



rujan 2022.

# Upute za uporabu (priručnik) za komplet *artus*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Prep&Amp<sup>™</sup> UM Kit



Inačica 1



Za in vitro dijagnostičku uporabu na instrumentima Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM, ABI<sup>®</sup> 7500 Fast Dx, QuantStudio<sup>®</sup> 5 Dx, cobas<sup>®</sup> z 480 ili CFX96<sup>™</sup> Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NJEMAČKA

R5

# Sadržaj

Namjena .....	4
Opis i načelo.....	5
Informacije o patogenu.....	5
Sažetak i objašnjenje .....	6
Uključeni materijali.....	9
Sadržaj kompleta .....	9
Komponente kompleta .....	10
Platforme i softver .....	12
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni.....	13
Potrošni materijal i oprema.....	13
Upozorenja i mjere opreza .....	15
Sigurnosne informacije.....	15
Mjere opreza .....	16
Pohrana i rukovanje reagensima.....	17
Transport, pohrana i rukovanje ispitcima.....	17
Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu RGQ MDx 5plex HRM .....	19
Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu ABI 7500 Fast Dx .....	25
Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu CFX96 Dx.....	31

Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu cobas z 480 .....	36
Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu QuantStudio 5 Dx .....	42
Rezultati .....	48
Analiza na instrumentu RGQ MDx 5plex HRM.....	48
Analiza na instrumentu ABI 7500 Fast Dx.....	50
Analiza na instrumentu CFX96 Dx .....	50
Analiza na instrumentu cobas z 480 .....	52
Analiza na instrumentu QuantStudio 5 Dx.....	53
Tumačenje rezultata .....	55
Ograničenja .....	57
Radne značajke.....	58
Analitička osjetljivost (granica detekcije) .....	58
Ispitivanja analitičke specifičnosti (uključivost i isključivost/križna reaktivnost) .....	59
Preciznost .....	69
Kliničke radne značajke.....	71
Reference.....	76
Vodič za rješavanje problema .....	77
Simboli.....	79
Kontaktne podaci.....	81
Informacije za narudžbu .....	82
Povijest revizija dokumenta .....	83

# Namjena

Komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit je real-time RT-PCR test namijenjen za kvalitativno otkrivanje nukleinske kiseline virusa SARS-CoV-2 u nazofaringealnim brisovima (Nasopharyngeal Swabs, NPS), nazalnim brisovima i orofaringealnim brisovima osoba sa znakovima i simptomima infekcije ili osoba bez simptoma ili drugih razloga za sumnju na infekciju bolešću COVID-19. U slučaju ispitaka čiste sline, test je namijenjen za osobe sa znakovima i simptomima infekcije ili one za koje se sumnja na infekciju bolešću COVID-19.

Namijenjen je kao pomoć u dijagnosticiranju bolesti COVID-19 u akutnoj fazi infekcije u kombinaciji s kliničkim opažanjima, povijesti bolesti pacijenta i epidemiološkim informacijama.

Komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit namijenjen je za uporabu u okruženju laboratorija molekularne biologije za profesionalne korisnike, kao što je obučeno osoblje kliničkog laboratorija koje je dobilo posebne upute za tehnike real-time RT-PCR i *in vitro* dijagnostičkih postupaka.

Negativni rezultati ne isključuju infekciju virusom SARS-CoV-2 te ih se ne bi trebalo upotrebljavati kao jedinu osnovu za donošenje odluka o postupanju s pacijentima.

Komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit namijenjen je za uporabu sa sustavima Rotor-Gene Q MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 ili CFX96 Dx kao real-time PCR sustavima.

# Opis i načelo

## Informacije o patogenu

Koronavirusi, rod porodice *Coronaviridae*, virusi su s velikom jednolančanom pozitivnom RNK obavijeni ovojnicom koji uzrokuju izuzetno virulentnu bolest u ljudi i domaćih životinja (1). Koronavirusi za koje je poznato da inficiraju ljude odgovorni su za jednu trećinu infekcija običnom prehladom te su dobro poznati uzrok bolničkih gornjih respiratornih infekcija u dojenčadi (2).

Novi član porodice koronavirusa uzrokovao je epidemiju respiratorne bolesti u gradu Wuhanu u Kini (1, 3). Isprva nazvan novim koronavirusom (2019-nCoV), SARS-CoV-2 razlikuje se od virusa SARS-CoV (1, 3), koji je bio odgovoran za epidemiju iz 2003., te MERS-CoV, koji cirkulira na području Bliskog istoka od 2012. godine. SARS-CoV-2 uzročnik je bolesti COVID-19. RNK virusa SARS-CoV-2 moguće je otkriti tijekom rane i akutne faze infekcije iz raznih ispitaka uzetih iz gornjeg respiratornog trakta (nazalni, orofaringealni i nazofaringealni brisovi) te iz ispitaka čiste sline (3).

U kombinaciji s pacijentovom povijesti bolesti i epidemiološkim podacima o virusu SARS-CoV-2, real-time RT-PCR ispitivanja postala su zlatnim standardom za dijagnosticiranje virusa SARS-CoV-2. Europski centar za sprečavanje i kontrolu bolesti (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) predložio je kombiniranje ispitivanja temeljenih na postupcima real-time RT-PCR s imunoanalizama za nadzor statusa infekcije i procjenu učinkovitosti restriktivnih mjera koje se poduzimaju za kontrolu epidemije (4, 5).

Komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit osmišljen je da pokriva 2 ciljne sekvence (N1 i N2) N gena koje se otkrivaju istim kanalom fluorescencije. Dvije se ciljne sekvence ne diferenciraju, a amplifikacija bilo koje od njih ili obje ciljne sekvence dovodi do signala fluorescencije. Pozitivni rezultati ukazuju na prisutnost SARS-CoV-2, ali ne isključuju koinfekciju drugim patogenima. S druge strane, negativni rezultati real-time RT-PCR testa ne isključuju moguću infekciju.

## Sažetak i objašnjenje

Komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit sustav je odmah spreman za uporabu koji se sastoji od jednostavnog koraka pripreme uzorka nakon kojeg slijedi otkrivanje RNK virusa SARS-CoV-2 primjenom real-time RT-PCR postupka na sustavu RGQ MDx ili platformama ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ili QuantStudio 5 Dx (slika 1.).

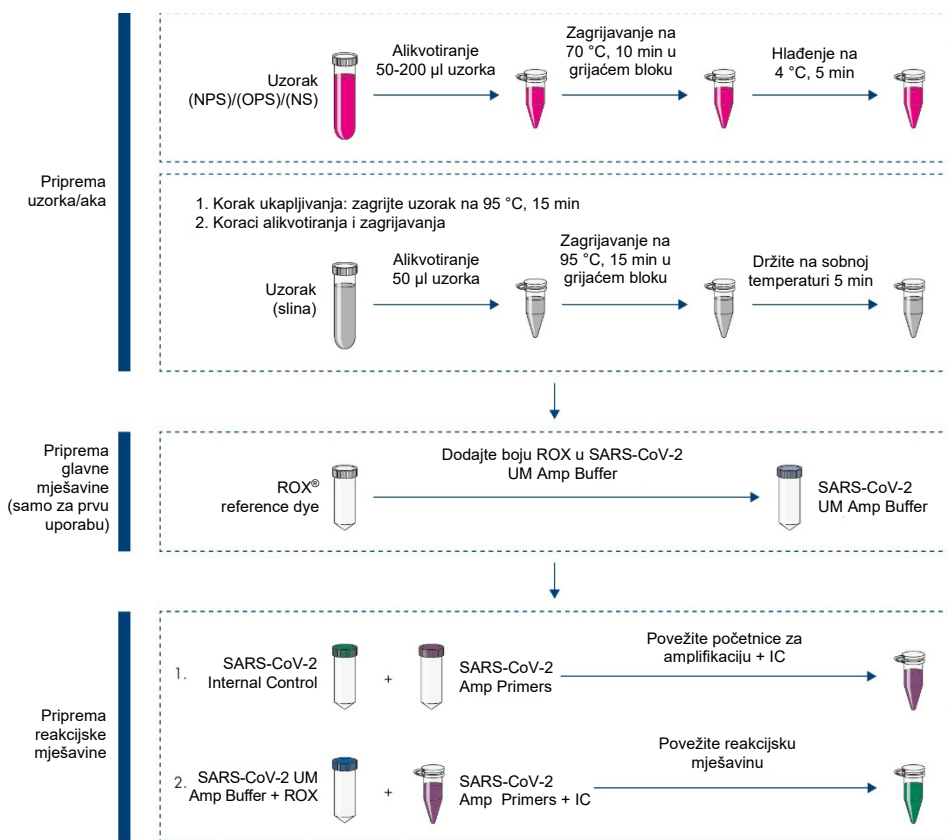
Pufer SARS-CoV-2 UM Amp Buffer sadržava reagense i enzime za specifičnu amplifikaciju regije RNK genoma virusa SARS-CoV-2 od 72 bazna para (bp) i 67 bp te za njihovo izravno otkrivanje u kanalu fluorescencije „Green” instrumenata RGQ MDx te u kanalu fluorescencije „FAM” platformi ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ili QuantStudio 5 Dx.

Mješavina početnica i proba kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit također sadržava oligonukleotide potrebne za amplifikacije RNaze P. Kada ih se otkrije u kanalu fluorescencije „Yellow” instrumenta RGQ MDx te u kanalu VIC/HEX platformi ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ili QuantStudio 5 Dx, te amplifikacije osiguravaju da je prikupljena dovoljna količina biološkog uzorka. Ta je kontrola ključna za osiguravanje prisutnosti bioloških uzoraka kod uzoraka negativnih na SARS-CoV-2. Amplifikacija bi se uvijek trebala moći detektirati; u protivnom se dovodi u pitanje kvaliteta uzorka.

Komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit također sadržava treći heterologni sustav za amplifikaciju za otkrivanje moguće inhibicije real-time RT-PCR-a. Ta se detekcija odvija kao interna kontrola (Internal Control, IC) RNK u kanalu fluorescencije „Red” instrumenata RGQ MDx te u kanalu Cy5/ATTO647N platformi ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ili QuantStudio 5 Dx. S obzirom na to da je IC uključen u mješavinu SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, njegova bi amplifikacija trebala biti konstantna, osim ako je inhibitor real-time RT-PCR-a prisutan u uzorku ili u PCR reakciji, čime se odgađa ili sprječava amplifikacija.

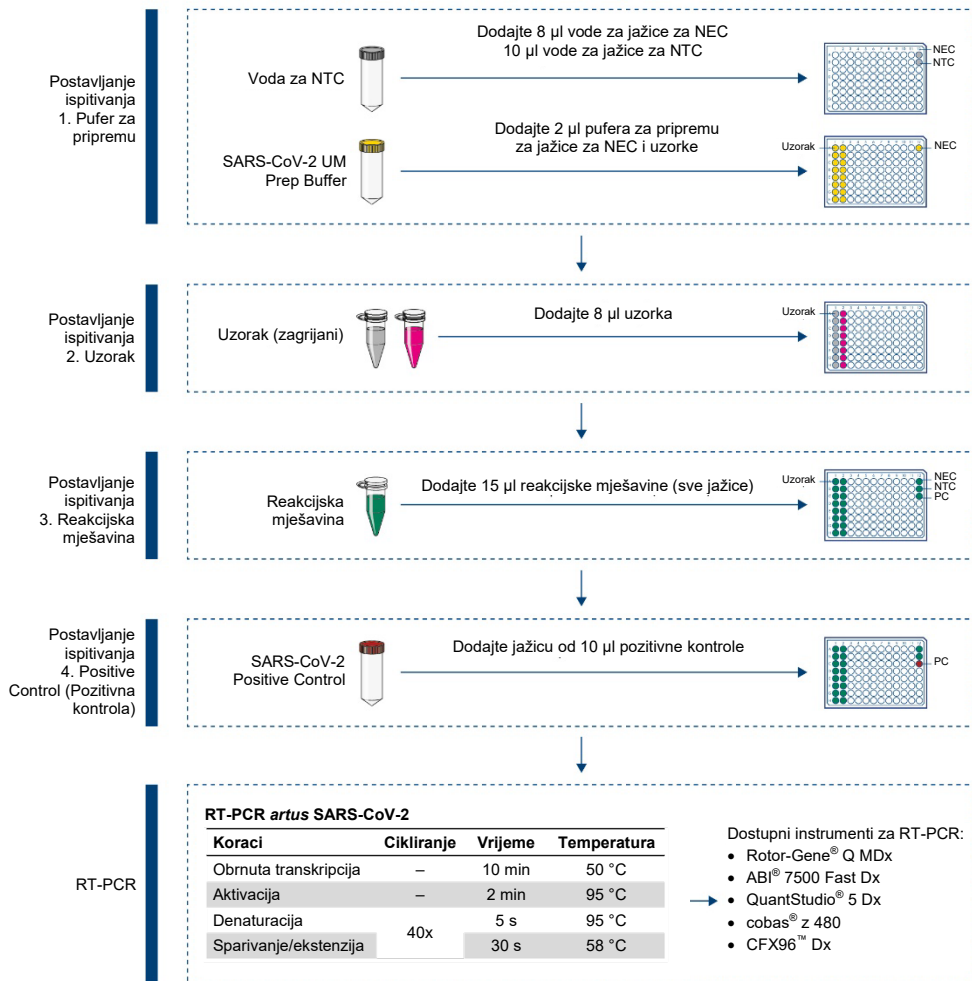
Vanjske pozitivne i negativne kontrole (SARS-CoV-2 Positive Control i voda bez nukleaze koja se upotrebljava kao NTC) isporučuju se u kompletu *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit kako bi potvrdile učinkovitost koraka PCR-a. Kontrola bez ekstrakcije (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer koji se upotrebljava kao NEC) strogo se preporučuje za provjeru odsustva inhibitora real-time RT-PCR-a u puferu za pripremu.

Navedene kontrole zajedno nadziru učinkovitost koraka obrnute transkripcije i PCR-a.



(nastavak na sljedećoj stranici)

(nastavak s prethodne stranice)



Slika 1. Tijek rada kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



# Uključeni materijali

## Sadržaj kompleta

### artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Kataloški br.

Broj reakcija

4511460

768

4511469

3072

Boja epruvete	Boja poklopca	Naziv	ID epruvete	Volumen (µl)	Volumen (µl)
Prozirna	Žuta	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	<b>Preparation Buffer</b> (Pufer za pripremu)	2 x 930	8 x 930
Prozirna	Plava	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	<b>Master Mix</b> (Glavna mješavina)	4 x 1440	16 x 1440
Prozirna	Ljubičasta	SARS-CoV-2 Amp Primers	<b>Primers and Probes</b> (Početnice i probe)	4 x 1680	16 x 1680
Prozirna	Zelena	SARS-CoV-2 Internal Control	<b>Internal Control</b> (Interna kontrola) (IC)	1 x 1390	4 x 1390
Prozirna	Crvena	SARS-CoV-2 Positive Control	<b>Positive Control</b> (Pozitivna kontrola)	1 x 220	4 x 220
Prozirna	Prozirna	Water for NTC (voda za NTC)	<b>Water</b> (Voda (No Template Control, NTC))	1 x 1900	4 x 1900
Prozirna	Prozirna	ROX Reference Dye	<b>ROX Dye</b> (Boja ROX)	1 x 210	4 x 210

## Komponente kompleta

### Reagensi

Volumeni reagensa u svakoj epruveti optimizirani su za 8 serija od 96 uzoraka (za komplet od 768 reakcija) ili za 32 serije od 96 reakcija (za komplet od 3072 reakcije), uključujući pozitivnu kontrolu (Positive Control, PC), kontrolu bez predloška (No Template Control, NTC) i kontrolu bez ekstrakcije (No Extraction Control, NEC).

Može se obraditi manji ili veći broj uzoraka, ali u tom će slučaju iskorištenost reagensa biti suboptimalna. Preporučuje se izbjegavanje višestrukih ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Reagensi se mogu alikvotirati kako bi se izbjegli višestruki ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja.

### Početnice i probe

Početnice i probe koje ciljaju na ciljne sekvence virusa SARS-CoV-2 temelje se na početnicama i probama koje su osmislili Centri za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for Disease Control and Prevention, CDC).

### Kontrole i kalibratori

Ispitivanje sadržava 5 kontrola za nadzor učinkovitosti real-time RT-PCR postupka.

Interna kontrola (Internal Control, IC): interna kontrola je jednolančani in vitro transkribirani (IVT) RNK koji provjerava prisutnost kontaminanata koji bi mogli inhibirati obrnutu transkripciju. Interna kontrola također nadzire učinkovitost obrnute transkripcije u kontroli bez predloška (No Template Control, NTC) i u kontroli bez ekstrakcije (No Extraction Control, NEC).

Kontrola bez predloška (No Template Control, NTC): kontrola bez predloška sastoji se od vode bez nukleaze. Ona se dodaje pločici za PCR radi provjere uvođenja kontaminanata tijekom pripreme pločice za PCR koji bi mogli dovesti do pogrešnog tumačenja ciljnih sekvenci virusa SARS-CoV-2.

Pozitivna kontrola (Positive Control, PC): pozitivna kontrola je dvolančani DNK amplificiran početnicama i probama za SARS-CoV-2 (P&P mješavina). Njezinom se detekcijom provjerava učinkovitost reagensa koji je uključen u korak amplifikacije u sklopu PCR-a.

Kontrola bez ekstrakcije (No Extraction Control, NEC): kontrola bez ekstrakcije sastoji se od pufera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Ona se obrađuje paralelno s kliničkim uzorcima radi provjere uvođenja kontaminanata tijekom pripreme uzoraka koji bi mogli dovesti do pogrešnog tumačenja ciljnih sekvenci virusa SARS-CoV-2.

Kontrola uzorkovanja: kontrola uzorkovanja detektira gen za RNazu P i ključna je za osiguravanje prisutnosti bioloških uzoraka u uzorcima negativnima na SARS-CoV-2. Amplifikaciju kontrole uzorkovanja uvijek bi trebalo moći detektirati; u protivnom se dovodi u pitanje kvaliteta uzorka.

## Platforme i softver

Prije uporabe provjerite jesu li instrumenti održavani i kalibrirani prema preporukama proizvođača. Ovaj se komplet može upotrebljavati u pet tijekova rada koji zahtijevaju uporabu sljedećih instrumenata za real-time RT-PCR i njihova odgovarajućeg softvera:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Softver Rotor-Gene Q, inačica 2.3.1 ili novija
- ABI 7500 Fast Dx: Softver SDS, inačica 1.4.1 ili novija
- CFX96 Dx sa softverom CFX Manager Dx Software inačice 3.1.3090.1022 ili novije
- cobas z 480 sa softverom LightCycler® 480 SW UDF inačice 2.0.0 ili novije
- QuantStudio 5 Dx sa softverom QuantStudio 5 Dx IVD inačice 1.0.1 ili novije ili QuantStudio 5 Dx TD inačice 1.0.1 ili novije

# Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

## Potrošni materijal i oprema

### Uobičajeni potrošni materijal i oprema

- Stolna centrifuga s rotorom za reakcijske epruvete od 2 ml
- Pipete (podesive)
- Vorteks miješalica
- Grijaći blok
- Jednokratne rukavice bez pudera
- Sterilni vršci pipeta s filtrima bez nukleaze
- Epruvete bez PCR-a od 1,5 ml ili 2 ml
- Instrument za centrifugiranje pločice s 96 jažica

### Potrošni materijal i oprema za svaku platformu

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

- PCR epruvete od 0,1 ml, za uporabu s instrumentom Rotor-Gene Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, kat. br. 981103).
- 72-Well Rotor (kat. br. 9018903) i Locking Ring 72-Well Rotor (kat. br. 9018904)

#### **Instrument ABI 7500 Fast Dx**

- 96-Well MicroAmp™ (Thermo Fisher Scientific, kat. br. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 4360954)

### **Instrument CFX96 Dx**

- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, mali profil, tanka stijenka, ravno dno, bijelo/prozirno (Bio-Rad Laboratories Inc., kat. br. HSP9601)
- Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, Adhesive, Optical (Bio-Rad Laboratories Inc., kat. br. MSB1001).

### **Instrument cobas z 480**

- LightCycler 480 Multiwell Plate, bijelo (Roche Group, kat. br. 04729692001).
- LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Group, kat. br. 04729757001).

### **Instrument QuantStudio 5 Dx**

- MicroAmp EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, kat. br. A36924)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 4360954)

# Upozorenja i mjere opreza

Imajte na umu da ćete ozbiljne štetne događaje koji su nastali u vezi s uređajem, ovisno o lokalnim propisima koje je potrebno proučiti, možda morati prijaviti proizvođaču ili regulatornom tijelu koje je nadležno za korisnika i/ili pacijenta.

## Sigurnosne informacije

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list (Safety Data Sheet, SDS) za svaki komplet QIAGEN i komponentu kompleta.

Uvijek nosite odgovarajuću osobnu zaštitnu opremu, uključujući, među ostalim, jednokratne rukavice bez pudera, laboratorijsku kutu i zaštitu za oči. Zaštitite kožu, oči i sluznice. Često mijenjajte rukavice kada rukujete uzorcima.

Sa svim je uzorcima potrebno postupati kao da su potencijalno opasni. Uvijek se pridržavajte sigurnosnih mjera opreza navedenih u relevantnim smjernicama, kao što su *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guidelines* (M29) instituta Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) ili drugih odgovarajućih dokumenata.

Ispitci i uzorci potencijalno su zarazni. Odlazite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim postupcima.

## Mjere opreza

- Pridržavajte se standardnih laboratorijskih postupaka kako biste održali radno područje čistim i slobodnim od kontaminacije. Odredite područje s posebnom opremom za rukovanje RNK-om.
- Pridržavajte se dobre laboratorijske prakse kako biste minimizirali križnu kontaminaciju.
- Pazite da izbjegavate kontaminaciju RNazom tijekom ispitivanja i koristite se plastičnim priborom bez RNaze.
- Pobrinite se da osigurate dobru sljedivost evidencije, osobito za identifikaciju uzoraka.



## Pohrana i rukovanje reagensima

Potrebno je obratiti pozornost na rokove trajanja i uvjete pohrane otisnute na kutiji i naljepnicama svih komponenata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.

Komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit može se držati na temperaturi od  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  do isteka roka trajanja.

## Transport, pohrana i rukovanje ispitcima

Komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit namijenjen je za uporabu s nazofaringealnim, nazalnim i orofaringealnim brisovima te ispitcima čiste sline. Sa svim je uzorcima potrebno postupati kao da su potencijalno opasni. Centri za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) i agencija Public Health England pružili su smjernice za prikupljanje uzoraka, rukovanje njima te testiranje kliničkih ispitaka. Dodatne informacije potražite u tim smjernicama ili u drugim relevantnim nacionalnim referentnim laboratorijskim protokolima.

### Prikupljanje, transport i pohrana nazofaringealnih, nazalnih i orofaringealnih brisova

Za prikupljanje, pohranu i transport brisa pogledajte preporuke dobavljača. Brisovi se moraju u potpunosti uroniti u transportni medij kako bi se zadržao integritet ispitaka. Uzorci nazofaringealnog brisa ostaju stabilni i mogu se pohraniti na:

- $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (od  $2$  do  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) maksimalno 72 sata
- $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 tjedna.

Uzorci nazofaringealnog brisa ostaju stabilni tijekom 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

## Prikupljanje, transport i pohrana uzorka čiste sline

Uzorci čiste sline moraju se prikupljati u sterilne spremnike bez konzervansa, pufera ili drugih aditiva.

Upute za prikupljanje čiste sline:

- Izbjegavajte kašljanje prije prikupljanja čiste sline.
- Nemojte jesti, piti, pušiti prave ili e-cigarete, žvakati žvakaće gume ili prati zube 30 minuta prije prikupljanja čiste sline.
- Zahvati na zubima ili pregled zubi ne bi se trebali provoditi 24 sata prije prikupljanja čiste sline.

Uzorci čiste sline ostaju stabilni i mogu se pohraniti na:

- sobnoj temperaturi (18 – 26 °C) maksimalno 72 sata
- 4 °C (od 2 do 8 °C) maksimalno 72 sata
- kombinirana pohrana na sobnoj temperaturi, a potom na 4 °C te zatim na –20 °C (od –30 do –15 °C) maksimalno 12 dana
- –20 °C (od –30 do –15 °C) maksimalno 1 mjesec.

Uzorci čiste sline ostaju stabilni tijekom 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

Ako uvjeti pohrane uzoraka odstupaju od navedene smjernice, potvrdite vlastite uvjete pohrane.

# Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu RGQ MDx 5plex HRM

Ovaj protokol opisuje pripremu uzorka i real-time RT-PCR postupka za otkrivanje ciljnih sekvenci virusa SARS-CoV-2 u humanim nazalnim, nazofaringealnim ili orofaringealnim brisovima pohranjenima u transportnom mediju te u uzorcima čiste sline na real-time RT-PCR instrumentu RGQ MDx 5plex HRM povezanom sa softverom Rotor-Gene Q inačice 2.3.1.49 (ili novije).

## Važne točke prije započinjanja

- Provjerite poštuju li se rokovi trajanja i uvjeti pohrane otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponentata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.
- Upotrebljavajte dobro održavanu i kalibriranu opremu.
- Pazite da izbjegavate kontaminaciju RNazama tijekom ispitivanja i koristite se plastičnim priborom bez nukleaze.

## Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Respiratorni uzorci mogu se čuvati na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije, ali preporučuje se da ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C na stalku za hlađenje.
- Uzorci sline mogu se čuvati na ledu ili na 4 °C na stalku za hlađenje, ali preporučuje se da ih se drži na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije.
- Prije uporabe ostavite SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vodu za NTC i SARS-CoV-2 Positive Control da se u potpunosti odmrznu na sobnoj temperaturi. Držite epruvete na sobnoj temperaturi i zaštićene od svjetlosti do uporabe.

- Prije uporabe homogenizirajte SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i SARS-CoV-2 UM Amp Buffer tako da ih preokrenete 2 – 3 puta (nemojte ih miješati na vorteks miješalici), a zatim brzo zavrtnite. Svi ostali pojedinačni reagensi mogu se homogenizirati pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 sekundi ili preokretanjem 2 – 3 puta, nakon čega ih je potrebno brzo zavrtnuti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibira RNaze prisutne u kliničkim uzorcima za korak detekcije, ali on nije otopina za inaktivaciju virusa. Sa svim je uzorcima potrebno postupati kao da su potencijalno opasni.
- Provjerite jesu li uvjeti cikliranja platforme za real-time RT-PCR u skladu s informacijama navedenima u ovom protokolu.
- Reagensi se mogu alikvotirati kako bi se izbjegli višestruki ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja.
- Pripremite svježiju reakcijsku mješavinu (< 2 h prije pokretanja pločice za RT-PCR).
- Da biste minimizirali kontaminaciju, pripremu uzoraka i RT-PCR reakcije potrebno je obavljati u odvojenim zonama.

## Postupak

**Priprema uzoraka:** Za ispitke respiratornog trakta (nazalne, orofaringealne i nazofaringealne brisove) slijedite korak 1. Za ispitke sline nastavite na korak 2.

1. Ispitci respiratornog trakta (nazalni, orofaringealni i nazofaringealni brisovi):
  - 1a. Snažno promiješajte bris koji sadržava uzorak na vorteks miješalici.
  - 1b. Alikvotirajte 50 – 200 µl uzorka u epruvete bez PCR-a od 1,5 ml
  - 1c. Provedite korak zagrijavanja na 70 °C u trajanju od 10 min na grijaćem bloku. Ohladite uzorke na ledu najmanje 5 min, a potom ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C.
2. Uzorci sline:
  - 2a. Ukapljivanje (radi olakšavanja pipetiranja): zagrijte uzorak sline na 95 °C tijekom 15 min (neodređeni volumen, spremnik ili uređaj za zagrijavanje).
  - 2b. Homogenizirajte uzorak polaganim uvlačenjem u pipetu u istiskivanjem iz nje 8 – 10 puta.
  - 2c. Alikvotirajte 50 µl uzorka u epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.

- 2d. Izvedite korak zagrijavanja na 95 °C tijekom 15 min na grijaćem bloku, a zatim držite uzorak na sobnoj temperaturi najmanje 5 min sve do postavljanja u jažicu ili epruvetu za PCR.
3. Prilikom prve uporabe nadopunite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer bojom ROX Reference Dye.
- 3a. Dodajte 32,8 µl boje ROX u 1 epruvetu pufera SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 3b. Zatvorite poklopac epruvete koja sadržava SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i boju ROX i preokrenite epruvetu 3 puta.
- 3c. Vrtanjem pogurnite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer koji sadržava boju ROX na dno epruvete.
4. Za punu pločicu RGQ MDx (72 jažice) pripremite mješavinu početnica SARS-CoV-2 Amp Primers s internom kontrolom SARS-CoV-2 Internal Control za alikvotiranje.
- 4a. Prenesite potrebne volumene početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control u skladu s tablicom 1. u novu epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
- 4b. Zatvorite poklopac i preokrenite epruvetu 3 puta ili je promiješajte pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 s.
- 4c. Vrtanjem pogurnite početnice SARS-CoV-2 Amp Primers koje sadržavaju IC na dno epruvete.

**Tablica 1. Postavljanje mješavine SARS-CoV-2 Amp Primers + IC**

Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	Broj reakcija				Volumen (µl)
	Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	1 rxn	72 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25		626,4
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5		129,6
Ukupno mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75		756

\* **Napomena:** Prilagodite volumene početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

- Pripremite reakcijsku mješavinu prema tablici 2. i dobro je promiješajte preokretanjem epruvete 3 puta.

**Tablica 2. Postavljanje reakcijske mješavine**

Reagensi	Reakcijska mješavina za RT-PCR		Broj reakcija Volumen (µl)	
	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	1 rxn	72 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
Mješavina SARS-CoV-2 UM Amp Buffer +ROX	4x	1x	6,25	540
Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	756
Ukupni volumen reakcije	–		15,00	1296

\* **Napomena:** Prilagodite volumene pufera SARS-CoV-2 Amp Buffer i početnica SARS-CoV-2 Amp Primers broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

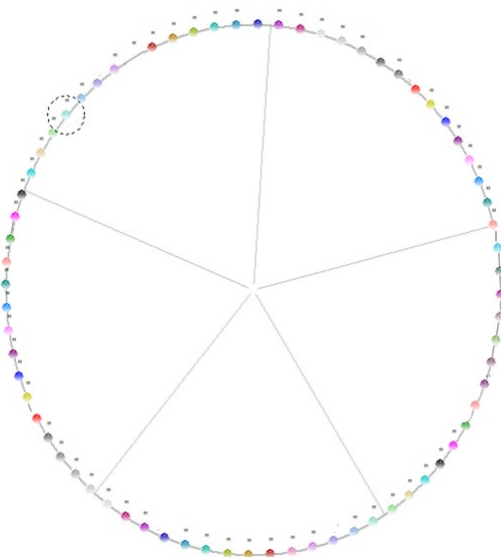
- Pipetirajte 8 µl vode bez nukleaze u PCR epruvetu namijenjenu za NEC.
- Postavite 10 µl vode bez nukleaze u PCR epruvetu namijenjenu za NTC.
- Pipetirajte 2 µl pufera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer u svaku PCR epruvetu namijenjenu za NEC i pripremljene uzorke.
- Dodajte 8 µl pripremljenog uzorka u PCR epruvetu koja sadržava pufer SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
- Dodajte 15 µl reakcijske mješavine pripremljene u koraku 5. u epruvete namijenjene za uzorke i kontrole (slika 2. priložena je kao primjer). Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta, a zatim zatvorite poklopce PCR epruveta, osim one rezervirane za pozitivnu kontrolu SARS-CoV-2 Positive Control.  
**Napomena:** Provjerite jesu li epruvete dobro zatvorene kako biste spriječili križnu kontaminaciju.
- Napunite 10 µl pozitivne kontrole SARS-CoV-2 Positive Control u odgovarajuću PCR epruvetu. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
- Postavite RT-PCR program instrumenta RGQ MDx 5plex HRM prema specifikacijama u tablici 3.  
**Napomena:** Prikupljanje podataka trebalo bi se obavljati tijekom koraka sparivanja/ekstenzije.

13. Postavite epruvete u cikler u stvarnom vremenu (primjer rasporeda epruveta prikazan je na slici 2.) i pokrenite program cikliranja kako je opisano u tablici 3.

**Napomena:** Pazite da slijedite jednaki položaj i redoslijed epruveta u postavljanju ispitivanja i koracima ciklera u stvarnom vremenu.

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

Koraci	Vrijeme	Temperatura (°C)	Broj ciklusa	Prikupljanje
Obrnuta transkripcija	10 min	50	1	Ne
Početna aktivacija topline za PCR	2 min	95	1	Ne
Cikliranje u 2 koraka				
Denaturacija	5 s	95	40	Ne
Sparivanje/ekstenzija	30 s	58		Green, Yellow i Red



- 1: PC
- 2: NTC
- 3: NEC
- 4: Uzorak 1
- 5: Uzorak 2
- 6: Uzorak 3
- 7: ...

**Slika 2. Primjer rasporeda epruveta na platformi RGQ MDx 5plex HRM**

14. Kliknite na Gain optimization (Optimizacija pojačanja) u okviru „New Run Wizard” (Čarobnjak za pokretanje novog postupka) i otvorite Auto-gain Optimization Setup (Postavke automatske optimizacije pojačanja).
15. Provjerite jesu li kanali za prikupljanje postavljeni kako je opisano u tablici 4.

**Tablica 4. Konfiguracija instrumenta RGQ MDx 5plex HRM**

Naziv	Položaj PC epruvete	Min. očitavanje (FI)	Maks. očitavanje (FI)	Min. pojačanje	Maks. pojačanje
Green	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

\* **Napomena:** To je potrebno promijeniti prema položaju epruvete za SARS-CoV-2 Positive Control.

16. Odaberite Perform optimization before the first acquisition (Izvedi optimizaciju prije prvog prikupljanja).
17. Pokrenite postupak.
18. Po završetku postupka analizirajte rezultate (pogledajte odjeljak Rezultati).



# Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu ABI 7500 Fast Dx

Ovaj je protokol namijenjen za pripremu i otkrivanje ciljnih sekvenci virusa SARS-CoV-2 u humanim nazalnim, nazofaringealnim ili orofaringealnim brisovima pohranjenima u transportnom mediju te u uzorcima čiste sline na real-time RT-PCR instrumentu ABI 7500 Fast Dx.

## Važne točke prije započinjanja

- Provjerite poštuju li se rokovi trajanja i uvjeti pohrane otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponentata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.
- Upotrebljavajte dobro održavanu i kalibriranu opremu.
- Pazite da izbjegavate kontaminaciju RNazama tijekom ispitivanja i koristite se plastičnim priborom bez nukleaze.
- Kada se upotrebljava instrument ABI 7500 Fast Dx, boju ROX potrebno je dodati epruveti s glavnom mješavinom prije prve uporabe.

## Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Respiratorni uzorci mogu se čuvati na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije, ali preporučuje se da ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C na stalku za hlađenje.
- Uzorci sline mogu se čuvati na ledu ili na 4 °C na stalku za hlađenje, ali preporučuje se da ih se drži na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije.
- Boja ROX nužna je kada se upotrebljava instrument ABI 7500 Fast Dx.
- Podaci se moraju prikupljati s postavkom pasivne boje ROX.

- Prije uporabe ostavite SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vodu za NTC i SARS-CoV-2 Positive Control da se u potpunosti odmrznu na sobnoj temperaturi. Držite epruvete na sobnoj temperaturi i zaštićene od svjetlosti do uporabe.
- Prije uporabe homogenizirajte SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i SARS-CoV-2 UM Amp Buffer tako da ih preokrenete 2 – 3 puta (nemojte ih miješati na vorteks miješalici), a zatim brzo zavrtite. Svi ostali pojedinačni reagensi mogu se homogenizirati pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 sekundi ili preokretanjem 2 – 3 puta, nakon čega ih je potrebno brzo zavrtjeti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibira RNaze prisutne u kliničkim uzorcima za korak detekcije, ali on nije otopina za inaktivaciju virusa. Sa svim je uzorcima potrebno postupati kao da su potencijalno opasni.
- Provjerite jesu li uvjeti cikliranja platforme za real-time RT-PCR u skladu s informacijama navedenima u ovom protokolu.
- Reagensi se mogu alikvotirati kako bi se izbjegli višestruki ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja.
- Pripremite svježu reakcijsku mješavinu (< 2 h prije pokretanja pločice za RT-PCR).
- Da biste minimizirali kontaminaciju, pripremu uzoraka i RT-PCR reakcije potrebno je obavljati u odvojenim zonama.

## Postupak

**Priprema uzoraka:** Za ispitke respiratornog trakta (nazalne, orofaringealne i nazofaringealne brisove) slijedite korak 1. Za ispitke sline nastavite na korak 2.

1. Ispitci respiratornog trakta (nazalni, orofaringealni i nazofaringealni brisovi):
  - 1a. Snažno promiješajte bris koji sadržava uzorak na vorteks miješalici.
  - 1b. Alikvotirajte 50 – 200 µl uzorka u epruvete bez PCR-a od 1,5 ml.
  - 1c. Provedite korak zagrijavanja na 70 °C u trajanju od 10 min na grijaćem bloku.
  - 1d. Ohladite uzorke na ledu najmanje 5 min, a potom ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C.

2. Uzorci sline:
  - 2a. Ukapljivanje (radi olakšavanja pipetiranja): zagrijte uzorak sline na 95 °C tijekom 15 min (neodređeni volumen, spremnik ili uređaj za zagrijavanje).
  - 2b. Homogenizirajte uzorak polaganim uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 8 – 10 puta
  - 2c. Alikvotirajte 50 µl uzorka u epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
  - 2d. Izvedite korak zagrijavanja na 95 °C tijekom 15 min na grijaćem bloku, a zatim držite uzorak na sobnoj temperaturi najmanje 5 min sve do njegova postavljanja u jažicu ili epruvetu za PCR.
3. Prilikom prve uporabe nadopunite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer bojom ROX Reference Dye.
  - 3a. Dodajte 32,8 µl boje ROX u epruvetu s puferom SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zatvorite poklopac epruvete koja sadržava SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i boju ROX i preokrenite epruvetu 3 puta.
  - 3c. Vrtanjom pogurnite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer koji sadržava boju ROX na dno epruvete.
4. Za punu pločicu ABI 7500 Fast Dx (96 jažica) pripremite mješavinu početnica SARS-CoV-2 Amp Primers s internom kontrolom SARS-CoV-2 Internal Control za alikvotiranje.
  - 4a. Prenesite potreban volumen početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control u skladu s tablicom 5. u novu epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
  - 4b. Zatvorite poklopac i preokrenite epruvetu 3 puta ili je promiješajte pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 s.
  - 4c. Vrtanjom pogurnite početnice SARS-CoV-2 Amp Primers koje sadržavaju IC kako biste otopinu doveli do dna epruvete.

**Tablica 5. Postavljanje mješavine SARS-CoV-2 Amp Primers + IC**

Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Broj reakcija Volumen (µl)	
Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	1 rxn	96 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Ukupno mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

\* **Napomena:** Prilagodite volumene početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

- Pripremite reakcijsku mješavinu prema tablici 6. i dobro je promiješajte preokretanjem epruvete 3 puta.

**Tablica 6. Postavljanje reakcijske mješavine**

Reakcijska mješavina za RT-PCR			Broj reakcija Volumen (µl)	
Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	1 rxn	96 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
Mješavina SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Ukupni volumen reakcije	–		15,00	1728

\* **Napomena:** Prilagodite volumen pufera SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i početnica SARS-CoV-2 Amp Primers broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

- Pipetirajte 8 µl vode bez nukleaze u jažicu namijenjenu za NEC.
- Postavite 10 µl vode bez nukleaze u jažicu namijenjenu za NTC.
- Pipetirajte 2 µl pufera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer u svaku jažicu namijenjenu za NEC i u pripremljene uzorke.
- Dodajte 8 µl pripremljenog uzorka u jažicu koja sadržava pufer SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
- Dodajte 15 µl reakcijske mješavine pripremljene u koraku 5. u jažice namijenjene za uzorke i kontrole (pogledajte primjer na slici 3.). Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.

11. Napunite 10 µl pozitivne kontrole SARS-CoV-2 Positive Control u odgovarajuću jažicu. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
12. Zatvorite jažicu pločice za PCR kako biste spriječili križnu kontaminaciju. Pazite da na cijeloj pločici jednolično primijenite pritisak kako biste postigli čvrstu brtvu u svakoj pojedinačnoj jažici.
13. Kratko centrifugirajte pločicu za PCR kako biste pokupili tekućinu na dnu jažice.
14. Postavite program za real-time RT-PCR na način rada „Standard 7500” (Standardno 7500) za ABI 7500 Fast Dx u skladu s tablicom 7.

**Napomena:** Nakon što kliknete na **file** (datoteka) i **new** (nova), provjerite je li ispitivanje postavljeno na **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standardna krivulja (apsolutna kvantifikacija)), a Run Mode (Način rada) na **Standard 7500** (Standardno 7500). Odaberite FAM, VIC i Cy5 kao obilježavajuće boje s Quencher (Prigušujuća boja) postavljenom na **None** (Nema), dok se podaci moraju prikupljati s postavkom **ROX** za **passive reference** (pasivna referencija).

**Napomena:** Prikupljanje podataka trebalo bi se obavljati tijekom koraka sparivanja/ekstenzije.

**Napomena:** Za više informacija pogledajte *Upute za uporabu za ABI 7500 Fast Dx*.

15. Postavite pločicu u cikler u stvarnom vremenu (primjer rasporeda pločice za PCR prikazan je na slici 3.) i pokrenite program cikliranja kako je opisano u tablici 7.
16. Odaberite iskorištene jažice i za njih primijenite obilježavajuće boje FAM, VIC i Cy5. Podaci se moraju prikupljati s pasivnom bojom ROX postavljenom na **ON** (Uključeno).
17. Provjerite je li standardna krivulja instrumenta ABI 7500 Fast Dx konfigurirana prema apsolutnoj kvantifikaciji.
18. Pokrenite postupak.
19. Po završetku postupka analizirajte rezultate (pogledajte odjeljak Rezultati).

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

Koraci	Vrijeme	Temperatura (°C)	Broj ciklusa	Prikupljanje
Obrnuta transkripcija	10 min	50	1	Ne
Početna aktivacija topline za PCR	2 min	95	1	Ne
Cikliranje u 2 koraka				
Denaturacija	5 s	95	40	Ne
Sparivanje/ekstenzija	30 s	58		FAM, VIC i Cy5

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

**Slika 3. Primjer rasporeda pločice na instrumentu ABI 7500 Fast Dx**

# Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu CFX96 Dx

Ovaj je protokol namijenjen za pripremu i otkrivanje ciljnih sekvenci virusa SARS-CoV-2 u humanim nazalnim, nazofaringealnim ili orofaringealnim brisovima pohranjenima u transportnom mediju te u uzorcima čiste sline na instrumentu CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., kat. br. 1845097-IVD, (modul za optičku reakciju) i 1841000-IVD (modul termociklera) sa softverom CFX Manager Dx Software inačice 3.1.309001022 ili novije.

## Važne točke prije započinjanja

- Provjerite poštuju li se rokovi trajanja i uvjeti pohrane otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponentata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.
- Upotrebljavajte dobro održavanu i kalibriranu opremu.
- Pazite da izbjegavate kontaminaciju RNazama tijekom ispitivanja i koristite se plastičnim priborom bez nukleaze.

## Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Respiratorni uzorci mogu se čuvati na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije, ali preporučuje se da ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C na stalku za hlađenje.
- Uzorci sline mogu se čuvati na ledu ili na 4 °C na stalku za hlađenje, ali preporučuje se da ih se drži na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije.
- Prije uporabe ostavite SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vodu za NTC i SARS-CoV-2 Positive Control da se u potpunosti odmrznu na sobnoj temperaturi. Držite epruvete na sobnoj temperaturi i zaštićene od svjetlosti do uporabe.

- Prije uporabe homogenizirajte SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i SARS-CoV-2 UM Amp Buffer tako da ih preokrenete 2 – 3 puta (nemojte ih miješati na vorteks miješalici), a zatim brzo zavrtnite. Svi ostali pojedinačni reagensi mogu se homogenizirati pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 sekundi ili preokretanjem 2 – 3 puta, nakon čega ih je potrebno brzo zavrtnjeti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibira RNaze prisutne u kliničkim uzorcima za korak detekcije, ali on nije otopina za inaktivaciju virusa. Sa svim je uzorcima potrebno postupati kao da su potencijalno opasni.
- Provjerite jesu li uvjeti cikliranja platforme za real-time RT-PCR u skladu s informacijama navedenima u ovom protokolu.
- Reagensi se mogu alikvotirati kako bi se izbjegli višestruki ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja.
- Pripremite svježiju reakcijsku mješavinu (< 2 h prije pokretanja pločice za PCR).
- Da biste minimizirali kontaminaciju, pripremu uzoraka i real-time RT-PCR reakcije potrebno je obavljati u odvojenim zonama.

## Postupak:

**Priprema uzoraka:** Za ispitke respiratornog trakta (nazalne, orofaringealne i nazofaringealne brisove) slijedite korak 1. Za ispitke sline nastavite na korak 2.

1. Ispitci respiratornog trakta (nazalni, orofaringealni i nazofaringealni brisovi):
  - 1a. Snažno promiješajte bris koji sadržava uzorak na vorteks miješalici
  - 1b. Alikvotirajte 50 – 200 µl uzorka u epruvete bez PCR-a od 1,5 ml
  - 1c. Provedite korak zagrijavanja na 70 °C u trajanju od 10 min na grijaćem bloku.
  - 1d. Ohladite uzorke na ledu najmanje 5 min, a potom ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C.
2. Uzorci sline:
  - 2a. Ukapljivanje (radi olakšavanja pipetiranja): zagrijte uzorak sline na 95 °C tijekom 15 min (neodređeni volumen, spremnik ili uređaj za zagrijavanje).
  - 2b. Homogenizirajte uzorak polaganim uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 8 – 10 puta.



- 2c. Alikvotirajte 50 µl uzorka u epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
- 2d. Provedite korak zagrijavanja na 95 °C u trajanju od 15 min na grijaćem bloku. Zatim držite uzorak na sobnoj temperaturi najmanje 5 min sve do postavljanja u jažicu ili epruvetu za PCR.
3. Prilikom prve uporabe nadopunite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer bojom ROX Reference Dye.
  - 3a. Dodajte 32,8 µl boje ROX u 1 epruvetu pufera SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zatvorite poklopac epruvete koja sadržava SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i boju ROX i preokrenite epruvetu 3 puta.
  - 3c. Vrtanjem pogurnite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer koji sadržava boju ROX na dno epruvete.
4. Za punu pločicu CFX96 Dx (96 jažica) pripremite mješavinu početnica SARS-CoV-2 Amp Primers s internom kontrolom SARS-CoV-2 Internal Control za alikvotiranje.
  - 4a. Prenesite potreban volumen početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control u skladu s tablicom 8. u novu epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
  - 4b. Zatvorite poklopac i preokrenite epruvetu 3 puta ili je promiješajte pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 s.
  - 4c. Vrtanjem pogurnite početnice SARS-CoV-2 Amp Primers koje sadržavaju IC kako biste otopinu doveli do dna epruvete.

**Tablica 8. Postavljanje mješavine SARS-CoV-2 Amp Primers + IC**

Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	Broj reakcija Volumen (µl)	
			1 rxn	96 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Ukupno mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

\* **Napomena:** Prilagodite volumene početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

5. Pripremite reakcijsku mješavinu prema tablici 9. i dobro je promiješajte preokretanjem epruvete 3 puta.

**Tablica 9. Postavljanje reakcijske mješavine**

Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	Broj reakcija Volumen (µl)	
			1 rxn	96 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
Mješavina SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Ukupni volumen reakcije	–		15,00	1728

\* **Napomena:** Prilagodite volumene pufera SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i početnica SARS-CoV-2 Amp Primers broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

- Pipetirajte 8 µl vode bez nukleaze u jažicu namijenjenu za NEC.
- Postavite 10 µl vode bez nukleaze u jažicu namijenjenu za NTC.
- Pipetirajte 2 µl pufera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer u svaku jažicu namijenjenu za NEC i u pripremljene uzorke.
- Dodajte 8 µl pripremljenog uzorka u jažicu koja sadržava pufer SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
- Dodajte 15 µl reakcijske mješavine pripremljene u koraku 5. u jažice namijenjene za uzorke i kontrole (slika 4. priložena je kao primjer). Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
- Napunite 10 µl pozitivne kontrole SARS-CoV-2 Positive Control u odgovarajuću jažicu. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
- Zatvorite jažicu pločice za PCR kako biste spriječili križnu kontaminaciju. Pazite da na cijeloj pločici jednolično primijenite pritisak kako biste postigli čvrstu brtvu u svakoj pojedinačnoj jažici.
- Kratko centrifugirajte pločicu za PCR kako biste pokupili tekućinu na dnu jažice.
- U CFX Manager Dx Software > Startup Wizard (Čarobnjak za pokretanje), pod run type (vrsta postupka) odaberite user defined (korisnički definirano).
- Kartica **Protocol** (Protokol): Postavite program za real-time RT-PCR u skladu s tablicom 10. za volumen reakcije od 25 µl.

**Napomena:** U prozoru **Protocol Editor** (Uređivač protokola) kliknite na gumb **Step Options** (Mogućnosti koraka) da biste stopu povećanja prilagodili na 1,6 °C/s u svakom od 4 koraka programa za RT-PCR.

**Napomena:** Prikupljanje podataka trebalo bi se obavljati tijekom koraka sparivanja/ekstenzije.

**Napomena:** Za više informacija pogledajte *Upute za uporabu za CFX96 Dx*.

16. Kartica **Plate** (Pločica): Odaberite iskorištene jažice i za njih primijenite obilježavajuće boje FAM, HEX i Cy5.
17. Postavite pločicu u cikler u stvarnom vremenu (primjer rasporeda pločice za PCR prikazan je na slici 4.).
18. Kartica **Start Run** (Pokreni postupak): kliknite na Start the run (Pokreni postupak).
19. Po završetku postupka analizirajte rezultate (pogledajte odjeljak Rezultati).

**Tablica 10. Program SARS-CoV-2 Prep&Amp UM za CFX96 Dx**

Koraci	Vrijeme	Temperatura (°C)	Stopa povećanja (°C/s)	Broj ponavljanja	Prikupljanje
1. Obrnuta transkripcija	10 min	50	1,6	1	Ne
2. Početna aktivacija topline za PCR	2 min	95	1,6	1	Ne
Cikliranje u 2 koraka				39*	
Denaturacija	5 s	95	1,6	1	Ne
Sparivanje/ekstenzija	30 s	58	1,6	1	FAM, HEX i Cy5

\*CFX radi ponavljanjem. Da bi program izveo 40 ciklusa, za cikliranje u dva koraka mora biti postavljeno 39 ponavljanja (kao korak 5. „GOTO” u softveru).

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

**Slika 4. Primjer rasporeda pločice na instrumentu CFX96 Dx**

# Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu cobas z 480

Ovaj protokol opisuje pripremu uzorka i real-time RT-PCR postupka za otkrivanje ciljnih sekvenci virusa SARS-CoV-2 u humanim nazalnim, nazofaringealnim ili orofaringealnim brisovima pohranjenima u transportnom mediju te u uzorku čiste sline na instrumentu cobas z 480 sa softverom LightCycler 480 SW UDF inačice 2.0.0 (ili novije).

## Važne točke prije započinjanja.

- Provjerite poštuju li se rokovi trajanja i uvjeti pohrane otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponentata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.
- Upotrebljavajte dobro održavanu i kalibriranu opremu.
- Pazite da izbjegavate kontaminaciju RNazama tijekom ispitivanja i koristite se plastičnim priborom bez nukleaze.

## Postupci koje treba napraviti prije započinjanja.

- Respiratorni uzorci mogu se čuvati na sobnoj temperaturi tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije, ali preporučuje se da ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C na stalku za hlađenje.
- Uzorci sline mogu se čuvati na ledu ili na 4 °C na stalku za hlađenje, ali preporučuje se da ih se drži na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije.
- Prije uporabe ostavite SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vodu za NTC i SARS-CoV-2 Positive Control da se u potpunosti odmrznu na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C). Držite epruvete na sobnoj temperaturi i zaštićene od svjetlosti do uporabe.

- Prije uporabe homogenizirajte SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i SARS-CoV-2 UM Amp Buffer tako da ih preokrenete 2 – 3 puta (nemojte ih miješati na vorteks miješalici), a zatim brzo zavrtnite. Svi ostali pojedinačni reagensi mogu se homogenizirati pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 sekundi ili preokretanjem 2 – 3 puta, nakon čega ih je potrebno brzo zavrtnuti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibira RNaze prisutne u kliničkim uzorcima za korak detekcije, ali on nije otopina za inaktivaciju virusa. Sa svim je uzorcima potrebno postupati kao da su potencijalno opasni.
- Provjerite jesu li uvjeti cikliranja platforme za real-time RT-PCR u skladu s informacijama navedenima u ovom protokolu.
- Reagensi se mogu alikvotirati kako bi se izbjegli višestruki ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja.
- Pripremite svježu reakcijsku mješavinu (< 2 h prije pokretanja pločice za real-time RT-PCR).
- Da biste minimizirali kontaminaciju, pripremu uzoraka i real-time RT-PCR reakcije potrebno je obavljati u odvojenim zonama.

## Postupak:

**Priprema uzoraka:** Za ispitke respiratornog trakta (nazalne, orofaringealne i nazofaringealne brisove) slijedite korak 1. Za ispitke sline nastavite na korak 2.

1. Ispitci respiratornog trakta (nazalni, orofaringealni i nazofaringealni brisovi):
  - 1a. Snažno promiješajte bris koji sadržava uzorak na vorteks miješalici.
  - 1b. Alikvotirajte 50 – 200 µl uzorka u epruvete bez PCR-a od 1,5 ml
  - 1c. Provedite korak zagrijavanja na 70 °C u trajanju od 10 min na grijaćem bloku.
  - 1d. Ohladite uzorke na ledu najmanje 5 min, a potom ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C.

2. Uzorci sline:
  - 2a. Ukapljivanje (radi olakšavanja pipetiranja): zagrijte uzorak sline na 95 °C tijekom 15 min (neodređeni volumen, spremnik ili uređaj za zagrijavanje).
  - 2b. Homogenizirajte uzorak polaganim uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 8 – 10 puta.
  - 2c. Alikvotirajte 50 µl uzorka u epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
  - 2d. Izvedite korak zagrijavanja na 95 °C tijekom 15 min na grijaćem bloku, a zatim držite uzorak na sobnoj temperaturi najmanje 5 min sve do njegova postavljanja u jažicu ili epruvetu za PCR.
3. Prilikom prve uporabe nadopunite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer bojom ROX Reference Dye.
  - 3a. Dodajte 32,8 µl boje ROX u 1 epruvetu pufera SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zatvorite poklopac epruvete koja sadržava SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i boju ROX i preokrenite epruvetu 3 puta.
  - 3c. Vrtnjom pogurnite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer koji sadržava boju ROX na dno epruvete.
4. Za punu pločicu cobas z 480 (96 jažica) pripremite mješavinu početnica SARS-CoV-2 Amp Primers s internom kontrolom SARS-CoV-2 Internal Control za alikvotiranje.
  - 4a. Prenesite potreban volumen početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control u skladu s tablicom 11. u novu epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
  - 4b. Zatvorite poklopac i preokrenite epruvetu 3 puta ili je promiješajte pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 s.
  - 4c. Vrtnjom pogurnite početnice SARS-CoV-2 Amp Primers koje sadržavaju IC kako biste otopinu doveli do dna epruvete.

**Tablica 11. Postavljanje mješavine SARS-CoV-2 Amp Primers + IC**

Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Broj reakcija Volumen (µl)	
Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	1 rxn	96 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Ukupno mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

\* **Napomena:** Prilagodite volumene početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

- Pripremite reakcijsku mješavinu prema tablici 12. i dobro je promiješajte preokretanjem epruvete 3 puta.

**Tablica 12. Postavljanje reakcijske mješavine**

Reakcijska mješavina za RT-PCR			Broj reakcija Volumen (µl)	
Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	1 rxn	96 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
Mješavina SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Ukupni volumen reakcije		–	15,00	1728

\* **Napomena:** Prilagodite volumene pufera SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i početnica SARS-CoV-2 Amp Primers broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

- Pipetirajte 8 µl vode bez nukleaze u jažicu namijenjenu za NEC.
- Postavite 10 µl vode bez nukleaze u jažicu namijenjenu za NTC.
- Pipetirajte 2 µl pufera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer u svaku jažicu namijenjenu za NEC i u pripremljene uzorke.
- Dodajte 8 µl pripremljenog uzorka u jažicu koja sadržava pufer SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
- Dodajte 15 µl reakcijske mješavine pripremljene u koraku 5. u jažice namijenjene za uzorke i kontrole (slika 5. priložena je kao primjer). Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.

11. Napunite 10 µl pozitivne kontrole SARS-CoV-2 Positive Control u odgovarajuću jažicu. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
12. Zatvorite jažicu pločice za PCR kako biste spriječili križnu kontaminaciju. Pazite da na cijeloj pločici jednolično primijenite pritisak kako biste postigli čvrstu brtvu u svakoj pojedinačnoj jažici.
13. Kratko centrifugirajte pločicu za PCR kako biste pokupili tekućinu na dnu jažice.
14. **Prva uporaba:** U softveru Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0 kliknite na **open tools** (otvori alate) i odaberite **detection formats** (formati detekcije) da biste postavili sljedeće kombinacije ekscitacije i emisije: 465-510 (FAM), 540-580 (HEX) i 610-670 (ATTO647N).
15. Postavite program za real-time RT-PCR u skladu s tablicom 13. za volumen reakcije od 25 µl.

**Napomena:** Na vrhu stranice odaberite **detection format** (format detekcije) kako biste odabrali format detekcije izrađen u koraku 14.

**Napomena:** Upotrijebite prilagođenu stopu povećanja od 1,6 °C/s u svakom od 5 koraka programa za real-time RT-PCR.

**Napomena:** Prikupljanje podataka trebalo bi se obavljati tijekom koraka sparivanja/ekstenzije.

**Napomena:** Za više informacija pogledajte *Upute za uporabu za cobas z 480*.

16. Postavite pločicu u cikler u stvarnom vremenu (primjer rasporeda pločice za PCR prikazan je na slici 5.).
17. Pokrenite postupak.
18. Po završetku postupka analizirajte rezultate (pogledajte odjeljak Rezultati).



**Tablica 13. Program SARS-CoV-2 Prep&Amp UM za cobas z 480**

Koraci	Vrijeme	Temperatura (°C)	Stopa povećanja (°C/s)	Broj ciklusa	Način analize
Obrnuta transkripcija	10 min	50	1,6	1	Nema
Početna aktivacija topline za PCR	2 min	95	1,6	1	Nema
Cikliranje u 2 koraka				40	Kvantifikacija
Denaturacija	5 s	95	1,6		Nema
Sparivanje/ekstenzija	30 s	58	1,6		Pojedinačna
Hlađenje	1 min	37	1,6	1	Nema

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

**Slika 5. Primjer rasporeda pločice na instrumentu cobas z 480**

# Protokol: Priprema uzoraka i detekcija virusa SARS-CoV-2 na instrumentu QuantStudio 5 Dx

Ovaj je protokol namijenjen za pripremu i otkrivanje ciljnih sekvenci virusa SARS-CoV-2 u humanim nazalnim, nazofaringealnim ili orofaringealnim brisovima pohranjenima u transportnom mediju te u uzorcima čiste sline na real-time RT-PCR instrumentu QuantStudio 5 Dx.

## Važne točke prije započinjanja.

- Provjerite poštuju li se rokovi trajanja i uvjeti pohrane otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponentata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.
- Upotrebljavajte dobro održavanu i kalibriranu opremu.
- Pazite da izbjegavate kontaminaciju RNazama tijekom ispitivanja i koristite se plastičnim priborom bez nukleaze.
- Kada se upotrebljava instrument QuantStudio 5 Dx, boju ROX potrebno je dodati epruveti s glavnom mješavinom prije prve uporabe.

## Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Respiratorni uzorci mogu se čuvati na sobnoj temperaturi tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije, ali preporučuje se da ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C na stalku za hlađenje.
- Uzorak sline može se čuvati na ledu ili na 4 °C na stalku za hlađenje, ali preporučuje se da ga se drži na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) tijekom koraka pripreme i postavljanja reakcije.
- Boja ROX nužna je kada se upotrebljava instrument QuantStudio 5.

- Prije uporabe ostavite SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, vodu za NTC i SARS-CoV-2 Positive Control da se u potpunosti odmrznu na 15 – 25 °C. Držite epruvete na sobnoj temperaturi i zaštićene od svjetlosti do uporabe.
- Prije uporabe homogenizirajte SARS-CoV-2 UM Prep Buffer i SARS-CoV-2 UM Amp Buffer tako da ih preokrenete 2 – 3 puta (nemojte ih miješati na vorteks miješalici), a zatim brzo zavrtite. Svi ostali pojedinačni reagensi mogu se homogenizirati pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 sekundi ili preokretanjem 2 – 3 puta, nakon čega ih je potrebno brzo zavrtjeti.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibira RNaze prisutne u kliničkim uzorcima za korak detekcije, ali on nije otopina za inaktivaciju virusa. Sa svim je uzorcima potrebno postupati kao da su potencijalno opasni.
- Provjerite jesu li uvjeti cikliranja platforme za real-time RT-PCR u skladu s informacijama navedenima u ovom protokolu.
- Reagensi se mogu alikvotirati kako bi se izbjegli višestruki ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja.
- Pripremite svježiju reakcijsku mješavinu (< 2 h prije pokretanja pločice za real-time RT-PCR).
- Da biste minimizirali kontaminaciju, pripremu uzoraka i real-time RT-PCR reakcije potrebno je obavljati u odvojenim zonama.

## Postupak

**Priprema uzoraka:** Za ispitke respiratornog trakta (nazalne, orofaringealne i nazofaringealne brisove) slijedite korak 1. Za ispitke sline nastavite na korak 2.

1. Ispitci respiratornog trakta (nazalni, orofaringealni i nazofaringealni brisovi):
  - 1a. Snažno promiješajte bris koji sadržava uzorak na vorteks miješalici.
  - 1b. Alikvotirajte 50 – 200 µl uzorka u epruvete bez PCR-a od 1,5 ml
  - 1c. Provedite korak zagrijavanja na 70 °C u trajanju od 10 min na grijaćem bloku.
  - 1d. Ohladite uzorke na ledu najmanje 5 min, a potom ih držite na ledu ili na temperaturi od 4 °C.

2. Uzorci sline:
  - 2a. Ukapljivanje (radi olakšavanja pipetiranja): zagrijte uzorak sline na 95 °C tijekom 15 min (neodređeni volumen, spremnik ili uređaj za zagrijavanje).
  - 2b. Homogenizirajte uzorak polaganim uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 8 – 10 puta.
  - 2c. Alikvotirajte 50 µl uzorka u epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
  - 2d. Izvedite korak zagrijavanja na 95 °C tijekom 15 min na grijaćem bloku, a zatim držite uzorak na sobnoj temperaturi najmanje 5 min sve do njegova postavljanja u jažicu ili epruvetu za PCR.
3. Prilikom prve uporabe nadopunite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer bojom ROX Reference Dye.
  - 3a. Dodajte 32,8 µl boje ROX u epruvetu s puferom SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
  - 3b. Zatvorite poklopac epruvete koja sadržava SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i boju ROX i preokrenite epruvetu 3 puta.
  - 3c. Vrtanjem pogurnite SARS-CoV-2 UM Amp Buffer koji sadržava boju ROX na dno epruvete.
4. Za punu pločicu QuantStudio 5 (96 jažica) pripremite mješavinu početnica SARS-CoV-2 Amp Primers s internom kontrolom SARS-CoV-2 Internal Control za alikvotiranje.
  - 4a. Prenesite potreban volumen početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control u skladu s tablicom 14. u novu epruvetu bez PCR-a od 1,5 ml.
  - 4b. Zatvorite poklopac i preokrenite epruvetu 3 puta ili je promiješajte pulsiranjem na vorteks miješalici 3 – 5 s.
  - 4c. Vrtanjem pogurnite početnice SARS-CoV-2 Amp Primers koje sadržavaju IC kako biste otopinu doveli do dna epruvete.

**Tablica 14. Postavljanje mješavine SARS-CoV-2 Amp Primers + IC**

Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Broj reakcija Volumen (µl)	
Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	1 rxn	96 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	172,8
Ukupno mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1008

\* **Napomena:** Prilagodite volumene početnica SARS-CoV-2 Amp Primers i interne kontrole SARS-CoV-2 Internal Control broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

- Pripremite reakcijsku mješavinu prema tablici 15. i dobro je promiješajte preokretanjem epruvete 3 puta.

**Tablica 15. Postavljanje reakcijske mješavine**

Reakcijska mješavina za RT-PCR			Broj reakcija Volumen (µl)	
Reagensi	Koncentracija osnovne otopine	Konačna koncentracija	1 rxn	96 rxn (+20 % dodatnog volumena*)
Mješavina SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Mješavina SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	2,9x	1x	8,75	1008
Ukupni volumen reakcije	–		15,00	1728

\* **Napomena:** Prilagodite volumene pufera SARS-CoV-2 UM Amp Buffer i početnica SARS-CoV-2 Amp Primers broju uzoraka koji će se testirati. Razmotrite uporabu dodatnog volumena radi kompenzacije mrtvog volumena.

- Pipetirajte 8 µl vode bez nukleaze u jažicu namijenjenu za NEC.
- Postavite 10 µl vode bez nukleaze u jažicu namijenjenu za NTC.
- Pipetirajte 2 µl pufera SARS-CoV-2 UM Prep Buffer u svaku jažicu namijenjenu za NEC i u pripremljene uzorke.
- Dodajte 8 µl pripremljenog uzorka u jažicu koja sadržava pufer SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
- Dodajte 15 µl reakcijske mješavine pripremljene u koraku 5. u jažice namijenjene za uzorke i kontrole (slika 6. priložena je kao primjer). Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.

11. Napunite 10 µl pozitivne kontrole SARS-CoV-2 Positive Control u odgovarajuću jažicu. Promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskivanjem iz nje 5 puta.
12. Zatvorite jažicu pločice za PCR kako biste spriječili križnu kontaminaciju. Pazite da na cijeloj pločici jednolično primijenite pritisak kako biste postigli čvrstu brtvu u svakoj pojedinačnoj jažici.
13. Kratko centrifugirajte pločicu za PCR kako biste pokupili tekućinu na dnu jažice.
14. **Prva uporaba:** Predložak mora biti generiran u softveru QuantStudio 5 Dx TD inačice 1.0.1 ili novije i objavljen prije pokretanja postupka u softveru QuantStudio 5 Dx IVD. Postavite predložak u skladu s time:

**Napomena:** Na kartici Properties (Svojstva) konfigurirajte Experiment type (Vrsta eksperimenta) na Standard Curve (Standardna krivulja), a Run mode (Način rada) na Standard (Standardno).

**Napomena:** Na kartici **Method** (Metoda), postavite program za real-time RT-PCR za volumen reakcije od 25 µl (tablica 16.).

**Napomena:** Prikupljanje podataka trebalo bi se obavljati tijekom koraka sparivanja/ekstenzije.

**Napomena:** Na kartici **Plate** (Pločica) odaberite **ROX** kao **Passive Reference** (Pasivna referencija) te postavite FAM, VIC i Cy5 kao ciljne sekvence bez postavke za Quencher (Prigušujuća boja) (odaberite **None** (Nema)).

**Napomena:** Za više informacija pogledajte *Upute za uporabu za QuantStudio 5 Dx*.
15. U softveru QuantStudio 5 Dx IVD učitajte predložak koji je prethodno izrađen u koraku 14. Odaberite iskorištene jažice i za njih primijenite ciljne sekvence FAM, VIC i Cy5.
16. Postavite pločicu u cikler u stvarnom vremenu (primjer rasporeda pločice za PCR prikazan je na slici 6.).
17. Pokrenite postupak.
18. Po završetku postupka analizirajte rezultate (pogledajte odjeljak Rezultati).

**Tablica 16. Program SARS-CoV-2 Prep&Amp UM za QuantStudio 5 Dx**

Faza	Korak	Vrijeme	Temperatura (°C)	Broj ciklusa	Prikupljanje
Zadržavanje	1. Obrnuta transkripcija	10 min	50	1	Ne
	2. Početna aktivacija topline za PCR	2 min	95	1	Ne
PCR	Cikliranje u 2 koraka			40	
	Denaturacija	5 s	95	1	Ne
	Sparivanje/ekstenzija	30 s	58	1	FAM, VIC i Cy5

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

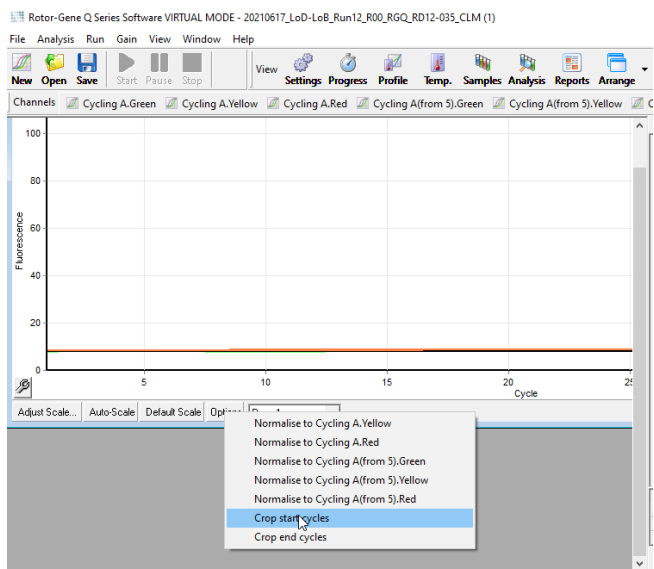
**Slika 6. Primjer rasporeda pločice na instrumentu QuantStudio 5 Dx**

# Rezultati

## Analiza na instrumentu RGQ MDx 5plex HRM

Na instrumentu RGQ MDx 5plex HRM podaci se analiziraju s pomoću softvera Rotor-Gene Q inačice 2.3.1 (ili novije) prema uputama proizvođača (Korisnički priručnik za Rotor-Gene Q MDx, revizija 7, rujan 2018.).

Za analizu podataka mora se upotrebljavati skraćeni ciklus (slika 7.): Otvorite neobrađeni kanal **Cycling A.Green**. Idite na **Options** (Mogućnosti) > **Crop Start Cycles** (Ciklusi skraćenog početka) i unesite **5** u dijaloški okvir. Izradit će se novi kanal naziva Cycling A(from 5).Green. Isto je potrebno učiniti za neobrađene kanale Red i Yellow kako bi se izradili kanali **Cycling A(from 5).Red** i **Cycling A(from 5).Yellow**.



Slika 7. Snimka zaslona za postavljanje skraćenih ciklusa za analizu postupaka instrumenta RGQ MDx 5plex HRM

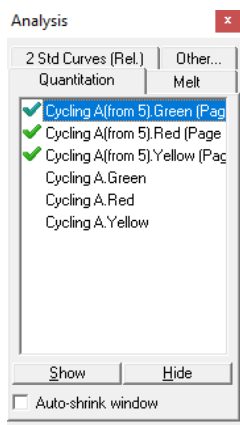


Otvorite izbornik za analizu (slika 8.) i za svaki izrađeni kanal Cycling A(from 5) primijenite sljedeće parametre analize radi održavanja dosljednosti između različitih analiza (tablica 17.).

**Tablica 17. Parametri analize za RGQ MDx 5plex HRM**

Kanali	Green	Red	Yellow
Prag fluorescencije	0,03	0,03	0,03
Ispravak nagiba	Da	Da	Da
Dinamička epruveta	Da	Da	Da
Početna točka	Ne	10 – 20	10 – 20
Uklanjanje sumnjive vrijednosti: prag učinkovitosti reakcije	Da Omogućeno 0 %	Ne	Da Omogućeno –85 %
Ciklusi skraćenog početka	5	5	5
Granični ciklusi	Za Ct > 38,00 smatra se da iznosi 40,00	Ne	Za Ct > 35,00 smatra se da iznosi 40,00

U softveru RGQ rezultati obrade dostupni su na mreži kvantifikacijskih rezultata otvorenoj tijekom analize. Podatke je moguće izvesti u formatu vrijednosti odvojene zarezom (.csv): U prozoru softvera RGQ odaberite **File (Datoteka) > save as (spremi kao) > Excel analysis sheet (Excel list za analizu)**. Provjerite jesu li svi uzorci odabrani prije izvoza rezultata (slika 8.).



**Slika 8. Snimka zaslona odabranih kanala za primjenu parametara analize i izvoz rezultata (analiza postupaka instrumenta RGQ MDx 5plex HRM).**

## Analiza na instrumentu ABI 7500 Fast Dx

Na instrumentu ABI 7500 Fast Dx podaci se analiziraju s pomoću softvera sustava 7500 Fast System Software inačice 1.4.1 (ili novije) prema uputama proizvođača. Na kartici **setup** (postavljanje) odaberite skupinu jažica ili cijelu pločicu dostupne u analizi i kliknite desnom tipkom miša da biste otvorili prozore kontrole jažica. Moraju se odabrati 3 fluorofora (FAM, VIC i Cy5), a **ROX** se mora odabrati kao **Passive reference** (Pasivna referencija). Sljedeći su parametri potrebni za dosljednost između različitih analiza (tablica 18.).

Tablica 18. Parametri analize za ABI 7500 Fast Dx

Kanali	FAM	Cy5	VIC
Pasivna boja	ROX	ROX	ROX
Prag fluorescencije	0,13	0,025	0,05
Postavljena početna vrijednost	Automatski	Automatski	Automatski
Granični ciklusi	Za Ct > 39,00 smatra se da iznosi 40,00	Ne	Za Ct > 35,00 smatra se da iznosi 40,00

U softveru ABI SDS, vrijednosti Ct za odabranu skupinu jažica ili cijelu pločicu dostupne su na listu **data** (podaci) unutar glavnog odjeljka **Results** (Rezultati). Podatke je moguće izvesti u formatu vrijednosti odvojene zarezom (.csv): U prozoru SDS Software (SDS softver) odaberite **File** (Datoteka) > **Export** (Izvoz) > **Results** (Rezultati) (stavku izbornika **Ct** također je moguće odabrati). Odaberite format izvezene datoteke .csv.

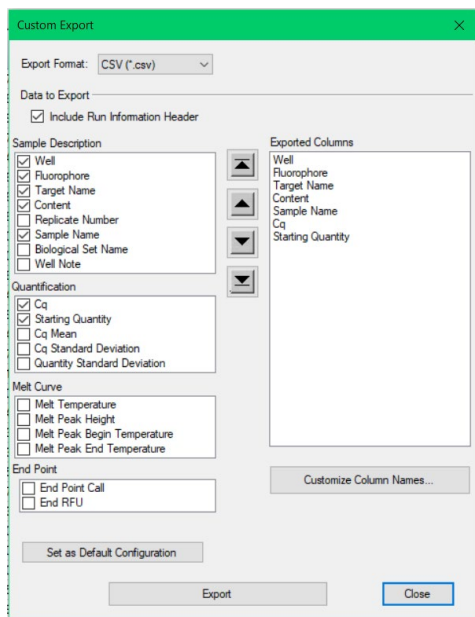
## Analiza na instrumentu CFX96 Dx

Na instrumentu CFX96 Dx podaci se analiziraju s pomoću softvera sustava CFX Manager Dx Software inačice 3.1.3090.1022 (ili novije) prema uputama proizvođača. FAM, HEX i Cy5 moraju se odabrati za sve jažice koje se upotrebljavaju u eksperimentu. Sljedeći su parametri potrebni za dosljednost između različitih analiza (tablica 19.).

**Tablica 19. Parametri analize za CFX96 Dx**

Kanali	FAM	HEX	Cy5
Način određivanja Cq: Jedan prag	Da	Da	Da
Početna postavka:			
• usklađivanje krivulje oduzimanjem	Da	Da	Da
• primijenite ispravak odstupanja fluorescencije	Da	Da	Da
Prag (RFU)	250	300	100
Granični ciklusi	Za Ct > 39,00 smatra se da iznosi 40,00	Za Ct > 35,00 smatra se da iznosi 40,00	Ne

U softveru CFX manager Dx Software, vrijednosti Ct (koje se u softveru nazivaju **Cq**) za odabranu skupinu jažica ili cijelu pločicu dostupne su na listu s podacima unutar odjeljka **Quantification Data** (Podaci o kvantifikaciji). Podaci se mogu izvesti u formatu vrijednosti odvojene zarezom (.csv) odabirom **Export** (Izvoz) > **Custom Export** (Prilagođeni izvoz) i postavljanjem parametara prema slici 9.



**Slika 9. Parametri datoteke s neobrađenim podacima za CFX96 Dx**

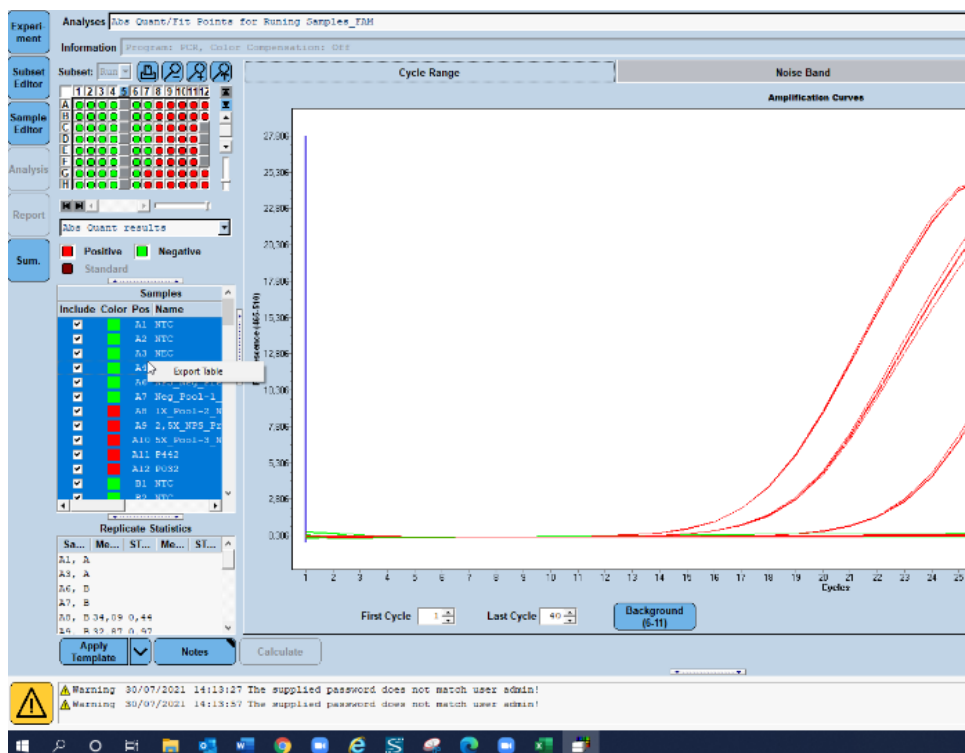
## Analiza na instrumentu cobas z 480

Na instrumentu cobas z 480 podaci se analiziraju s pomoću softvera LightCycler 480 SW UDF inačice 2.0.0 (ili novije) prema uputama proizvođača. Izradite podskup uzoraka samo s jažicama koje se upotrebljavaju u eksperimentu. Za svaki kanal izradite stranicu za Analysis (Analiza) **Abs Quant/Fit Points** (Apsolutna kvantifikacija / Točke za usklađivanje) i primijenite sljedeće parametre za dosljednost između različitih eksperimenata (tablica 20.).

**Tablica 20. Parametri analize za cobas z 480**

Kanali	FAM (465-510)	HEX (540-580)	ATTO647N (610-670)
Kartica Cycle range (Raspon ciklusa)			
• Prvi – zadnji ciklus	1 – 40	1 – 40	6 – 40
• Pozadina	5/10	5/10	6/11
Kartica Noise band (Pojas šuma)			
• Metoda	STD multiplikator	STD multiplikator	STD multiplikator
• Vrijednost STD multiplikatora	50	40	25
Kartica Analysis (Analiza)	2	2	2
• Točke za usklađivanje			
• Metoda praga	Automatski	Automatski	Automatski
<b>Granični ciklus</b>	Za Ct > 39,00 smatra se da iznosi 40,00	Za Ct > 35,00 smatra se da iznosi 40,00	Ne

U softveru LightCycler 480 SW UDF inačice 2.0.0 (ili novije) vrijednosti Ct (koje se u softveru nazivaju **Cp**) za odabranu skupinu jažica ili cijelu pločicu dostupne su u odjeljku **analysis** (analiza) (slika 10.). Podaci se mogu izvesti u formatu tekstualne datoteke (**.txt**) po kanalu klikom na desnu tipku miša na tablicu s rezultatima i odabirom **Export table** (Izvezi tablicu).



Slika 10. Snimka zaslona izvezenih podataka u softveru LightCycler 480 SW UDF inačice 2.0.0 (ili novije).

## Analiza na instrumentu QuantStudio 5 Dx

Na instrumentu QuantStudio 5 Dx podaci se analiziraju s pomoću softvera QuantStudio 5 Dx IVD inačice 1.0.1 (ili novije) prema uputama proizvođača. U prozoru **Assign Targets and Samples** (Dodijeli ciljne sekvence i uzorke) 3 fluorofora (FAM, VIC i Cy5) moraju se odabrati za sve jažice koje se upotrebljavaju u eksperimentu, a **ROX** mora biti odabran kao **Passive reference** (Pasivna referencija). Sljedeći su parametri potrebni za dosljednost između različitih analiza (tablica 21.).

Tablica 21. Parametri analize za QuantStudio 5 Dx

Kanali	FAM	VIC	Cy5
Pasivna boja	ROX	ROX	ROX
Prag fluorescencije	0,21	0,062	0,04
Postavljena početna vrijednost	Automatski	Automatski	Automatski
Granični ciklusi	Za Ct > 39,00 smatra se da iznosi 40,00	Za Ct > 35,00 smatra se da iznosi 40,00	Ne

Podaci se mogu izvesti kao proračunska tablica ili tekst (.xls, .xlsx, .txt). Na kartici **Export** (Izvoz) u prozoru softvera QuantStudio 5 Dx IVD odaberite sve mogućnosti u odjeljku **content** (sadržaj) i odaberite opciju **unify the above content into one file** (objedini gornji sadržaj u jednu datoteku).

## Tumačenje rezultata

Pozitivna kontrola (Positive Control, PC) te N1 i N2 geni detektiraju se u kanalu fluorescencije Green s pomoću instrumenta RGQ MDx 5plex HRM ili u kanalu fluorescencije FAM na instrumentima ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 i QuantStudio 5 Dx.

Kontrola uzorkovanja, koja se sastoji od RNaze P, detektira se u kanalu fluorescencije Yellow s pomoću instrumenta RGQ MDx 5plex HRM ili u kanalu fluorescencije VIC/HEX s pomoću instrumenata ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 i QuantStudio 5 Dx. Svaki bi klinički uzorak trebao pokazivati amplifikaciju kontrole uzorkovanja. Kod PC-a je moguće uočavanje amplifikacije u kanalu Yellow unatoč odsutnosti humanih sekvenci. U tom se slučaju signal u žutom Yellow PC-a može zanemariti jer snažan signal fluorescencije u kanalu Green može prijeći u kanal Yellow. Interna kontrola (Internal Control, IC) uključena je u početnice SARS-CoV-2 Amp Primers. Ona se detektira u kontroli bez predloška (No Template Control, NTC), kontroli bez ekstrakcije (No Extraction Control, NEC), pozitivnoj kontroli (Positive Control, PC) i kliničkim uzorcima s kanalom fluorescencije Red s pomoću instrumenta RGQ MDx 5plex HRM ili u kanalu fluorescencije Cy5/ATTO647N s pomoću instrumenata ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 i QuantStudio 5 Dx. Da bi real-time RT-PCR postupak bio valjan, PC, NTC i NEC kontrole moraju imati rezultate kako je prikazano (tablica 22., tablica 23.).

**Tablica 22. Kriteriji valjanosti postupka i tumačenje rezultata za RGQ MDx 5plex HRM**

Kontrola	Detekcija u kanalu Green	Detekcija u kanalu Yellow	Detekcija u kanalu Red	Tumačenje
<b>Pozitivna kontrola (Positive Control, PC)</b>	Ct ≤ 38,00	Neutralno	Neutralno	PC je valjan.
	Ct > 38,00 ili Nema Ct-a	Neutralno	Neutralno	PC je nevaljani.
<b>Kontrola bez predloška (No Template Control, NTC) ili</b>	Ct > 38,00 ili Nema Ct-a	Ct > 35,00 ili Nema Ct-a	Da	NTC/NEC je valjani.
				<b>Kontrola bez ekstrakcije (No Extraction Control, NEC)</b>

**Tablica 23. Kriteriji valjanosti postupka i tumačenje rezultata za real-time RT-PCR instrumente ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 i QuantStudio 5 Dx**

Kontrola	Detekcija boje FAM*	Detekcija boje VIC/HEX*	Detekcija boje Cy5/ATTO647N*	Tumačenje
<b>Pozitivna kontrola (Positive Control, PC)</b>	Ct ≤ 39,00	Neutralno	Neutralno	PC je valjan.
	Ct > 39,00 ili Nema Ct-a	Neutralno	Neutralno	PC je nevaljani.
<b>Kontrola bez predloška (No Template Control, NTC) ili</b>	Ct > 39,00 ili Nema Ct-a	Ct > 35,00 ili Nema Ct-a	Da	NTC/NEC je valjani.
<b>Kontrola bez ekstrakcije (No Extraction Control, NEC)</b>	Sve druge kombinacije s amplifikacijom u bojama FAM ili VIC/HEX		Neutralno	NTC/NEC je nevaljani.

Da bi se testirani uzorci potvrdili, uzorci moraju biti amplificirani i detektirani prema očekivanjima.

**Tablica 24. Kriteriji valjanosti uzorka i tumačenje rezultata za RGQ MDx 5plex HRM**

Detekcija u kanalu Green	Detekcija u kanalu Yellow	Detekcija u kanalu Red	Tumačenje
Ct ≤ 38,00	Neutralno	Neutralno	Uzorak je pozitivan na RNK virusa SARS-CoV-2.
Ct > 38,00 ili Nema Ct-a	Ct ≤ 35,00	Neutralno	Uzorak je negativan, RNK virusa SARS-CoV-2 nije detektiran.
Ct > 38,00 ili Nema Ct-a	Ct > 35,00 ili Nema Ct-a	Da	Nevaljani uzorak. Humani materijal nije detektiran ili ga je detektirano premalo. Nužno je ponovno prikupljanje uzoraka.
Ct > 38,00 ili Nema Ct-a	Ct > 35,00 ili Nema Ct-a	Ne	Nevaljani uzorak. Real-time RT-PCR reakcija je inhibirana. Potrebno je ponovno testiranje.

**Tablica 25. Kriteriji valjanosti uzorka i tumačenje rezultata za real-time RT-PCR instrumente ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 i QuantStudio 5 Dx.**

Detekcija boje FAM*	Detekcija boje VIC/HEX*	Detekcija boje Cy5/ATTO647N*	Tumačenje
Ct ≤ 39,00	Neutralno	Neutralno	Uzorak je pozitivan.
Ct > 39,00 ili Nema Ct-a	Ct ≤ 35,00	Neutralno	Uzorak je negativan, SARS-CoV-2 nije detektiran.
Ct > 39,00 ili Nema Ct-a	Ct > 35,00 ili Nema Ct-a	Da	Nevaljani uzorak. Humani materijal nije detektiran. Nužno je ponovno prikupljanje uzoraka.
Ct > 39,00 ili Nema Ct-a	Ct > 35,00 ili Nema Ct-a	Ne	Nevaljani uzorak. Real-time RT-PCR reakcija je inhibirana. Potrebno je ponovno testiranje.



## Ograničenja

- Samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu.
- Rezultati dobiveni s pomoću kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ne smiju se koristiti kao jedina osnova za dijagnozu, liječenje ili druge odluke vezane uz skrb o pacijentima. Negativni rezultati ne isključuju infekciju virusom SARS-CoV-2 te ne bi trebali služiti kao jedina osnova za donošenje odluka o liječenju pacijenta.
- Proizvod bi trebalo upotrebljavati osoblje koje je primilo posebne upute i obuku za *in vitro* dijagnostičke postupke.
- Strogo pridržavanje korisničkog priručnika real-time RT-PCR platforme (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ili QuantStudio 5 Dx) potrebno je za optimalne rezultate PCR-a.
- Potrebno je obratiti pozornost na rokove trajanja otisnute na kutiji i naljepnicama svih komponentata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok trajanja.
- Radne značajke ovog testa nisu utvrđene za ispitke sline pacijenata bez znakova i simptoma respiratorne infekcije.
- Da bi se izbjegao rizik od dobivanja lažno negativnog rezultata u slučaju da se nisko pozitivan klinički uzorak testira kada se tragovi krvi primijete u epruveti, to bi trebalo zabilježiti, a ako uzorak da negativan rezultat prilikom uporabe kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, uzorak bi trebalo ponovno prikupiti od pacijenta te ga ponovno testirati kompletom *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

# Radne značajke

## Analitička osjetljivost (granica detekcije)

Analitička osjetljivost ili granica detekcije definirana je kao najniža koncentracija pri kojoj  $\geq 95\%$  testiranih uzoraka daje pozitivne rezultate. Granica detekcije (Limit of Detection, LoD) procijenjena je analiziranjem serijskih razrjeđivanja negativnih nazofaringealnih uzoraka te ukapljenih uzoraka čiste sline pripremljenih s pomoću otopina inaktiviranih virusnih čestica visokog titra dobivenih od komercijalnih dobavljača (ZeptoMetrix®). Dva poola uzoraka upotrijebljena su za svaki ispitak za ispitivanja LoD-a. Da bi se potvrdila utvrđena koncentracija LoD, stopa detekcije svih replikata mora iznositi  $\geq 95\%$  (najmanje 19/20 replikata mora generirati pozitivan signal).

Koncentracija LoD-a potvrđena je na nazofaringealnim ispitcima i ispitcima čiste sline na navedenim real-time RT-PCR platformama (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx i cobas z 480).

### Nazalni, orofaringealni i nazofaringealni uzorci

Utvrdeno je da LoD iznosi 950 cp/ml za RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx i QuantStudio 5 Dx te 475 cp/ml za cobas z 480 (pogledajte tablicu 26.)

### Uzorci čiste sline

Utvrdeno je da LoD iznosi 950 cp/ml za RGQ MDx te 1200 cp/ml za ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx i CFX96 Dx (pogledajte tablicu 26.).

Tablica 26. Sažetak rezultata LoD-a za svaku real-time RT-PCR platformu

Platforma	Vrsta ispitka	Provjereni LoD (cp/ml)
RGQ MDx	NPS	950
	Čista slina	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Čista slina	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Čista slina	1200
cobas z 480	NPS	475
	Čista slina	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Čista slina	1200

## Ispitivanja analitičke specifičnosti (uključivost i isključivost/križna reaktivnost)

### Uključivost

Uključivost početnica i proba *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes procijenjena je *in silico* analizom na sekvencama dostupnima u bazi podataka GISAID ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)). Ukupno 722.488 sekvenci (dostupnih na 23/03/2021) analizirano je na COVID CG (<https://covidcg.org>), a metapodaci su osigurani iz baze podataka GISAID. Sekvence su bile usklađene s WIV04 referentnim sekvencama (100 % identično u odnosu na Wuhan-Hu-1/NC\_045512.2, osim duljine poliadenilacijskog repa), a varijacije jednostrukih nukleotida (Single Nucleotide Variations, SNV) analizirane su u genomskoj regiji ciljanoj početnicama i probama *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Primers and Probes. Prevalencija identificiranih SNV-ova zadržala se ispod 1 %, kao i učestalost mutacija koje se istodobno javljaju. Nije lociran SNV na zadnja 1 do 3 nukleotida od 3' kraja u dotičnim oligonukleotidima, za što bi se očekivalo da će utjecati na radne značajke. Smatra se da komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit može detektirati 100 % objavljenih sekvenci.

## Isključivost / križna reaktivnost

### In silico analiza

Isključivost početnica i proba *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes procijenjena je *in silico* analizom na sekvencama pohranjenima u banci podataka NCBI. *In silico* analiza pokazala je da neki od testiranih patogena imaju homologiju veću od 80 % s jednom od početnica ili proba *artus* SARS-CoV-2. Među njima su i *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* te *Streptococcus salivarius*. Organizam *Pseudomonas aeruginosa* imao je manje od 80 % homologije s jednom od početnica/proba ispitivanja SARS-CoV-2. Međutim, početnice i probe *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes pokazale su da nije moguća amplifikacija s različitim sekvencama pohranjenima u nr/nt bazi podataka NCBI.

Ukupno 36 bakterijskih, virusnih i gljivičnih sojeva (tablica 27.) analizirano je postupkom *in silico* PCR-a s ograničenom potencijalnom veličinom amplikona od 500 bp. Sekvence patogena prikupljene su iz baze podataka NCBI, međutim, nijedan od tih patogena nije pokazao amplifikaciju *in silico*. U tablici 27. prikazan je popis patogena testiranih *in silico*.

**Tablica 27. Popis patogena testiranih *in silico*.**

Patogeni	Soj/tip	ID taksonomije	Rezultati <i>in silico</i> PCR-a
Adenovirus tipa 3	Tip 3	45659	Nema podudaranja
Adenovirus tipa 4	Tip 4	28280	Nema podudaranja
Adenovirus tipa 5	Tip 5	28285	Nema podudaranja
Adenovirus tipa 7A	Tip 7A	85755	Nema podudaranja
Adenovirus tipa 14	Tip 14	10521	Nema podudaranja
Adenovirus tipa 31	Tip 31	10529	Nema podudaranja
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Nema podudaranja
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Nije moguća amplifikacija*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Nema podudaranja
Enterovirus	Tip 68	42789	Nema podudaranja

\* Podudaranje sekvenci s jednom od početnica/proba pokazalo je homologiju od < 80 %.

† Podudaranje sekvenci s jednom od početnica/proba pokazalo je homologiju od ≥ 80 %.

**(nastavak na sljedećoj stranici)**

Tablica 27. (nastavak s prethodne stranice)

Patogeni	Soj/tip	ID taksonomije	Rezultati <i>in silico</i> PCR-a
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Nema podudaranja
Humani koronavirus	229E	11137	Nema podudaranja
Humani koronavirus	NL63	277944	Nema podudaranja
Humani koronavirus	HKU-1	290028	Nema podudaranja
Humani koronavirus OC43	OC43	31631	Nema podudaranja
Humani koronavirus	MERS-CoV	1335626	Nema podudaranja
Humani metapneumovirus	N/P	162145	Nema podudaranja
Influenza A	H1N1	114727	Nema podudaranja
Influenza A	H3N2	119210	Nema podudaranja
Influenza B	N/P	11520	Nema podudaranja
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Nema podudaranja
Virus parainfluence	Tip 1	12730	Nema podudaranja
Virus parainfluence	Tip 2	2560525	Nema podudaranja
Virus parainfluence	Tip 3	11216	Nema podudaranja
Virus parainfluence	Tip 4	2560526	Nema podudaranja
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Nema podudaranja
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Nije moguća amplifikacija*
Respiratorni sincicijski virus	Tip A (RSV-A)	208893	Nema podudaranja
Respiratorni sincicijski virus	Tip B (RSV-B)	208895	Nema podudaranja
Rinovirus	Tip A	147711	Nema podudaranja
Rinovirus	Tip B	147712	Nema podudaranja
SARS koronavirus	Tor2	694009	Nije moguća amplifikacija†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	N/P	1282	Nema podudaranja
<i>Streptococcus pyogenes</i>	N/P	1314	Nije moguća amplifikacija†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Nije moguća amplifikacija†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Nema podudaranja

\* Podudaranje sekvenci s jednom od početnica/proba pokazalo je homologiju od < 80 %.

† Podudaranje sekvenci s jednom od početnica/proba pokazalo je homologiju od ≥ 80 %.

### In vitro analiza

Križna je reaktivnost provjerena *in vitro* s patogenima koji su pokazali homologiju od  $\geq 80\%$  s početnicama SARS-CoV-2 Amp Primers u *in silico* analizi. Uzorci su pripremljeni dodavanjem potencijalnih križno reaktivnih organizama u matricu uzoraka nazofaringealnog brisa pri  $10^6$  cp/ml, osim za SARS-CoV-1 koji je testiran nerazrijeđen u skladu s preporukom njegova proizvođača. Nijedan od tih patogena nije pokazao *in vitro* križnu reaktivnost.

Mikrobna interferencija ispitivanja iz kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit procijenjena je *in vitro* na panelu preporučenih patogena (tablica 28.). Uzorci su pripremljeni dodavanjem maksimalno 5 patogena – u koncentraciji od 105 TCID<sub>50</sub>/ml za viruse,  $10^6$  cp/ml za bakterije i gljivice, ili u najvećoj mogućoj koncentraciji ovisno o koncentraciji osnovne otopine – u negativne uzorke nazofaringealnog brisa u koje su dodane čestice inaktiviranog virusa SARS-CoV-2 (Zeptomatrix) pri 2,87 x LoD. Paneli NATrol™ Panels i SARS-CoV-1 dodani su izravno s inaktiviranim česticama virusa SARS-CoV-2 (Zeptomatrix) pri 2,87 x LoD. Rezultati za poolove svakog testiranog mikroorganizma i odgovarajuće koncentracije sažeti su u nastavku.

U tablici 28. prikazan je popis testiranih patogena u mikrobnoj interferenciji.

**Tablica 28. Popis patogena testiranih *in vitro* u mikrobnoj interferenciji.**

ID poola/ ID uzorka	Mikroorganizam	Izvor	Konačna koncentracija	Jedinica	Rezultat
Pool 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Nema interferencije
	Humani koronavirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID <sub>50</sub> /ml	
	Humani koronavirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID <sub>50</sub> /ml	
	Humani koronavirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID <sub>50</sub> /ml	
	Adenovirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID <sub>50</sub> /ml	
	Virus parainfluenza 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID <sub>50</sub> /ml	
Pool 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Nema interferencije
	Adenovirus T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID <sub>50</sub> /ml	
	Virus parainfluenza 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID <sub>50</sub> /ml	
	Influenza B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID <sub>50</sub> /ml	
	Rinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID <sub>50</sub> /ml	

(nastavak na sljedećoj stranici)

Tablica 28 (nastavak s prethodne stranice)

ID poola/ ID uzorka	Mikroorganizam	Izvor	Konačna koncentracija	Jedinica	Rezultat
Pool 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Nema interferencije
	Virus parainfluenze T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3,30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4,60E+06	CFU/ml	
Pool 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nema interferencije
	Adenovirus T7A	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1,02E+06	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1,00E+08	CFU/ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
Pool 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Nema interferencije
	Respiratorni sincicijski virus RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenca A H1N1, Kalifornija	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterovirus tipa 68 (glavna skupina)	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Adenovirus T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Pool 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nema interferencije
	MERS koronavirus	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Adenovirus T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Humani metapneumovirus (hMPV) tipa B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Respiratorni sincicijski virus tipa B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(nastavak na sljedećoj stranici)

Tablica 28 (nastavak s prethodne stranice)

ID poola/ ID uzorka	Mikroorganizam	Izvor	Konačna koncentracija	Jedinica	Rezultat
Pool 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nema interferencije
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Virus parainfluenze 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H3N2 Switzerland/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Pool 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nema interferencije
	NATrol Panel RP1 (influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), influenza A H1N1 (NY/02/2009), rinovirus (tip 1A), adenovirus T3, parainfluenza T1, virus parainfluenze T4, metapneumovirus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Coxsackievirus (tip A1)	Zeptomatrix (MDZ001)	Nepoznato*	N/P	
Pool 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nema interferencije
	NATrol Panel RP2 (influenza A H1 (Nova Kaledonija/20/99), influenza B (Florida/02/06), RSV- A, parainfluenza T2, parainfluenza T3, koronavirus HKU – rekombinantno, koronavirusi (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639)	Zeptomatrix (MDZ001)	Nepoznato*	N/P	
Pool 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nema interferencije
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Nepoznato*	N/P	

\* Dobavljač nije pružio informacije o koncentraciji.



## Interferirajuće tvari

### Uzorci nazalnih, orofaringealnih i nazofaringealnih brisova

Učinak pretpostavljenih interferirajućih tvari (za tvari navedene u tablici 29.) procijenjen je na radnim značajkama kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Testovi su provedeni u 3 poola negativnih nazofaringealnih brisova i u 3 poola pozitivnih nazofaringealnih brisova kojima su dodane inaktivirane čestice virusa SARS-CoV-2 (Zeptomatrix) pri 4 x LoD. Ispitivanja su provedena na platformi RGQ MDx 5plex HRM (na 4 instrumenta), a proveo ih je 1 rukovatelj s pomoću 1 pilot-kompleta.

Svaki je pool podijeljen na 2 kako bi se testirala interferirajuća tvar otopljena u otapalu (testni uzorak) ili samo otapalo (kontrolni uzorak). Stope pogodaka u kanalima fluorescencije Green i Red uspoređene su između testa i njegovih odgovarajućih kontrolnih uzoraka. U slučaju izostanka interferencije, test i njegovi odgovarajući kontrolni uzorci imaju jednaku stopu pogodaka.

Tablica 29. pokazuje da nijedna od testiranih tvari nije interferirala s radom kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit u kanalu fluorescencije Green.

**Tablica 29. Popis interferirajućih tvari i stope pogodaka dobivene u kanalu Green.**

Interferirajuće tvari	Funkcija	Testirana koncentracija	Rezultati stope pogodaka na negativnom nazofaringealnom brisu	Rezultati stope pogodaka na pozitivnom (4x LoD) nazofaringealnom brisu
Tobramicin	Sistemski antibiotik	1 mg/ml	Nema interferencije 0/15	Nema interferencije 15/15
Mupirocin	Nazalna antibiotska mast	6,6 mg/ml	Nema interferencije 0/15	Nema interferencije 15/15
Flutikazon	Nazalni kortikosteroid	5 % (v/v)	Nema interferencije 0/15	Nema interferencije 15/15
Mentol (pastile za grlo)	Oralni anestetik i analgetik	0,5 mg/ml	Nema interferencije 0/15	Nema interferencije 15/15
Oksimetazolin	Nazalni sprej	10 % (v/v)	Nema interferencije 0/15	Nema interferencije 15/15

Nastavak na sljedećoj stranici

Tablica 29 (nastavak s prethodne stranice)

Interferirajuće tvari	Funkcija	Testirana koncentracija	Rezultati stope pogodaka na negativnom nazofaringealnom brisu	Rezultati stope pogodaka na pozitivnom (4x LoD) nazofaringealnom brisu
Oseltamivir	Antivirusni lijek	3,3 mg/ml	Nema interferencije 0/15	Nema interferencije 15/15
Mucin (goveđa submaksilarna žlijezda tipa I-S)		2,5 mg/ml	Nema interferencije 0/15	Nema interferencije 15/15
Puna krv		4 % (v/v)	Nema interferencije 1/15*	Nema interferencije 15/15

\* Otkrivena je amplifikacija koja odgovara artefaktu.

## Uzorci čiste sline

Učinak osam pretpostavljenih interferirajućih tvari (za tvari navedene u tablici 30.) procijenjen je na radnim značajkama kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Testovi su provedeni na 1 poolu negativnih uzoraka čiste sline, koji je podijeljen na pola kako bi se izvele dvije razine razrjeđivanja: (1) negativni uzorci čiste sline i (2) umjetno dobiveni pozitivni uzorci čiste sline (dobiveni dodavanjem inaktiviranih čestica virusa SARS-CoV-2 pri 3x LoD (3600 cp/ml) (Zeptometrix) u negativan pool). Uzorke čiste sline testirala su na platformi cobas z 480 3 rukovatelja s pomoću jednog komercijalnog kompleta.

Za svaku interferirajuću tvar replikati uzoraka podijeljeni na 2 kako bi se testirala interferirajuća tvar otopljena u otapalu (testni uzorak) ili samo otapalo (kontrolni uzorak). Stope pogodaka u kanalima fluorescencije Green, Red i Yellow uspoređene su između testa i njegovih odgovarajućih kontrolnih uzoraka. U slučaju izostanka interferencije, test i njegovi odgovarajući kontrolni uzorci imaju jednaku stopu pogodaka.

U pogledu kvalitativne analize (statusa uzoraka), osam testiranih interferirajućih tvari (pogledajte tablicu 30.) ne utječe na rezultate kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit na pozitivnim i negativnim uzorcima sline.

Tablica 30. pokazuje da nijedna od testiranih tvari nije interferirala s radom kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit u kanalu fluorescencije Green.

**Tablica 30. Popis interferirajućih tvari i stope pogodaka dobivene u kanalu Green.**

Interferirajuća tvar*	Funkcija	Testirana koncentracija	Rezultati stope pogodaka na negativnim uzorcima čiste sline	Rezultati stope pogodaka na pozitivnim (3 do 5x LoD) uzorcima čiste sline
<b>Puna krv</b>	Endogene tvari: humani gDNK, leukociti, eritrociti	1 % v/v	Nema interferencije* 0/8	Nema interferencije* 8/8
<b>Altoids®</b>	Bombon	2 % w/v	Nema interferencije 0/8	Nema interferencije 8/8
<b>Aspirin</b>	Protuupalni lijek	1 % w/v	Nema interferencije 0/8	Nema interferencije 8/8
<b>Listerine®</b>	Antiseptička tekućina za ispiranje usta	1 % v/v	Nema interferencije 0/8	Nema interferencije 8/8
<b>Ricola®</b>	Bombon	1 % w/v	Nema interferencije 0/8	Nema interferencije 8/8
<b>Zubna pasta Colgate® Total SF Whitening™</b>	Zubna pasta za izbjeljivanje zubi	0,1 % w/v	Nema interferencije 0/8	Nema interferencije 8/8
<b>Tussidane® Sirop</b>	Lijek za suhi kašalj	1 % v/v	Nema interferencije 0/8	Nema interferencije 8/8
<b>Pulmofluide®</b>	Lijek za produktivni kašalj	1 % v/v	Nema interferencije 0/8	Nema interferencije 8/8

\* Kod pune krvi učinak interferiranja zabilježen je za detekciju IC-a u kanalu Red (10 – 40 % inhibicije) bez utjecaja na valjanost uzorka. Na kanalu Green puna krv nije utjecala na status uzorka, ali je zabilježeno neznatno odstupanje vrijednosti Ct (prosječni Ct od 1,35 kasnije s punom krvi uspoređen s kontrolnim uzorkom).

Da bi se izbjegao rizik od dobivanja lažno negativnog rezultata u slučaju da se nisko pozitivan klinički uzorak testira kada se tragovi krvi primijete u epruveti, to bi trebalo zabilježiti, a ako uzorak da negativan rezultat prilikom uporabe kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, čistu bi slinu trebalo ponovno prikupiti od pacijenta te bi uzorak trebalo ponovno testirati kompletom *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.

## Ispitivanje stabilnosti uzorka

Studija stabilnosti uzoraka provedena je kako bi se procijenio utjecaj različitih uvjeta pohrane uzoraka na kvalitativne (analiza stope pogodaka) i kvantitativne (analiza odstupanja vrijednosti Ct) rezultate kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Eksperimenti su provedeni analiziranjem dviju razina razrjeđivanja: (1) negativnih uzoraka i (2) umjetno dobivenih pozitivnih uzoraka dobivenih dodavanjem inaktiviranih čestica virusa SARS-CoV-2 (Zeptomatrix). Da bi se potvrdila stabilnost uzoraka (slina i NPS),  $\geq 95\%$  replikata trebalo je dati jednaku stopu pogodaka te se trebalo dogoditi odstupanje vrijednosti Ct  $\leq 10\%$  vremenske točke 0 za svaki uvjet stabilnosti.

### Nazalni, orofaringealni i nazofaringealni uzorci:

Različiti testirani uvjeti stabilnosti navedeni su u tablici 31. Testovi su provedeni primjenom 3 poola uzoraka. Negativni NPS uzorci, umjetno dobiveni pozitivni NPS uzorci pri 5x LoD (4750 cp/ml) i tri serije uzoraka s odobrenjem serije (batch release sample) BRS1 (N2 niz, 1000 cp/10  $\mu$ l), BRS2 (RNaza P gblock, 1000 cp/10  $\mu$ l) i BRS3 (N1 niz, 1000 cp/10  $\mu$ l) testirani su na platformi ABI 7500 Fast Dx.

Prema rezultatima kvalitativne i kvantitativne analize testirani uvjeti pohrane NPS uzoraka nisu utjecali na stopu pogodaka (detektiran je jednak status kao što je očekivano) i nisu doveli do znatnih odstupanja vrijednosti Ct za rezultate kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Stoga su radne značajke kompleta bile stabilne bez obzira na sve različite uvjete pohrane testiranih uzoraka nazofaringealnog brisa (pogledajte tablicu 31.).

Tablica 31. prikazuje uvjete stabilnosti nazofaringealnih uzoraka

**Tablica 31. Uvjeti stabilnosti nazofaringealnog uzorka.**

Uvjeti	Utvrđena stabilnost uzorka
Zamrzavanje/odmrzavanje	3 zamrzavanja/odmrzavanja
4 °C (od 2 °C do 8 °C)	72 h
-70 °C	2 tjedna

## Uzorci čiste sline

Različiti testirani uvjeti stabilnosti navedeni su u tablici 32. Testovi su provedeni primjenom 2 poola uzoraka. Negativni uzorci čiste sline i umjetno dobiveni pozitivni uzorci čiste sline pri 3xLoD (3600 cp/ml) testirani su na platformi ABI 7500 Fast Dx.

Prema rezultatima kvalitativne i kvantitativne analize testirani uvjeti pohrane nisu utjecali na stopu pogodaka (detektiran je jednak status kao što je očekivano) i nisu doveli do znatnih odstupanja vrijednosti Ct za rezultate kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. Stoga su radne značajke kompleta bile stabilne bez obzira na različite uvjete pohrane testiranih uzoraka čiste sline.

Tablica 32. prikazuje uvjete stabilnosti čiste sline.

**Tablica 32. Uvjet stabilnosti uzorka čiste sline**

Uvjeti	Utvrđena stabilnost uzorka
Zamrzavanje/odmrzavanje	3 zamrzavanja/odmrzavanja
Sobna temperatura (od 18 °C do 26 °C)	72 h
4 °C (od 2 °C do 8 °C)	72 h
Kombinirani uvjeti: (6 h na sobnoj temperaturi u kombinaciji sa 72 h na 4 °C (od 2 do 8 °C) u kombinaciji s 8 dana na –20 °C (od –30 °C do –15 °C)	6 h na sobnoj temperaturi, a zatim 72 h na 4 °C (od 2 do 8 °C) te potom 7 dana na –20 °C (od –30 °C do –15 °C)
–20 °C (od –30 °C do –15 °C)	1 mjesec (30,5 dana)

## Preciznost

Ispitivanjem preciznosti procjenjivale su se obnovljivost (isti je uzorak ponovno obrađen u različitim ciklusima i uvjetima: 5 dana, 3 serije kompleta, 3 rukovatelja i 2 instrumenta) i ponovljivost (uzorak je ponovno obrađen u jednakom ciklusu i jednakim uvjetima). Testovi su provedeni na negativnim uzorcima nazofaringealnog brisa i negativnim uzorcima nazofaringealnog brisa kojima su dodane tvari pri 5 x LoD na instrumentu RGQ MDx.

Za svaku razinu razrjeđivanja prikupljene su 204 podatkovne točke. Podaci o ponovljivosti i obnovljivosti upotrijebljeni su kako bi se utvrdila standardna devijacija (Standard Deviation, SD) i koeficijent varijacije (Coefficient of Variation, % CV) za ciljne sekvence virusa SARS-CoV-2 u kanalima Green, Yellow i Red. Tablica 33. pokazuje da komplet *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ima ukupnu preciznost od 0,63 SD (2,03 % CV) u kanalu Green, 0,54 SD (2,22 % CV) u kanalu Yellow i 1,28 SD (4,10 % CV) u kanalu Red.

**Tablica 33. Standardna devijacija i koeficijent varijacije kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit.**

	Ukupno	Iz dana u dan	Između različitih serija	Između različitih rukovatelja	Između različitih instrumenata	Između različitih ciklusa	Unutar postupka
<b>Uzorci i kanal za detekciju</b>	<b>Standardna devijacija (SD) (koeficijent varijacije (% CV))</b>						
Negativni NPS Kanal Yellow	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
Negativni NPS Kanal Red	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
NPS s dodanim organizmima Kanal Green	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
NPS s dodanim organizmima Kanal Yellow	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
NPS s dodanim organizmima Kanal Red	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

## Kliničke radne značajke

### Nazofaringealni brisovi

Kliničke radne značajke ispitivanja *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp procijenjene su primjenom retrospektivnih ispitaka nazofaringealnog brisa u transportnom mediju koji su se sastojali od 150 kliničkih ispitaka.

Svi su uzorci prikupljeni od pacijenata sa znakovima i simptomima infekcije bolešću COVID-19 te su bili pohranjeni zamrznuti do uporabe.

Klinička provjera provedena je na instrumentu ABI 7500 Fast Dx. Tablica 34. prikazuje radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit u odnosu na referentnu metodu.

**Tablica 34. Kliničke radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit u odnosu na referentnu metodu.**

Status uzorka	N	% pozitivno	95-postotni CI	% negativno	95-postotni CI
Pozitivan	52	98,1 (51/52)	89,9 – 99,7	1,9 (1/52)	-
Negativan	98	5,1 (5/98)	-	94,9 (93/98)	88,7 – 97,8

Nepodudarni rezultati procijenjeni su trećom metodom te su ponovno analizirani s tablicom kontingencije. Ukupni rezultati kliničkih radnih značajki izraženi su kako pozitivno postotno slaganje (Positive Percent Agreement, PPA) i negativno postotno slaganje (Negative Percent Agreement, NPA) te su prikazani u tablici 35.

**Tablica 35. Kliničke radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nakon analize nepodudarnih rezultata.**

Status uzorka	N	% pozitivno	95-postotni CI	% negativno	95-postotni CI
Pozitivan	52	98,1 (51/52)	89,9 – 99,7	1,9 (1/52)	–
Negativan	98	5,1 (5/98)	–	94,9 (93/98)	88,7 – 97,8

U nastavku su navedene frakcije uzoraka koji se slažu, odnosno imaju pozitivno i negativno postotno slaganje (PPA odnosno NPA) s očekivanim statusima uzoraka:

Pozitivno postotno slaganje

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

Negativno postotno slaganje

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

### Nazofaringealni bris uključujući asimptomatske osobe

Kliničke radne značajke ispitivanja *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp procijenjene su primjenom retrospektivnih ispitaka nazofaringealnog brisa u transportnom mediju koji su se sastojali od 153 klinička ispitka. Svi su uzorci prikupljeni od pacijenata bez simptoma ili drugih razloga za sumnju na infekciju bolešću COVID-19.

Klinička provjera provedena je na instrumentu ABI 7500 Fast Dx. Šesnaest uzoraka isključeno je iz analize nakon testiranja kompletom *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit zbog nevaljanog statusa prema kriterijima valjanosti uzoraka (tablica 23.).

Tablica 36. prikazuje radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit u odnosu na referentnu metodu, koje su izražene kao pozitivno postotno slaganje (Positive Percent Agreement, PPA) i negativno postotno slaganje (Negative Percent Agreement, NPA).



**Tablica 36. Kliničke radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit u odnosu na referentnu metodu**

Status uzorka	N	% pozitivno	95-postotni CI	% negativno	95-postotni CI
Pozitivan	50	64,0 (32/50)	50,1 – 75,9	36,0 (18/50)	–
Negativan	87	1,15 (1/87)	–	98,85 (86/87)	93,8 – 99,8

Devetnaest nepodudarnih rezultata procijenjeno je trećom metodom te je ponovno analizirano s tablicom kontingencije. Ukupni rezultati kliničkih radnih značajki izraženi su kako pozitivno postotno slaganje (Positive Percent Agreement, PPA) i negativno postotno slaganje (Negative Percent Agreement, NPA) te su prikazani u tablici 37.

**Tablica 37. Kliničke radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nakon analize nepodudarnih rezultata**

Status uzorka	N	% pozitivno	95-postotni CI	% negativno	95-postotni CI
Pozitivan	32	100,0 (32/32)	89,3 – 100,0	0 (0/32)	-
Negativan	105	0,95 (1/105)	-	99,05 (104/105)	94,8 – 99,8

Osamnaest lažno negativnih uzoraka ponovno je klasificirano kao stvarno negativni, dok je jedan lažno pozitivan ostao lažno pozitivan.

U nastavku su navedene frakcije uzoraka koji se slažu, odnosno imaju pozitivno i negativno postotno slaganje (PPA odnosno NPA) s očekivanim statusima uzoraka:

Pozitivno postotno slaganje

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

Negativno postotno slaganje

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

## Uzorci čiste sline

Kliničke radne značajke ispitivanja *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp procijenjene su primjenom čistih ispitaka sline koji su se sastojali od 142 ispitka sline.

Svi su uzorci prikupljeni od pacijenata sa znakovima i simptomima infekcije bolešću COVID-19. Klinička provjera provedena je na instrumentu ABI 7500 Fast Dx. Dvanaest uzoraka isključeno je iz analize nakon testiranja kompletom *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit te referentnom metodom zbog nevaljanog statusa obaju testova prema kriterijima valjanosti uzoraka.

Tablica 38. prikazuje radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit u odnosu na referentnu metodu.

**Tablica 38. Kliničke radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit u odnosu na referentnu metodu.**

Status uzorka	N	% pozitivno	95-postotni CI	% negativno	95-postotni CI
Pozitivan	45	93,33 (42/45)	82,14 – 97,71	6,67 (3/45)	--
Negativan	85	0 (0/85)	-	100 (85/85)	95,68 – 100,00

Tri nepodudarna rezultata procijenjena su trećom metodom te su ponovno analizirana s tablicom kontingencije. Ukupni rezultati kliničkih radnih značajki izraženi su kako pozitivno postotno slaganje (Positive Percent Agreement, PPA) i negativno postotno slaganje (Negative Percent Agreement, NPA) te su prikazani u tablici 39.

**Tablica 39. Kliničke radne značajke kompleta *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nakon analize nepodudarnih rezultata.**

Status uzorka	N	% pozitivno	95-postotni CI	% negativno	95-postotni CI
Pozitivan	43	97,67 (42/43)	87,94 – 99,59	2,32 (1/43)	--
Negativan	87	0 (0/87)	-	100 (87/87)	95,77 – 100,00

Dva lažno negativna rezultata ponovno su klasificirana kao stvarno negativna, dok je jedan lažno negativan rezultat ostao lažno negativan.

U nastavku su navedene frakcije uzoraka koji se slažu, odnosno imaju pozitivno i negativno postotno slaganje (PPA odnosno NPA) s očekivanim statusima uzoraka:

Pozitivno postotno slaganje

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

Negativno postotno slaganje

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

# Reference

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

# Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može pomoći pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i stranicu s najčešćim pitanjima u našem centru za tehničku podršku: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx).

## Komentari i prijedlozi

### Slabi ili nepostojeći zeleni signal (FAM) u pozitivnoj kontroli (Positive Control, PC)

- |   |  |
|---|--|
| a) Odabrani kanal fluorescencije za analizu RT-PCR podataka nije u skladu s protokolom.   | Za analizu podataka odaberite kanal fluorescencije FAM (Green) za analitičke RT-PCR ciljne sekvence virusa SARS-CoV-2, kanal fluorescencije HEX/VIC/JOE (Yellow) za kontrolu uzorkovanja i kanal Cy5/Atto (Red) za internu kontrolu.   |
| b) Neispravno programiranje temperaturnog profila.  | Usporedite RT-PCR program s protokolom.  |
| c) Neispravna konfiguracija PCR reakcije  | Provjerite svoje radne korake prema shemi pipetiranja te po potrebi ponovite PCR.  |
| d) Uvjeti pohrane za jednu ili više komponenta kompleta nisu bili u skladu s uputama ili je kompletu <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR kit istekao rok trajanja. | Pridržavajte se uvjeta pohrane te provjerite rok trajanja reagensa i prema potrebi upotrijebite novi komplet.  |
| e) Neispravna konfiguracija real-time RT-PCR platforme tijekom konfiguracije podataka.  | Primjenjujte preporučene konfiguracije koje se odnose na vašu real-time RT-PCR platformu i opisane su u ovome priručniku.  |
| f) PCR reakcija bila je inhibirana.   | Pridržavajte se dobre prakse u laboratorijima molekularne biologije kako biste izbjegli uvođenje kontaminanata. Osigurajte da se radni prostor i instrumenti dekontaminiraju u redovitim intervalima. Pridržavajte se protokola navedenog u ovome priručniku. Provjerite rok trajanja reagensa i prema potrebi upotrijebite novi komplet. Ponovite ispitivanje na drugom uzorku. |

### Zeleni signal (FAM) u kontroli bez predloška ili u kontroli bez ekstrakcije

- |  |   |
|--|---|
| Došlo je do kontaminacije sekvencama virusa SARS-CoV-2 tijekom pripreme pločice za RT-PCR. | Ponovite RT-PCR s novim reagensima. Pridržavajte se dobre prakse u laboratorijima molekularne biologije kako biste izbjegli uvođenje kontaminanata. Pridržavajte se protokola navedenog u ovome priručniku. Osigurajte da se radni prostor i instrumenti dekontaminiraju u redovitim intervalima. |
|--|---|

## Komentari i prijedlozi

### Slabi ili nepostojeći crveni signal (Cy5/Atto) interne kontrole












- |    |   |  |
|----|---|--|
| a) | U RT-PCR reakciju uvedena je interferirajuća tvar. PCR reakcija je inhibirana.      | Pridržavajte se dobre prakse u laboratorijima molekularne biologije kako biste izbjegli uvođenje kontaminanata.<br>Osigurajte da se radni prostor i instrumenti dekontaminiraju u redovitim intervalima.<br>Pridržavajte se protokola navedenog u ovome priručniku.<br>Ponovite ispitivanje iznova prikupljenim uzorkom.   |
| b) | Interna kontrola je degradirana.  | Pridržavajte se dobre prakse u laboratorijima molekularne biologije kako biste izbjegli uvođenje RNaza. Slijedite preporuke navedene u ovome priručniku.<br>Osigurajte da se radni prostor i instrumenti dekontaminiraju u redovitim intervalima.<br>Pridržavajte se uvjeta pohrane te provjerite rok trajanja reagensa i prema potrebi upotrijebite novi komplet. |
| c) | Neispravna konfiguracija real-time RT-PCR platforme tijekom konfiguracije podataka. | Primjenjujte preporučene konfiguracije koje se odnose na vašu real-time RT-PCR platformu i opisane su u ovome priručniku.  |

### Slabi ili nepostojeći žuti signal (VIC/HEX) kontrole uzorkovanja

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Klinički je uzorak degradiran.   | Pridržavajte se preporuka dobavljača uređaja za prikupljanje za njihovu pohranu, rukovanje i transport.<br>Pridržavajte se protokola navedenog u ovome priručniku, uključujući korake pripreme uzoraka s puferom SARS-CoV-2 UM Prep Buffer.<br>Pridržavajte se uvjeta pohrane i provjerite rok trajanja reagensa, kao što je pufer SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, te prema potrebi upotrijebite novi komplet. |
| b) | Ispitak nije ispravno prikupljen. Na bris nije prikupljeno dovoljno humanih stanica ili ih nije dovoljno preneseno na transportni medij. | Pridržavajte se preporuka dobavljača uređaja za prikupljanje koje se odnose na prikupljanje ispitaka i rukovanje njima.   |
| c) | Neispravna konfiguracija real-time RT-PCR platforme tijekom konfiguracije podataka.  | Primjenjujte konfiguracije koje se odnose na vašu real-time RT-PCR platformu i opisane su u ovome priručniku.   |

# Simboli

U uputama za uporabu ili na ambalaži i naljepnicama mogu se pojaviti sljedeći simboli:

Simbol	Definicija simbola
	Sadržava reagensa dovoljno za 768 ili 3072 reakcije
	Upotrijebiti do
	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
	Kataloški broj
	Broj serije
	Komponente
	Sadržava
	Broj
	Globalni broj trgovačke jedinice
Rn	R se odnosi na reviziju uputa za uporabu, a n je broj revizije
	Ograničenje temperature
	Proizvođač

Simbol

Definicija simbola

---



Pročitajte upute za uporabu



Čuvajte podalje od sunčeve svjetlosti



Upozorenje/oprez



## Kontaktni podaci

Za tehničku podršku i više informacija obratite se tehničkoj službi društva QIAGEN na **[support.qiagen.com](https://support.qiagen.com)**.

## Informacije za narudžbu

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Za 768 reakcija: pufer za pripremu, boja ROX, glavna mješavina, početnice i probe, interna kontrola, voda (NTC) i pozitivna kontrola	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Za 3072 reakcija: pufer za pripremu, boja ROX, glavna mješavina, početnice i probe, interna kontrola, voda (NTC) i pozitivna kontrola	4511469
Instrument i dodatna oprema		
PCR tubes, 0.1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Za uporabu s rotorom od 72 jažice, Strip epruvete i čepovi	981103
Rotor-Gene Q software	Softver Rotor-Gene Q v2.3.1 (ili novija)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Cikler za real-time PCR s 5 kanala, analizator taljenja velike razlučivosti, softver, prijenosno računalo i dodatna oprema; 1-godišnje jamstvo na dijelove te rad, instalaciju	9002032
72-Well Rotor	Za držanje Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, s volumenima reakcije od 10 – 50 µl	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Za zaključavanje Strip Tubes and Caps, 0.1 ml u rotor 72-Well Rotor	9018904

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za QIAGEN komplet ili korisničkom priručniku. Priručnici za komplete tvrtke QIAGEN i korisnički priručnici dostupni su na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ili ih možete zatražiti od tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

# Povijest revizija dokumenta

Revizija	Opis
R3, rujan 2021.	Proširenje tvrdnje: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Dodavanje testiranja primjenom ispitaka sline.</li><li>2. Izmjena tijeka rada.</li><li>3. Za uporabu s 3 dodatne platforme i njihovim odgovarajućim softverima: CFX96 Dx sa softverom CFX Manager Dx Software inačice 3.1.3090.1022 (ili novije), cobas z 480 sa softverom LightCycler 480 SW UDF inačice 2.0.0 (ili novije) i QuantStudio 5 Dx sa softverom QuantStudio 5 Dx IVD inačice 1.0.1 (ili novije).</li><li>4. Granice detekcije 3 dodatnih platformi (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) dodane su u odjeljak s radnim značkama za uzorke nazofaringealnog, nazalnog i orofaringealnog brisa.</li><li>5. Ažuriran je odjeljak s radnim značkama.</li><li>6. Samo su kanali fluorescencije (Green, Red, Yellow) zadržani za instrument RGQ (nazivi boja u zagradama su izbrisani).</li><li>7. Samo su nazivi boja zadržani za instrumente CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 i QuantStudio 5 Dx.</li><li>8. Za ABI7500 Fast Dx izbrisani su fluorescentni filtri A/1, B/2 i E/5. Zadržani su samo nazivi boja (Fam, Vic i Cy5).</li><li>9. Izmijenjene su tablice 34. – 37. u odjeljku s kliničkim radnim značkama kako bi se pojasnio prikaz.</li></ol>
R4, siječanj 2022.	Ispravak slovne pogreške u tablici 39.
R5, rujan 2022.	Ažuriranje odjeljka Pohrana i rukovanje reagensima Ažuriranje tablice 17.

#### Ugovor o ograničenoj licenci za komplet *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane na ploči. QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenata ove ploče s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom ploči, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na stranici [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ova ploča i/ili njezina uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ova ploča i njezine komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, preradivati niti preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ove ploče potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenci na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske prava intelektualnog vlasništva povezanog s pločom i/ili njezinim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Zaštitni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Prep&Amp™, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™, Hard-Shell® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zepion® (Zeptomatrix®), NATrol™ (Cole-Parmer); Colgate®, Total SF Whitening™ (Colgate-Palmolive Company); Listerine® (Johnson & Johnson); Tussidane® (Laboratoires Des Realisations Therapeutiques Elerte); PulmoFluide® (Laboratoires Gerda); Excel® (Microsoft Corporation); Ricala® (Ricala Group); cobas® LightCycler® (Roche Group); ABI®, MicroAmp™, EnduraPlate™, QuantStudio®, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific ili njegova pridružena društva); Altoids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima.

09/2022 R5 HB-2850-005 © 2021 QIAGEN, sva prava pridržana.

Narudžbe [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Tehnička podrška [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Web-mjesto [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)