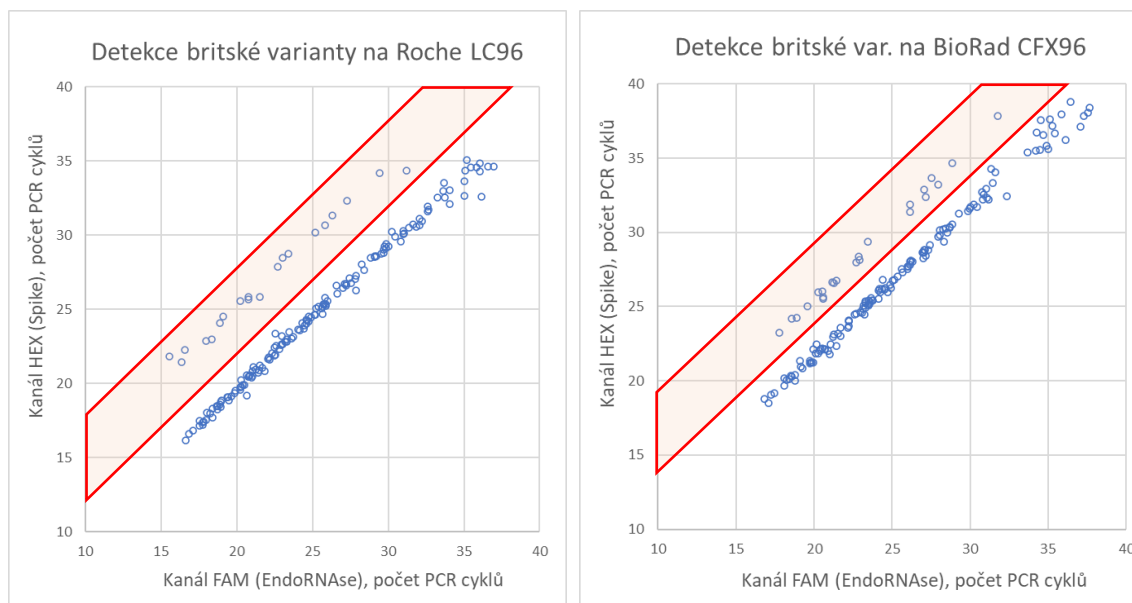


Identifikace tzv. britské varianty (20I/501Y.V1) pomocí *DB-1219 COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (aplikační poznámka, DIANA Biotechnologies s.r.o.)

DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit (Kat.č. DB-1219) slouží k jedнокrokové RT-PCR detekci viru SARS-CoV-2 (Wuhan coronavirus 2019, COVID-19) bez nutnosti předchozí izolace RNA, tedy přímo ze vzorku. Vhodné pro vzorky slin nebo nasopharyngeálních stěrů. Souprava v jedné multiplexní RT-PCR reakci specificky detekuje dva virové geny, **EndoRNase** (kanál FAM) a **Spike** (kanál HEX) a externí syntetickou **RNA kontrolu** (kanál Cy5). Tato kontrola slouží zejména pro ověření účinnosti RT-PCR reakce v přítomnosti vzorku.

Primery cílí sekvence viru COVID-19, ve kterých se ke konci roku 2020 nevyskytovaly žádné významné mutace s výjimkou mutace ve Spike A570D, která se vyskytuje téměř exkluzivně v Britské variantě (lineage B.1.1.7, GISAID 20I/501Y.V1, anotace VUI 202012/01) – Spike je i v této variantě detekován, avšak díky posunu v Ct v HEX kanálu je možné touto soupravou tuto variantu odlišit od ostatních variant. Detekce ve FAM kanálu je nezměněna a citlivost testu tak zůstává stejná. V případě posunu FAM a HEX splňující podmínky popsané níže se s největší pravděpodobností jedná o tuto britskou variantu: mutace A570D se k 15. lednu 2021 vyskytovala v databázi GISAID v 17 751 sekvencích (z 373 229 celkem) a z toho bylo 17 388 sekvencí anotováno jako varianta VUI 202012/01. Během ledna bylo takto v České republice nalezeno velké množství vzorků vykazující tuto mutaci a 36 z nich bylo na SZÚ pro ověření osekvenováno, a ve všech 36 případech se potvrdila zmiňovaná britská varianta a dle doporučení České národní referenční laboratoře pro chřipkovou a nechřipkovou virovou respirační onemocnění ze dne 26. ledna 2021 není nutné všechny takto identifikované vzorky ověřovat sekvenací.



Obrazek 1: Detekce britské varianty porovnáním Ct mezi kanály FAM a HEX

Na grafech je korelace Ct ve FAM a HEX kanálech pro klinické vzorky. Na levém grafu pro přístroj Roche LC96 a na pravém pro BioRad CFX96. Červeně ohraničené jsou vzorky obsahující britskou variantu.

Pro přístroje Roche LightCycler 480 II a Roche LightCycler 96 je typicky rozdíl mezi Ct pro FAM a HEX kanál méně než jeden cyklus, pro BioRad CFX96 okolo jednoho cyklu. U britské varianty jsou Ct v HEX o 3 až 4 cyklů vyšší oproti jiným variantám viru (tzn. dochází celkovému posunu o 4 až 5 cyklů v HEX oproti FAM). Pro identifikaci britské varianty nejprve určete rozdíl $Ct(\text{HEX}) - Ct(\text{FAM})$ pro pozitivní kontrolu přiloženou

v této soupravě: tento rozdíl je nazýván jako "**referenční posun**". Všechny vzorky, u nichž pozorujete rozdíl Ct(HEX) - Ct(FAM) o dva a více cyklů vyšší než referenční posun, jsou s největší pravděpodobností vzorky britské varianty (obsahují mutaci A570D). Typicky bude změna oproti referenčnímu posunu mezi 3 až 4 cykly na výše uvedených strojích, avšak u jiných, například na Agilent Aria MX může být rozdíl i vyšší. Na **obr. 1** jsou ukázána typická data pro detekci britské varianty na strojích Roche LC96 a BioRad CFX96. U vzorků s Ct ve FAM kanále vyšší než 35. cyklus může dojít k absenci signálu v HEX, tyto vzorky lze považovat za pozitivní bez opakované analýzy.

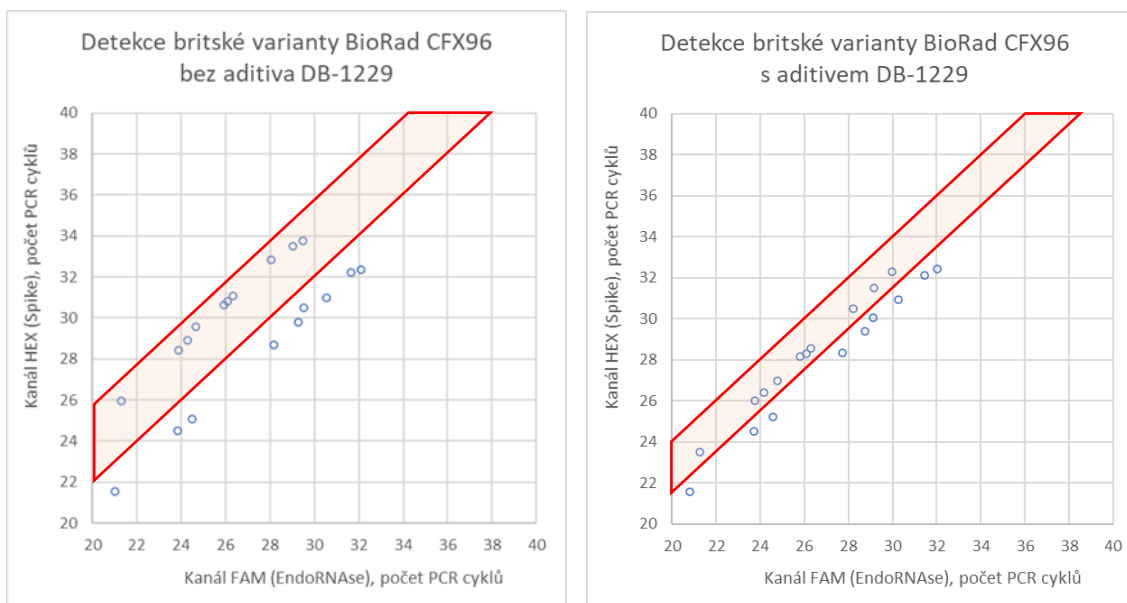
Použití DB-1229 COVID-19 Primer additive B.1.1.7

DIANA Biotechnologies dodává také aditivum, které výrazně zmenšuje posun v HEX u Britské varianty.

Obsahuje koncentrát primerů pro účinnější amplifikaci britské varianty B.1.1.7. Zatímco souprava bez přidání tohoto aditiva vykazuje hodnoty Ct v HEX pro britskou variantu o 3 až 4 cyklů vyšší oproti ostatním variantám viru (celkový posun 4 až 5 cyklů oproti FAM), tak po přidání tohoto aditiva je posun pouze okolo 1.5 cyklu: to stále stačí pro odlišení britské varianty, ale při minimální změně vlastností HEX eseje.

Využití tohoto aditiva doporučujeme, pokud na vašem stroji dochází u britské varianty k posunu Ct o více než 5 cyklů a/nebo snížení citlivosti v HEX kanálu (například Agilent Aria MX). Nicméně u BioRad CFX96 není nutné toto aditivum používat, protože citlivost detekce v HEX není zásadně ovlivněna a pro vzorky s Ct FAM do 35 až 36 cyklů je HEX typicky stále detekován.

V případě, že používáte **DB-1229 Primer additive (200x)** pro zvýšenou amplifikaci britské varianty, tak před prvním použitím soupravy DB-1211 přidejte Primer additive (11 µL v soupravě pro 100 reakcí, 110 µL v soupravě pro 1000 reakcí) do Primer mixu (vialky č. 2, modré ● nebo průhledné víčko) a promíchejte. Takto vzniklý mix použijte namísto původního primer mixu.



Obrázek 2: Detekce britské varianty porovnáním Ct mezi kanály FAM a HEX s aditivem DB-1229

Na grafech je korelace Ct ve FAM a HEX kanálech pro klinické vzorky, vždy na přístroji BioRad CFX96. Na levém grafu bez aditiva DB-1229, zatímco na pravém grafu s aditivem DB-1229. Červeně ohraničené jsou vzorky obsahující britskou variantu.