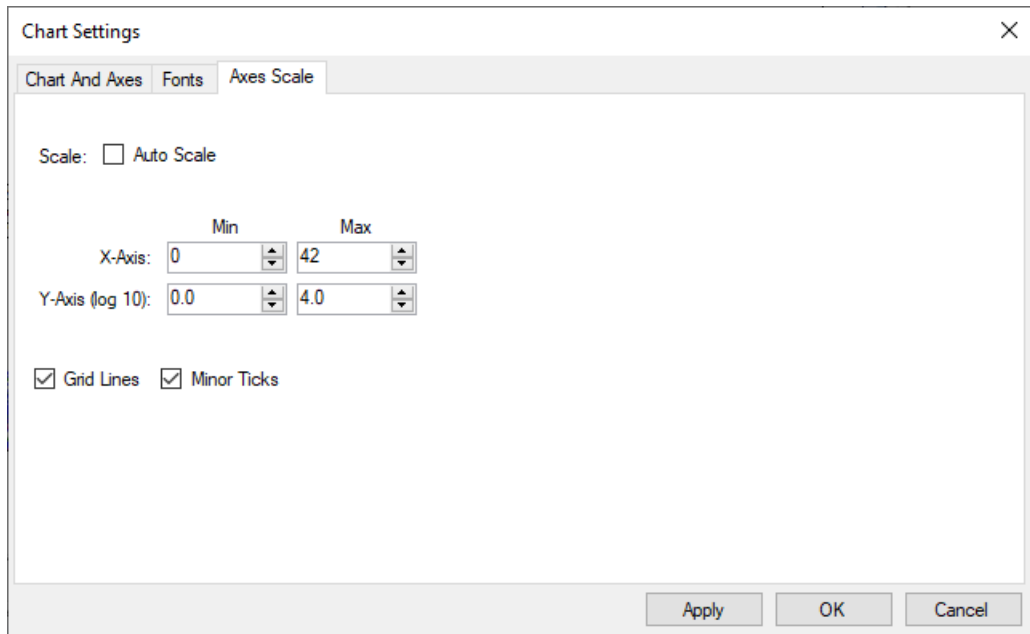
Η γραμμή ουδού για κάθε στόχο εμφανίζεται ως οριζόντια γραμμή.

- 7 Κοντά στην κάτω δεξιά γωνία του γραφήματος Amplification, επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου Log.

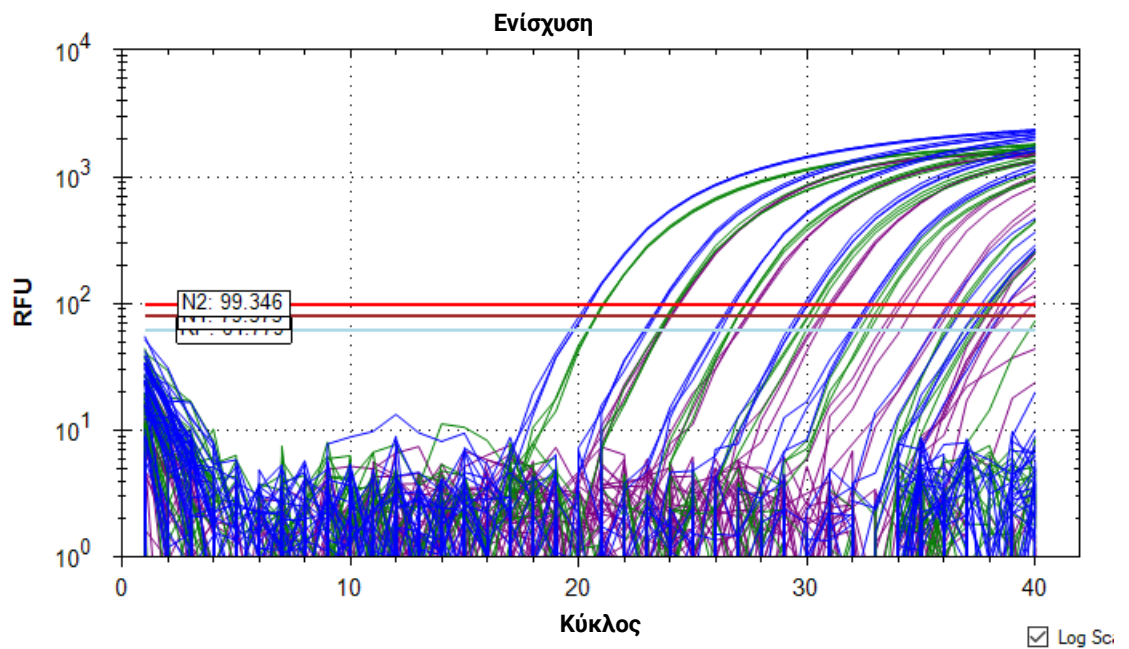
Η προβολή των διαγραμμάτων ενίσχυσης σε λογαριθμικές τιμές βελτιώνει την προβολή του θορύβου σήματος υποβάθρου.

- 8 Ρυθμίστε την ελάχιστη τιμή για τον άξονα Y σε 0,0.
 - a Στα δεξιά του γραφήματος Amplification, κάντε κλικ στο εικονίδιο Chart Settings. 
 - Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Chart Settings.
 - b Κάντε κλικ στην καρτέλα Axes Scale.
 - c Αποεπιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου Auto Scale.
 - d Στη στήλη **Min** για το **Y-Axis (log 10)**, πληκτρολογήστε **0.0**, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 33**.
 - e Κάντε κλικ στο **OK**.

Το παράθυρο διαλόγου κλείνει και η κλίμακα του άξονα Y ξεκινά από την τιμή 0,0, ώστε να είναι δυνατή η εμφάνιση του θορύβου σήματος στα διαγράμματα. Ένα παράδειγμα φαίνεται στο **Σχήμα 34**.

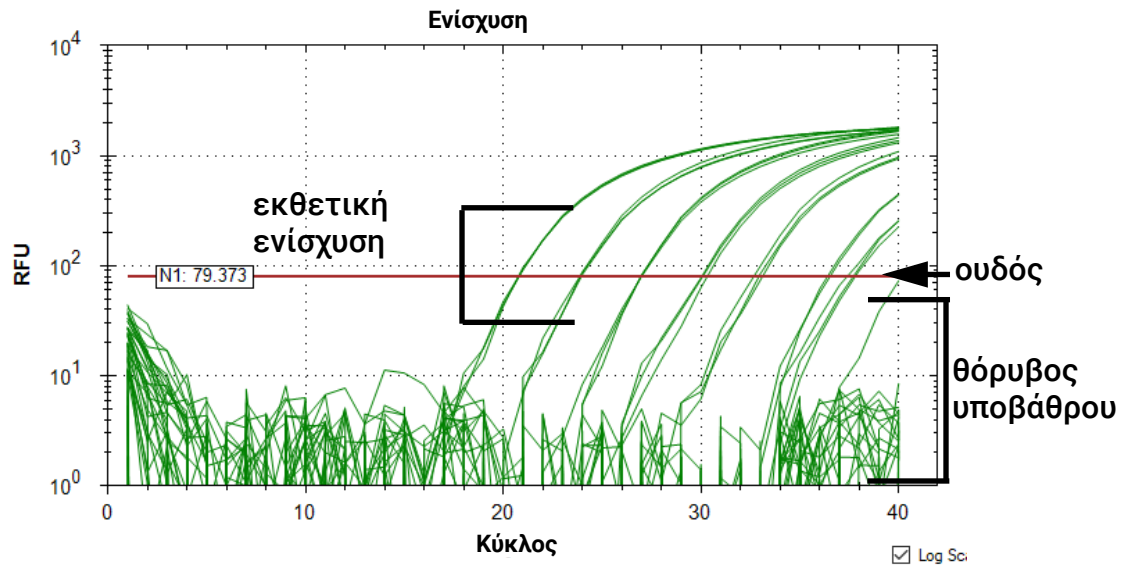


Σχήμα 33 Πλαίσιο διαλόγου Chart Settings στο Maestro – καρτέλα Axes Scale



Σχήμα 34 Γράφημα Amplification στο Maestro σε λογαριθμική κλίμακα – οι ουδοί-στόχοι εμφανίζονται ως οριζόντιες γραμμές

- 9 Αξιολογήστε οπτικά τα διαγράμματα ενίσχυσης και τον προεπιλεγμένο ουδό για τον στόχο N1.
- Κάτω από το γράφημα Amplification, χρησιμοποιήστε τα πλαίσια ελέγχου για να επιλέξετε μόνο τον στόχο FAM (N1) για εμφάνιση.
 - Καθορίστε αν ο ουδός είναι αρκετά υψηλός ώστε να είναι πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου και αρκετά χαμηλός ώστε να συμπεριληφθούν διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης (ανατρέξτε στο **Σχήμα 35**). Με βάση αυτήν την αξιολόγηση, προχωρήστε σύμφωνα με τις οδηγίες που περιλαμβάνει ο **Πίνακας 15**.
- 10 Επαναλάβετε το **βήμα 11** για τον στόχο N2 και ξανά για τον στόχο RP.



Σχήμα 35 Γράφημα Amplification στο Maestro για στόχο N1

Πίνακας 15 Επαλήθευση βέλτιστης ρύθμισης ουδού στο λογισμικό Design & Analysis

Θέση ουδού	Περιγραφή	Ενέργεια
Βέλτιστη θέση	Πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου και περιλαμβάνει όλα τα διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης	<ul style="list-style-type: none"> Αφήστε τους ουδούς στις τρέχουσες τιμές τους.
Πολύ υψηλή	Ορισμένα διαγράμματα στη φάση εκθετικής ενίσχυσης δεν περνούν τη γραμμή ουδού	<ul style="list-style-type: none"> Αναζητήστε βοθρία με εξαιρετικά υψηλό θόρυβο υποβάθρου. Λόγω αυτών των βοθρίων με ακραίες τιμές, το λογισμικό μπορεί να ρυθμίσει τον ουδό σε πολύ υψηλή τιμή. Κάντε κλικ στο Plate Setup > View/Edit Plate για να ανοίξετε το Plate Editor. Επιλέξτε το βοθρίο με ακραίες τιμές στον χάρτη πλάκας. Στον πίνακα στη δεξιά πλευρά του Plate Editor, επιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου με την ένδειξη Exclude Wells in Analysis (βρίσκεται στο κάτω μέρος του πίνακα). Κάντε κλικ στο OK. Όταν ερωτηθείτε εάν θέλετε να εφαρμόσετε τις αλλαγές, κάντε κλικ στο Yes. Το λογισμικό θα υπολογίσει εκ νέου τον ουδό μόλις εξαιρεθεί το βοθρίο με ακραίες τιμές. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήστε το ποντίκι για να μετακινήσετε χειροκίνητα τη γραμμή ουδού στο γράφημα, σε νέα θέση. Στη δεξιά πλευρά του γραφήματος Amplification, κάντε κλικ στο εικονίδιο Baseline Threshold για να ανοίξετε το πλαίσιο διαλόγου Baseline Threshold. Στην περιοχή Single Threshold, αλλάξτε την επιλογή από Auto Calculated σε User Defined. (Με αυτόν τον τρόπο, το λογισμικό δεν θα υπολογίσει εκ νέου τον ουδό μόλις συμπεριληφθεί ξανά το βοθρίο με ακραίες τιμές.) Κάντε κλικ στο OK για να κλείσετε το πλαίσιο διαλόγου. Κάντε κλικ στο Plate Setup > View/Edit Plate για να ανοίξετε ξανά το Plate Editor. Επιλέξτε το βοθρίο με ακραίες τιμές και αποεπιλέξτε το πλαίσιο ελέγχου Exclude Wells in Analysis. Κάντε κλικ στο OK και, στη συνέχεια, στο Yes. Στον χάρτη πλάκας στην περιοχή του γραφήματος Amplification, επιλέξτε όλα τα βοθρία για να συμπεριλάβετε εκ νέου το βοθρίο με ακραίες τιμές στην ανάλυση.* <p>* Αν το διάγραμμα ενίσχυσης για το βοθρίο με ακραίες τιμές δεν εμφανίζει εκθετική ενίσχυση σε κανέναν αριθμό κύκλου, τότε βεβαιωθείτε ότι ο χαμηλότερος ουδός δεν οδηγεί σε αντιστοίχιση μιας τιμής C_q στο βοθρίο από το λογισμικό (επειδή ο θόρυβος σήματος υποβάθρου τέμνει τη γραμμή ουδού). Αν συμβεί κάτι τέτοιο, προσπαθήστε να τροποποιήσετε άλλες ρυθμίσεις ανάλυσης για το συγκεκριμένο βοθρίο, π.χ. προσαρμόζοντας τους αριθμούς κύκλου Baseline Begin ή/και Baseline End.</p>
Πολύ χαμηλή	Ορισμένα διαγράμματα δεν είναι πάνω από τον θόρυβο υποβάθρου	<ul style="list-style-type: none"> Αυξήστε τον ουδό σε τιμή ακριβώς πάνω από το επίπεδο θορύβου υποβάθρου.

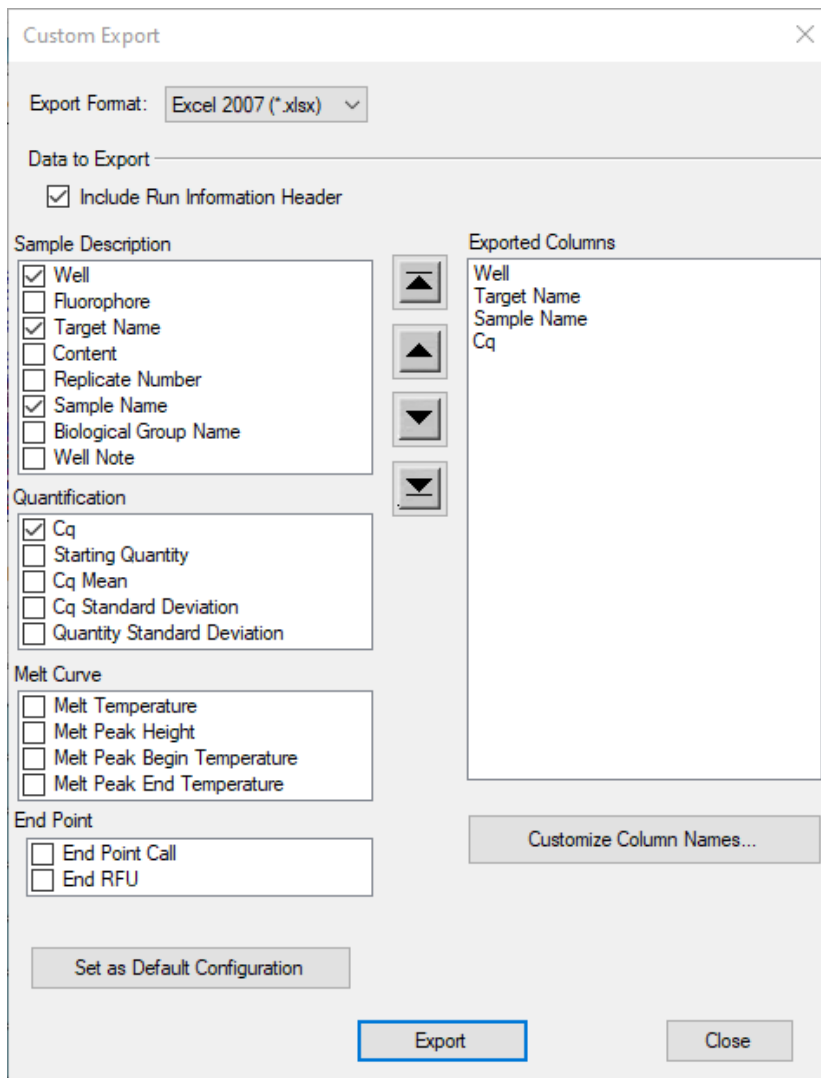
Βήμα 3. Επαλήθευση των αποτελεσμάτων στο βοηθίο NTC

- 11 Στον πίνακα αποτελεσμάτων, εντοπίστε την αντίδραση αρνητικού μάρτυρα (NTC) που βρίσκεται στο βοηθίο A12.
- 12 Βεβαιωθείτε ότι στη στήλη Cq και για τους τρεις στόχους εμφανίζεται η ένδειξη «N/A» ή τιμή Cq >37,00.

Αν η αντίδραση NTC έχει τιμή Cq \leq 37,00 για έναν από τους στόχους, τότε ενδέχεται να έχει προκληθεί μόλυνση του δείγματος. Ακυρώστε τη διαδικασία και επαναλάβετε την ανάλυση προσδιορισμού τηρώντας αυστηρά τις κατευθυντήριες οδηγίες.

Εξαγωγή των δεδομένων από το λογισμικό CFX Maestro

- 1 Στο πάνω μέρος του παραθύρου Data Analysis, κάντε κλικ στο **Export > Custom Export**.
Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Custom Export.
- 2 Στο πεδίο Export Format, επιλέξτε έναν τύπο αρχείου για τα εξαγόμενα δεδομένα, π.χ. **Excel 2007 (*.xlsx)**.
Βεβαιωθείτε ότι ο υπολογιστής σας διαθέτει το απαραίτητο λογισμικό για το άνοιγμα του επιλεγμένου τύπου αρχείου.
- 3 Στο πλαίσιο διαλόγου, επιλέξτε τα πλαίσια ελέγχου, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 36**. Ελέγξτε το τμήμα Exported Columns για να βεβαιωθείτε ότι εμφανίζονται οι στήλες **Well**, **Target Name**, **Sample Name** και **Cq**.



Σχήμα 36 Προσαρμοσμένες ρυθμίσεις εξαγωγής δεδομένων για την εφαρμογή CFX Maestro

4 Κάντε κλικ στο **Export**.

Ανοίγει το πλαίσιο διαλόγου Save As.

5 Επιλέξτε έναν φάκελο για το αρχείο.

6 Στο πεδίο File name, πληκτρολογήστε ένα όνομα για το αρχείο ή χρησιμοποιήστε το προεπιλεγμένο όνομα.

7 Κάντε κλικ στο **Save**.

Το πλαίσιο διαλόγου κλείνει, το πρόγραμμα εξαγάγει τα δεδομένα στον επιλεγμένο τύπο αρχείου και τα αποθηκεύει στον καθορισμένο φάκελο.

8 Ανοίξτε το αρχείο και ελέγξτε τα δεδομένα Cq για κάθε δείγμα εξέτασης και μάρτυρα για να ερμηνεύσετε τα αποτελέσματα. Βλ. [Κεφάλαιο 6](#), «Ανάλυση και αποτελέσματα».

6 Ανάλυση και αποτελέσματα

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων 70

Το κεφάλαιο περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης προσδιορισμού με βάση τα δεδομένα qRT-PCR.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Αποτελέσματα και ερμηνεία για δείγματα μάρτυρα

Αν κάποιος από τους μάρτυρες δεν παρουσιάζει την αναμενόμενη απόδοση, όπως περιγράφει ο Πίνακας 16, τότε η ανάλυση προσδιορισμού έχει ρυθμιστεί ή εκτελεστεί ακατάλληλα ή έχει προκύψει αποτυχία του αντιδραστηρίου ή δυσλειτουργία του εξοπλισμού. Σε αυτήν την περίπτωση, ακυρώστε τη διαδικασία και επαναλάβετε την ανάλυση προσδιορισμού.

Αρνητικός μάρτυρας (NTC)

Το NTC χρησιμοποιεί ύδωρ ελεύθερο νουκλεάσης στη αντίδραση qRT-PCR αντί για RNA. Η αντίδραση NTC δεν πρέπει να εμφανίζει καμπύλες ανάπτυξης φθορισμού που τέμνουν τη γραμμή οδού εντός 37,00 κύκλων για κανέναν από τους τρεις στόχους. Αν η αντίδραση NTC εμφανίζει καμπύλη ανάπτυξης με Cq $\leq 37,00$, τότε μπορεί να έχει προκύψει μόλυνση δείγματος. Ακυρώστε τη διαδικασία και επαναλάβετε την ανάλυση προσδιορισμού τηρώντας αυστηρά τις κατευθυντήριες οδηγίες.

SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx

Η αντίδραση qRT-PCR για το SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx παρέχει θετικό αποτέλεσμα με τους στόχους 2019-nCoV_N1 και 2019-nCoV_N2 με τιμή Cq μικρότερη ή ίση με 37,00 και αρνητικό αποτέλεσμα (αναφέρεται ως μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00) με τον στόχο ανθρώπινου γονιδίου RNase P.

Μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος

Ο μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος περιλαμβάνει μη μολυσματικά ανθρώπινα κύτταρα και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας της διαδικασίας εκχύλισης RNA για να καταδείξει την επιτυχή εκχύλιση του RNA και την ακεραιότητα του αντιδραστηρίου εκχύλισης. Η αντίδραση qRT-PCR για το RNA που εκχυλίστηκε από τον μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος πρέπει να παρέχει θετικό αποτέλεσμα με τον στόχο RP με τιμή Cq μικρότερη ή ίση με 37,00. Οι στόχοι N1 και N2 SARS-CoV-2 πρέπει να παρέχουν αρνητικά αποτελέσματα (αναφέρονται ως μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00).

Πίνακας 16 Αναμενόμενη απόδοση μαρτύρων

Τύπος μάρτυρα	Όνομα μάρτυρα	Χρησιμοποιείται για παρακολούθηση	Αποτέλεσμα στόχου N1	Αποτέλεσμα στόχου N2	Αποτέλεσμα στόχου RP
Θετικός	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Σημαντική αποτυχία αντιδραστηρίου συμπεριλαμβανομένης της ακεραιότητας των εκκινητών και των ιχνηθετών	Θετικός (Cq $\leq 37,00$)	Θετικός (Cq $\leq 37,00$)	Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)

Πίνακας 16 Αναμενόμενη απόδοση μαρτύρων (continued)

Τύπος μάρτυρα	Όνομα μάρτυρα	Χρησιμοποιείται για παρακολούθηση	Αποτέλεσμα στόχου N1	Αποτέλεσμα στόχου N2	Αποτέλεσμα στόχου RP
Αρνητικός	NTC	Μόλυνση αντιδραστηρίου ή/και περιβαλλοντική μόλυνση	Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)
Εκχύλιση	Μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος	Αποτυχία διαδικασίας λύσης και εκχύλισης, πιθανή μόλυνση κατά την εκχύλιση	Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Θετικός (Cq ≤37,00)

Αποτελέσματα και ερμηνεία για κλινικά δείγματα

Ο Πίνακας 17 αναφέρει τα αναμενόμενα αποτελέσματα για την ανάλυση προσδιορισμού. Αν ένα εργαστήριο λάβει μη αναμενόμενα αποτελέσματα για τους μάρτυρες της ανάλυσης προσδιορισμού ή αν ληφθούν ασαφή ή μη έγκυρα αποτελέσματα και το εργαστήριο δεν μπορεί να επιλύσει το πρόβλημα με επανεξέταση των δειγμάτων όπως συνιστάται, πρέπει να επικοινωνήσετε με το CDC για πληροφορίες και πιθανή μεταφορά των δειγμάτων.

Στόχος ανθρώπινου γονιδίου RNase P (RP)

Όλα τα κλινικά δείγματα πρέπει να εμφανίζουν καμπύλες ανάπτυξης φθορισμού για τον στόχο RP που τέμνουν τη γραμμή ουδού εντός 37,00 κύκλων (Cq ≤37,00), γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία ανθρώπινου γονιδίου RNase P. Η μη ανίχνευση του στόχου RP σε ένα από τα κλινικά δείγματα μπορεί να υποδηλώνει:

- Ακατάλληλη εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος από κλινικά υλικά με αποτέλεσμα την απώλεια RNA ή/και την αποδόμηση του RNA ή τη μεταφορά ανασταλτικών ουσιών.
- Απουσία επαρκούς ανθρώπινου κυτταρικού υλικού λόγω εσφαλμένης συλλογής ή απώλειας της ακεραιότητας δείγματος.
- Ακατάλληλη ρύθμιση και εκτέλεση της ανάλυσης προσδιορισμού.
- Αποτυχία αντιδραστηρίου ή δυσλειτουργία εξοπλισμού.

Αν η ανάλυση RP δεν παρέχει θετικά αποτελέσματα για ανθρώπινα κλινικά δείγματα, ερμηνεύστε τα αποτελέσματα ως εξής:

- Αν οι στόχοι N1 και N2 είναι θετικοί (Cq ≤37,00) ακόμη και αν δεν υπάρχει θετικό RP, τότε το αποτέλεσμα πρέπει να θεωρείται έγκυρο. Είναι πιθανό ορισμένα δείγματα να μην παρουσιάζουν καμπύλες ανάπτυξης RNase P λόγω χαμηλού αριθμού κυττάρων στο αρχικό κλινικό δείγμα ή λόγω ιικών στόχων που μειώνουν την απόδοση της ενίσχυσης RP, ειδικά σε δείγματα με υψηλό ιικό φορτίο. Ένα αρνητικό σήμα RP δεν αποκλείει την παρουσία RNA του ιού SARS-CoV-2 σε ένα κλινικό δείγμα.
- Αν ο στόχος RP είναι αρνητικός (μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00) και ένας ή και οι δύο στόχοι N1 και N2 είναι αρνητικοί (μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00), τότε το αποτέλεσμα πρέπει να θεωρείται άκυρο για το δείγμα. Αν υπάρχει υπολειπόμενο δείγμα, επαναλάβετε τη διαδικασία εκχύλισης και την εξέταση. Αν όλοι οι στόχοι παραμένουν αρνητικοί μετά την επανεξέταση, αναφέρετε τα αποτελέσματα ως μη έγκυρα και συλλέξτε νέο δείγμα, αν είναι δυνατό.

Στόχοι 2019-nCoV_N1 και 2019-nCoV_N2

- Όταν όλοι οι μάρτυρες εμφανίζουν την αναμενόμενη απόδοση, ένα δείγμα θεωρείται **θετικό** για τον ιό SARS-CoV-2 αν ικανοποιείται η παρακάτω προϋπόθεση.
 - Οι καμπύλες ανάπτυξης και για τους δύο στόχους N1 και N2 τέμνουν τη γραμμή ουδού εντός 37,00 κύκλων ($C_q \leq 37,00$). Ο στόχος RP μπορεί να είναι ή να μην είναι θετικός (βλ. περιγραφή παραπάνω), αλλά το αποτέλεσμα SARS-CoV-2 εξακολουθεί να είναι έγκυρο.
- Όταν όλοι οι μάρτυρες παρουσιάζουν την αναμενόμενη απόδοση, ένα δείγμα θεωρείται **αρνητικό** για τον ιό SARS-CoV-2 αν ικανοποιούνται ΚΑΙ ΟΙ ΔΥΟ παρακάτω προϋποθέσεις.
 - Οι καμπύλες ανάπτυξης για τους στόχους N1 και N2 ΔΕΝ τέμνουν τη γραμμή ουδού εντός 37,00 κύκλων (μη ανίχνευση C_q ή $C_q > 37,00$).
 - Η καμπύλη ανάπτυξης για τον στόχο RP ΔΕΝ τέμνει τη γραμμή ουδού εντός 37,00 κύκλων ($C_q \leq 37,00$).
- Όταν όλοι οι μάρτυρες παρουσιάζουν την αναμενόμενη απόδοση, ένα δείγμα θεωρείται **ασαφές** για τον ιό SARS-CoV-2 αν ικανοποιείται ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΔΥΟ παρακάτω προϋποθέσεις.
 - Η καμπύλη ανάπτυξης για έναν από τους στόχους 2019-nCoV τέμνει τη γραμμή ουδού εντός 37,00 κύκλων ($C_q \leq 37,00$), ενώ η καμπύλη ανάπτυξης για τον άλλο στόχο 2019-nCoV δεν τέμνει τη γραμμή ουδού εντός 37,00 κύκλων (μη ανίχνευση C_q ή $C_q > 37,00$). Η καμπύλη ανάπτυξης για τον στόχο RP τέμνει τη γραμμή ουδού εντός 37,00 κύκλων ($C_q \leq 37,00$).

Για ασαφή δείγματα, το εκχυλισμένο RNA από το δείγμα πρέπει να επανεξεταστεί. Αν δεν υπάρχει υπόλοιπο RNA, εκχυλίστε ξανά το RNA από το υπόλοιπο δείγμα και επανεξετάστε το. Αν προκύψει το ίδιο αποτέλεσμα, αναφέρετε το ασαφές αποτέλεσμα.

- Αν ο μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος είναι θετικός για N1 ή N2 ($C_q \leq 37,00$), τότε ενδέχεται να έχει προκληθεί μόλυνση κατά την εκχύλιση ή την επεξεργασία του δείγματος. Ακυρώστε όλα τα αποτελέσματα για δείγματα που εκχυλίζονται παράλληλα με τον μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος. Εκχυλίστε εκ νέου τα δείγματα και τον μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος και επαναλάβετε την εξέταση.

Πίνακας 17 Αναμενόμενα αποτελέσματα για την ανάλυση προσδιορισμού SARS-CoV-2 qRT-PCR

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Ανθρώπινο γονίδιο RNase P	Ερμηνεία αποτελεσμάτων*	Αναφορά	Ενέργειες
Θετικός (Cq ≤37,00)	Θετικός (Cq ≤37,00)	Θετικό ή αρνητικό	Ανίχνευση SARS-CoV-2	Θετικό για SARS-CoV-2	Αναφορά αποτελεσμάτων στο CDC και στον αποστολέα.
Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Θετικό (Cq ≤37,00)	Μη ανίχνευση SARS-CoV-2	Μη ανίχνευση	Αναφορά αποτελεσμάτων στον αποστολέα. Εξετάστε το ενδεχόμενο εξέτασης για άλλους αναπνευστικούς ιούς. [†]
Θετικός (Cq ≤37,00)	Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Θετικό (Cq ≤37,00)	Ασαφές αποτέλεσμα	Ασαφές	Επαναλάβετε την εξέταση του εκχυλισμένου δείγματος ή/και επαναλάβετε την εκχύλιση και τον κύκλο qRT-PCR.
Αρνητικός (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Θετικός (Cq ≤37,00)	Θετικό (Cq ≤37,00)	Ασαφές αποτέλεσμα	Ασαφές	Επαναλάβετε την εξέταση του εκχυλισμένου δείγματος ή/και επαναλάβετε την εκχύλιση και τον κύκλο qRT-PCR.
Αν ένας ή και οι δύο στόχοι 2019-nCoV είναι αρνητικοί (μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)		Αρνητικό (Μη ανίχνευση Cq ή Cq >37,00)	Μη έγκυρο αποτέλεσμα	Μη έγκυρο	Επαναλάβετε την εκχύλιση και τον κύκλο qRT-PCR. Αν το επαναλαμβανόμενο αποτέλεσμα παραμένει μη έγκυρο, εξετάστε το ενδεχόμενο συλλογής νέου δείγματος από τον ασθενή.

* Τα εργαστήρια πρέπει να αναφέρουν το διαγνωστικό τους αποτέλεσμα όπως απαιτείται και σύμφωνα με το σύστημα αναφοράς τους.

[†] Δεν έχουν καθοριστεί οι βέλτιστοι τύποι δειγμάτων και τα βέλτιστα χρονικά διαστήματα για μέγιστα επίπεδα του ιού κατά τη διάρκεια λοιμώξεων που προκαλούνται από το 2019-nCoV. Μπορεί να απαιτείται συλλογή πολλών δειγμάτων από τον ίδιο ασθενή για την ανίχνευση του ιού. Πρέπει να εξεταστεί ιδιαίτερα το ενδεχόμενο ψευδούς αρνητικού αποτελέσματος, αν οι πρόσφατες εκθέσεις ή η κλινική εικόνα του ασθενούς υποδηλώνουν ότι υπάρχει πιθανότητα λοίμωξης 2019-nCoV και οι διαγνωστικές εξετάσεις για άλλες αιτίες νόσων (π.χ. άλλες αναπνευστικές νόσοι) είναι αρνητικές. Αν εξακολουθεί να υπάρχει υποψία λοίμωξης 2019-nCoV, πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο επανεξέτασης σε συνεργασία με τις αρχές δημόσιας υγείας.

7

Ποιοτικός έλεγχος

Ποιοτικός έλεγχος **75**

Αυτό το κεφάλαιο περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τα μέτρα ποιοτικού ελέγχου για την ανάλυση προσδιορισμού.

Ποιοτικός έλεγχος

- Ο ποιοτικός έλεγχος πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τους τοπικούς, κρατικούς και ομοσπονδιακούς κανονισμούς ή τις απαιτήσεις διαπίστευσης και τις τυπικές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου του εργαστηρίου.
- Οι διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου προορίζονται για την παρακολούθηση της απόδοσης των αντιδραστηρίων και της ανάλυσης προσδιορισμού.
- Εξετάστε όλους τους θετικούς μάρτυρες πριν από την ανάλυση διαγνωστικών δειγμάτων με κάθε νέο κιτ, ώστε να διασφαλιστεί ότι όλα τα αντιδραστήρια και τα συστατικά του κιτ λειτουργούν σωστά.
- Σύμφωνα με την ορθή εργαστηριακή πρακτική (cGLP) συνιστάται η συμπερίληψη θετικού μάρτυρα εκχύλισης σε κάθε παρτίδα απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος.
- Ο μάρτυρας ανθρώπινου δείγματος **πρέπει** να χρησιμοποιηθεί στην εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος με κάθε παρτίδα δειγμάτων προς εξέταση.
- Πρέπει να συμπεριλαμβάνετε **πάντα** έναν αρνητικό μάρτυρα (NTC) και τον θετικό μάρτυρα συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 σε κάθε ανάλυση ενίσχυσης και ανίχνευσης.
- Το σετ ιχνηθετών/εκκινήτων για το ανθρώπινο γονίδιο RNase P (περιλαμβάνεται στο 10x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix) ελέγχει την ποιότητα και την εκχύλιση των δειγμάτων.

8 Περιορισμοί ανάλυσης προσδιορισμού

Περιορισμοί 77

Αυτό το κεφάλαιο περιγράφει τους περιορισμούς της ανάλυσης προσδιορισμού που πραγματοποιήθηκε με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Περιορισμοί

- 1 Αυτή η ανάλυση προσδιορισμού πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από προσωπικό που έχει εκπαιδευτεί στη διαδικασία. Η μη τήρηση αυτών των οδηγιών μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
- 2 Τα αξιόπιστα αποτελέσματα εξαρτώνται από την κατάλληλη συλλογή, μεταφορά, αποθήκευση και επεξεργασία των δειγμάτων.
- 3 Αποφεύγετε τη μόλυνση ακολουθώντας τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές και τις διαδικασίες που καθορίζονται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης.
- 4 Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μοναδική βάση για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία ή για άλλες αποφάσεις διαχείρισης.
- 5 Ένα θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος από τον σχετικό ιό. Το νουκλεϊκό οξύ μπορεί να παραμείνει ακόμη και όταν ο ιός δεν είναι πλέον βιώσιμος.
- 6 Η απόδοση της ανάλυσης προσδιορισμού Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit καθορίστηκε με τη χρήση τύπου δείγματος ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος που συλλέχθηκε σε μέσα μεταφοράς UTM ή VCM. Τα στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα, τα ρινικά επιχρίσματα και τα επιχρίσματα μέσης ρινικής κόγχης θεωρούνται αποδεκτοί τύποι δειγμάτων για χρήση με την ανάλυση προσδιορισμού Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, αλλά η απόδοση με τους συγκεκριμένους τύπους δειγμάτων δεν έχει τεκμηριωθεί. Πρέπει να υποβάλλονται σε εξέταση μόνο στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα, ρινικά επιχρίσματα και επιχρίσματα μέσης ρινικής κόγχης (που συλλέγονται από προσωπικό παροχής υγειονομικής περίθαλψης ή υπό την επίβλεψη αυτού) από ασθενείς με συμπτώματα της νόσου COVID-19.
- 7 Το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit δεν περιλαμβάνει δείγμα για χρήση ως μάρτυρα ανθρώπινου δείγματος. Το δείγμα που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας πρέπει να επικυρωθεί από το εργαστήριο.

9 Χαρακτηριστικά απόδοσης

Χαρακτηριστικά απόδοσης 79

Αυτό το κεφάλαιο περιλαμβάνει τα χαρακτηριστικά απόδοσης του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τα παρακάτω δεδομένα καταδεικνύουν τα χαρακτηριστικά απόδοσης του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit. Σε όλες οι εκχυλίσεις δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι όγκοι εισόδου δείγματος και οι όγκοι έκλουσης που συνιστώνται στην ενότητα «**Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων**» στη **σελίδα 19**.

Αναλυτική ευαισθησία (Όριο ανίχνευσης)

Η Agilent πραγματοποίησε μια μελέτη ορίου ανίχνευσης (LoD) για να καθοριστεί η χαμηλότερη συγκέντρωση του ιού SARS-CoV-2 (η οποία εκφράζεται ως αριθμός αντιγράφων ιικού γονιδιώματος) που μπορεί να ανιχνευθεί από το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, στο 95% τουλάχιστον των περιπτώσεων, με καθεμία από τις υποστηριζόμενες διαδικασίες εκχύλισης νουκλεϊκού οξέος, σε καθένα από τα τρία υποστηριζόμενα συστήματα PCR σε πραγματικό χρόνο.

Τα πάνελ δειγμάτων εξέτασης LoD δημιουργήθηκαν με αραιώση εμπορικά διαθέσιμου ποσοτικοποιημένου προτύπου SARS-CoV-2 με αρνητικά κλινικά δείγματα δεξαμενής (αρνητική μήτρα) για την επίτευξη μιας σειράς επιθυμητών συγκεντρώσεων στόχου SARS-CoV-2. Όλα τα κλινικά δείγματα ήταν ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα που είχαν υποβληθεί σε προηγούμενη εξέταση για SARS-CoV-2 από τον προμηθευτή με τη χρήση της εξέτασης SARS-CoV-2 με Άδεια για επείγουσα χρήση και είχαν επιβεβαιωθεί περαιτέρω από την Agilent.

Στο προκαταρκτικό πείραμα LoD για το σύνολο της ανάλυσης προσδιορισμού χρησιμοποιήθηκε εύρος ικών συγκεντρώσεων με τρία επαναληπτικά δείγματα ανά συγκέντρωση. Το εύρος συγκέντρωσης στο προκαταρκτικό πείραμα εξέτασε συγκεντρώσεις από 0,75 έως 3 αντίγραφα/μl. Τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού πειράματος έδειξαν ότι η τελική τιμή LoD θα είναι πιθανότατα εντός αυτού του εύρους και θα ποικίλλει ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης και το σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο.

Το τελικό πείραμα επιβεβαίωσης LoD για το σύνολο της ανάλυσης προσδιορισμού πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα εισόδου στόχου: 0,75, 1 και 1,5 αντίγραφα/μl. Σε καθένα από τα τρία επίπεδα εισόδου στόχου, υποβλήθηκαν σε εξέταση 20 μεμονωμένα επαναληπτικά δείγματα εκχύλισης με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μεθόδων εκχύλισης/συστημάτων PCR σε πραγματικό χρόνο. Ο **Πίνακας 18** παρουσιάζει τα θετικά ποσοστά ανίχνευσης από αυτό το πείραμα. Το ποσοστό ανίχνευσης 20/20 υποδηλώνει ότι και τα 20 επαναληπτικά δείγματα εκχύλισης ήταν ανιχνεύσιμα με τον συγκεκριμένο συνδυασμό μεθόδου εκχύλισης και συστήματος PCR σε πραγματικό χρόνο.

Πίνακας 18 Επιβεβαίωση τελικού ορίου ανίχνευσης – Θετικά ποσοστά ανίχνευσης* με όλες τις μεθόδους εκχύλισης νουκλεϊκού οξέος σε όλα τα συστήματα PCR σε πραγματικό χρόνο (Agilent AriaMx, ABI 7500 και Bio-Rad CFX96)

Επίπεδο εισόδου ιικού στόχου SARS-CoV-2 πριν από την εκχύλιση (αντίγραφα/μl)	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit με QIASymphony (αυτοματοποιημένη εκχύλιση)			MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit με KingFisher Flex (αυτοματοποιημένη εκχύλιση)		
	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)

* Τα ποσοστά ανίχνευσης εκφράζονται ως ο αριθμός των θετικών αντιγράφων από τον συνολικό αριθμό των θετικών και αρνητικών επαναληπτικών δειγμάτων. Οι αριθμοί εντός παρενθέσεων, όπου υπάρχουν, υποδεικνύουν τον αριθμό των ασαφών επαναληπτικών δειγμάτων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο συνολικός αριθμός θετικών και αρνητικών επαναληπτικών δειγμάτων είναι μικρότερος από 20.

Ο Πίνακας 19 συνοψίζει τις τελικές τιμές LoD για κάθε συνδυασμό μεθόδου εκχύλισης/συστήματος PCR σε πραγματικό χρόνο. Αυτές οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον αριθμό ιικών αντιγράφων ανά μl εκχυλίσματος νουκλεϊκού οξέος που μπορεί να ανιχνευθεί από το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit στο 95% τουλάχιστον των περιπτώσεων.

Πίνακας 19 Σύνοψη τελικού ορίου ανίχνευσης – LoD για όλες τις μεθόδους εκχύλισης νουκλεϊκού οξέος σε όλα τα συστήματα PCR σε πραγματικό χρόνο (Agilent AriaMx, ABI 7500 και Bio-Rad CFX96)

Μέθοδος εκχύλισης νουκλεϊκού οξέος	Όριο ανίχνευσης για το σύνολο της ανάλυσης προσδιορισμού (αντίγραφα/μl)		
	AriaMx	7500	CFX96
QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit με QIASymphony (αυτοματοποιημένη εκχύλιση)	1,5	1	1,5
MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit με KingFisher Flex (αυτοματοποιημένη εκχύλιση)	1	1,5	1,5

Αναλυτική συμπερίληψη

Στο Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, οι αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών ολιγονουκλεοτιδίων για τους ιικούς στόχους N1 και N2 και το ανθρώπινο γονίδιο RNase P είναι πανομοιότυπες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel που εγκρίθηκε μόνο για επείγουσα χρήση. Η συμπερίληψη αυτού του πάνελ έχει ήδη αποδειχθεί.

Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Στο Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, οι αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών ολιγονουκλεοτιδίων για τους ιικούς στόχους N1 και N2 και το ανθρώπινο γονίδιο RNase P είναι πανομοιότυπες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel που εγκρίθηκε μόνο για επείγουσα χρήση. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα αυτού του πάνελ έχει ήδη αποδειχθεί.

Κλινική αξιολόγηση

Η μελέτη κλινικής αξιολόγησης πραγματοποιήθηκε με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit σε συνδυασμό με ανθρώπινα δείγματα ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος (NP). Εξετάστηκαν 80 δείγματα συνολικά για καθεμία από τις συνθήκες εξέτασης: 40 αρνητικά δείγματα NP και 40 θετικά δείγματα NP. Η θετική ή αρνητική κατάσταση για κάθε δείγμα επιβεβαιώθηκε με μια ανάλυση προσδιορισμού qRT-PCR για SARS-CoV-2 με Άδεια για επείγουσα χρήση (EUA). Στόχος της κλινικής αξιολόγησης ήταν η αξιολόγηση της κλινικής συμφωνίας (θετική/αρνητική) των αποτελεσμάτων εξέτασης που λήφθηκαν με το Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit με αυτά που λήφθηκαν με τη συγκριτική ανάλυση προσδιορισμού qRT-PCR για SARS-CoV-2 με Άδεια για επείγουσα χρήση (EUA).

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος σε κάθε δείγμα με τη χρήση και των δύο υποστηριζόμενων πλατφορμών αυτοματοποιημένης εκχύλισης (QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit με το QIAAsymphony SP και Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit με το σύστημα καθαρισμού KingFisher Flex) με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή και τις συστάσεις που παρέχονται σε αυτές τις Οδηγίες χρήσης. Στη συνέχεια, κάθε εκχυλισμένο δείγμα υποβλήθηκε σε εξέταση και στα τρία υποστηριζόμενα συστήματα PCR σε πραγματικό χρόνο (Agilent AriaMx, ABI 7500 και Bio-Rad CFX96), όπως περιγράφεται σε αυτές τις Οδηγίες χρήσης. Επομένως, κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε εξέταση υπό έξι (6) διαφορετικές συνθήκες σε αυτήν τη μελέτη. Ως κριτήρια αποδοχής, απαιτείται τουλάχιστον 95% θετική και αρνητική συμφωνία μεταξύ του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit και της συγκριτικής ανάλυσης προσδιορισμού. Ο Πίνακας 20 παρέχει μια σύνοψη των αποτελεσμάτων συμφωνίας.

Πίνακας 20 Επί τοις εκατό θετική συμφωνία (PPA), επί τοις εκατό αρνητική συμφωνία (NPA) και συνολική συμφωνία (OA) μεταξύ του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit και της συγκριτικής ανάλυσης προσδιορισμού qRT-PCR για SARS-CoV-2 με άδεια για επείγουσα χρήση (EUA)

Πλατφόρμα εκχύλισης:	QIAAsymphony	QIAAsymphony	QIAAsymphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
Σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο:	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


Πληροφορίες αναφοράς

Ετικέτες προϊόντος **83**

Αυτό το κεφάλαιο περιλαμβάνει αντίγραφα των ετικετών προϊόντος του Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.


Ετικέτες προϊόντος



 **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 

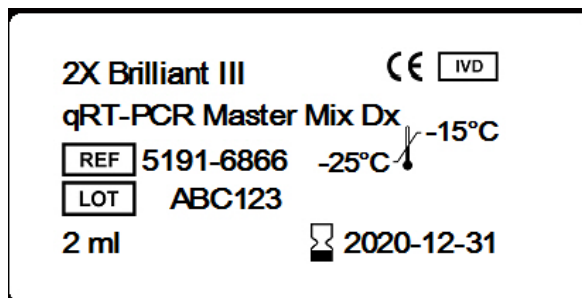
 Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA
Manufactured at:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA
www.agilent.com



 **EC REP** Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark







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


Σχήμα 37 Ετικέτα κουτιού του K1180-64100




2X Brilliant III  

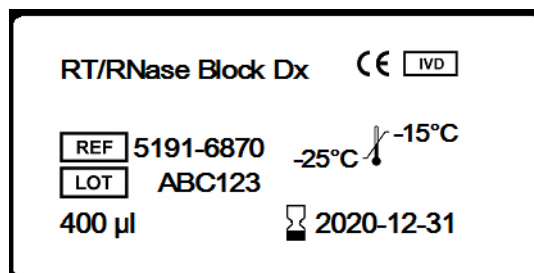
qRT-PCR Master Mix Dx  -15°C



 **REF** 5191-6866  -25°C 



 **LOT** ABC123




2 ml  2020-12-31


Σχήμα 38 Ετικέτα φιάλης του 5191-6866



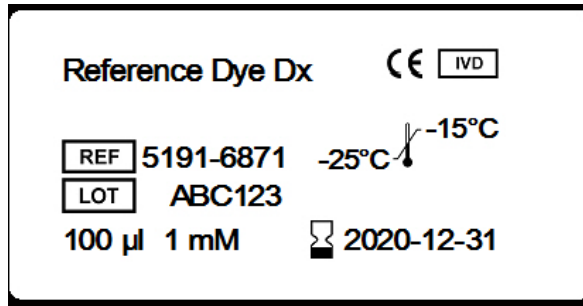
RT/RNase Block Dx  

 **REF** 5191-6870  -15°C

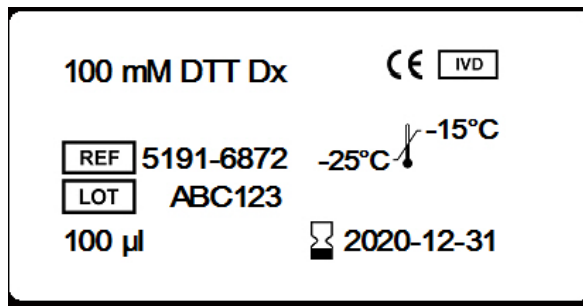
 **LOT** ABC123  -25°C 

400 µl  2020-12-31

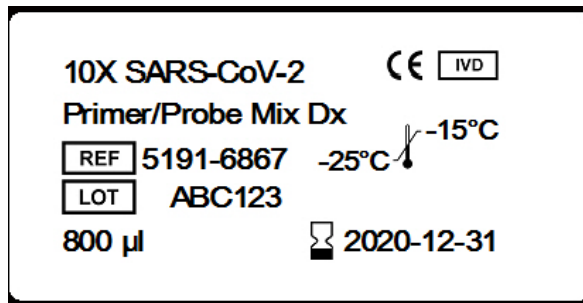
Σχήμα 39 Ετικέτα σωληναρίου του 5191-6870



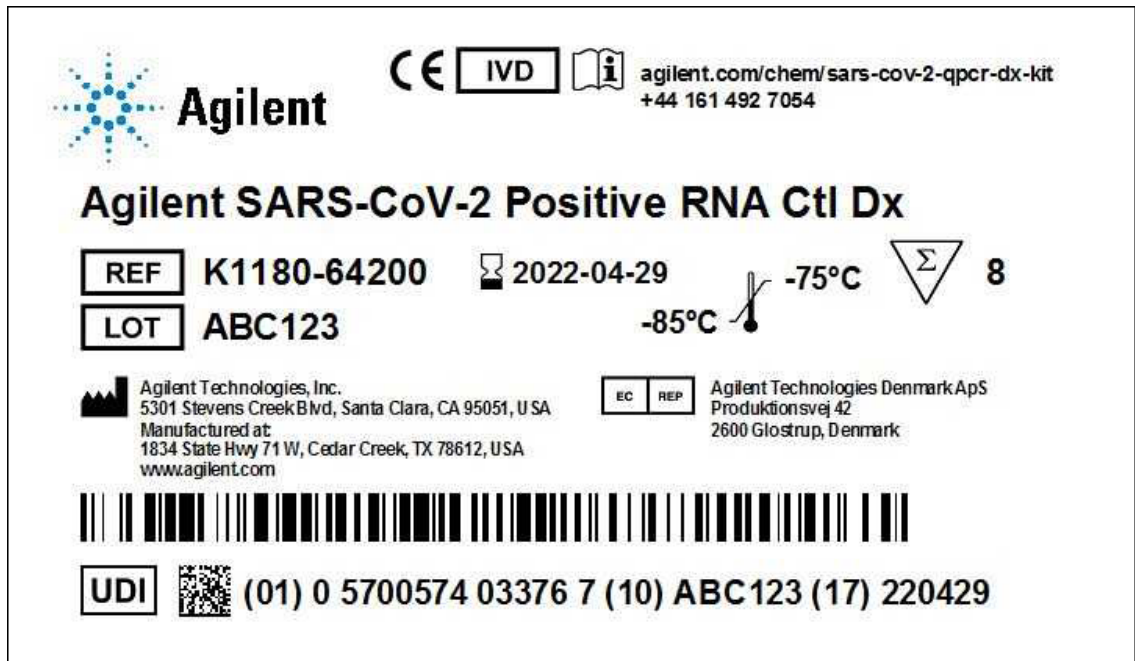
Σχήμα 40 Ετικέτα σωληναρίου του 5191-6871



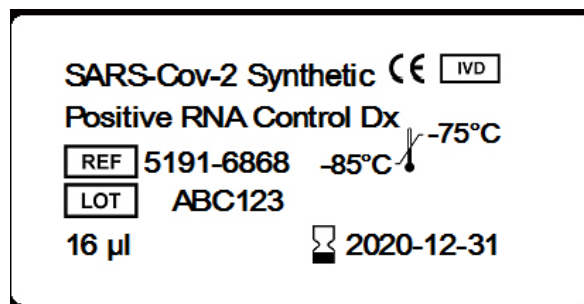
Σχήμα 41 Ετικέτα σωληναρίου του 5191-6872



Σχήμα 42 Ετικέτα σωληναρίου του 5191-6867



Σχήμα 43 Ετικέτα κουτιού του K1180-64200



Σχήμα 44 Ετικέτα σωληναρίου του 5191-6868

Κατασκευάζεται από την



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

Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος για την Ευρωπαϊκή Ένωση



Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark

Τεχνική υποστήριξη Agilent

Επισκεφτείτε τη διεύθυνση www.agilent.com/en/contact-us/page
για τους αριθμούς τηλεφώνου κάθε χώρας
Εναλλακτικά, στείλτε email στη διεύθυνση covid.support@agilent.com

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Δεν επιτρέπεται η αναπαραγωγή κανενός μέρους του παρόντος εγχειριδίου σε οποιαδήποτε μορφή ή με οποιοδήποτε τρόπο (συμπεριλαμβανομένης της ηλεκτρονικής αποθήκευσης και ανάκτησης ή μετάφρασης σε ξένη γλώσσα) χωρίς την προηγούμενη συμφωνία και γραπτή συναίνεση της Agilent Technologies, Inc., όπως προβλέπεται από τους αμερικανικούς και διεθνείς νόμους περί πνευματικής ιδιοκτησίας.

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Αναθεώρηση B2, Μάιος 2022

