



DB-1219

DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit

Dodatek k uživatelské příručce:

Vyhodnocení dat

Verze příručky: DB-1219-001-201124

Revize: 2.2 CZ

Poslední aktualizace: 30.4.2021



REF DB-1219-100rxns obsahuje reagentie pro 100 reakcí

REF DB-1219-1000rxns obsahuje reagentie pro 1000 reakcí

Obsah

1 Úvod	3
2 Identifikace pozitivních vzorků	3
3 Identifikace neprůkazných vzorků	4
4 Vyhodnocení mutantních variant viru	5
5 Doporučení pro vyhodnocování dat v softwaru CFX Maestro	5
6 Právní upozornění	5

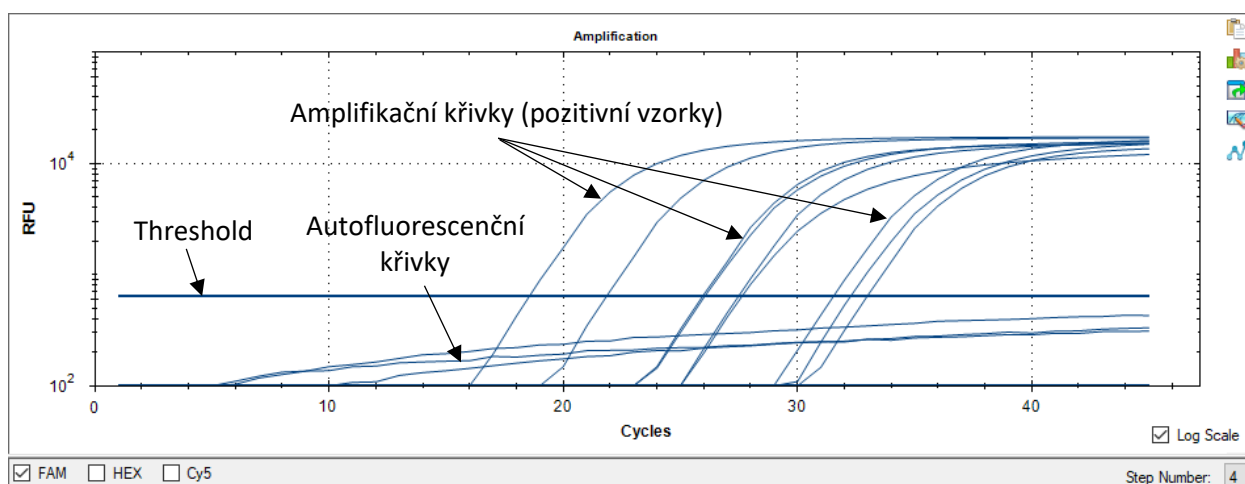


1 Úvod

Cílem tohoto návodu je pomoci s vyhodnocením dat při analýze vzorků stěrů a slin soupravou DB-1219 DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit. Návod je primárně určen pro vyhodnocení dat získaných z RT-PCR cyklieru Bio-Rad CFX96 používající software Bio-Rad CFX Maestro (verze 1.1). Pro ostatní RT-PCR cyklier se princip vyhodnocení nemění, ale nelze použít detailní popsání jednotlivých kroků vyhodnocení ve vyhodnocovacím programu, který je pro jiné cyklier odlišný.

2 Identifikace pozitivních vzorků

1. V pravém dolním rohu grafu zaklikněte políčko „Log Scale“.
2. V levém spodním rohu grafu zaklikněte nejdříve pouze kanál FAM a poté pouze kanál HEX a proveďte následující kontrolu:
 - a. Threshold protíná všechny amplifikační křivky (zvláště se zaměřte na křivky s vysokými Ct hodnotami, které nemusí dosahovat maximální fluorescence)
 - b. Threshold neprotíná autofluorescenční křivky (křivky s pozvolným nárůstem fluorescence)



3. Pokud automaticky nastavený Threshold nesplňuje výše zmíněná kritéria, tak ho manuálně upravte (**minimální povolená hodnota pro Threshold kanálů FAM a HEX je 200**).

*Pozn. Pokud není možné nastavit Threshold na úroveň, aby protínal všechny amplifikační křivky a zároveň neprotínal všechny autofluorescenční křivky, tak ho nastavte tak, aby protínal všechny amplifikační křivky. **Po exportu dat je však nutné manuálně odstranit hodnotu Ct v exportovaných datech u autofluorescenční křivky, i když vzorky před exportem odznačíte, stále budou exportovány s přiřazenou hodnotou Ct.***

4. Vyhodnoťte pozitivní vzorky v daném fluorescenčním kanále.

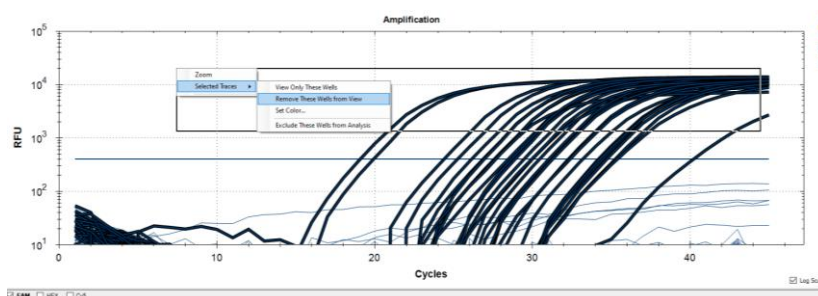


Důležité: U každého pozitivního vzorku musíte vždy vizuálně potvrdit, že se jedná o specifickou amplifikační křivku, a ne o nespecifickou autofluorescenci.

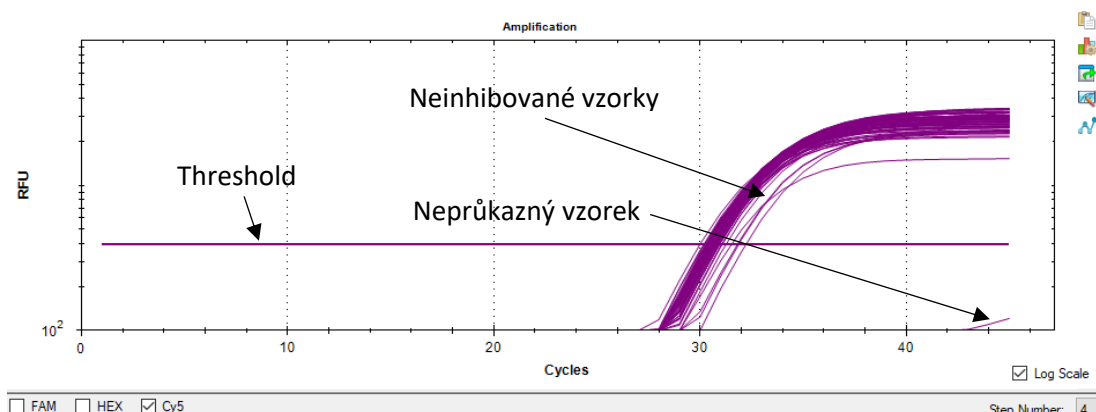


3 Identifikace neprůkazných vzorků

1. Zobrazte si všechny vzorky v kanále FAM.
2. Odznačte si ze vzorků všechny pozitivní vzorky (označte si všechny amplifikační křivky a poté klikněte na „selected wells“ a poté na „remove these wells from view“ – viz. obrázek).



3. Vypněte kanál FAM a zapněte kanál Cy5 (v kanálu Cy5 dále pracujte pouze s tímto výběrem negativních vzorků; pro pozitivní vzorky, které jsme odfiltrovali v předchozím kroku, není analýza amplifikace externí kontroly v Cy5 kanále nutná).
4. Zkontrolujte nastavení Threshold hodnoty pro kanál Cy5 identicky jako u kanálů FAM a HEX při identifikaci pozitivních vzorků a případně ji také upravte (**minimální povolená hodnota pro Threshold kanálu Cy5 je 50**; pro nastavení Threshold hodnoty pod 100 je nutné změnit minimální hodnoty v grafu na ose Y – viz. Tipy pro vyhodnocování dat). Threshold je nutné nastavit tak, aby protínal všechny křivky fluorescence v místě lineárního nárůstu, při nastavení blízko maximální fluorescence by hodnoty Ct pro vzorky s nižší fluorescencí mohly být výrazně nesprávně přiřazeny.
5. U označených negativních vzorků nesmí být Ct hodnota pro Cy5 kanál vyšší o více než 4 cykly, než je průměr Ct hodnot pozitivní a negativní kontroly. Pokud je Ct hodnota pro daný vzorek vyšší, tak je analýza tohoto vzorku neprůkazná a musíte postupovat jedním z následujících postupů:
 - a. Zopakovat analýzu vzorku pomocí soupravy DB-1219 stejným způsobem (tepelnou inaktivaci vzorku lze provést znovu, ale souhrnný čas inaktivace nesmí přesáhnout 1 hod),
 - b. Manuálně zopakovat analýzu vzorku pomocí soupravy DB-1219 za použití 1 μ L vzorku (v tomto případě připravte PCR reakci následovně: 15 μ L RT-PCR Master Mix + 1 μ L vzorku slin + 4 μ L externí kontroly),
 - c. Provést ze vzorku slin izolaci virové RNA podle návodu výrobce RNA izolační soupravy (např. pomocí soupravy DB-1206 – vzorek slin lze analyzovat společně se vzorky stěrů, je nutné pouze přidat 20 μ L slin a 40 μ L PCR vody) a poté provést RT-PCR analýzu.

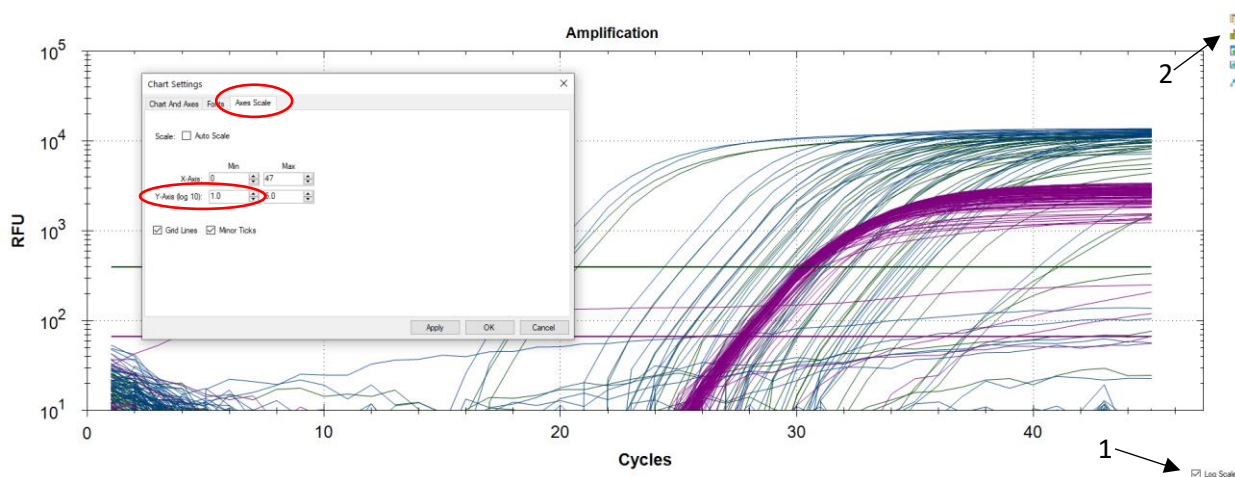


4 Vyhodnocení mutantních variant viru

Souprava DB-1219 je schopná identifikovat různé mutantní varianty viru SARS-CoV-2. Přesný popis detekovaných mutací stejně tak jako podrobný návod na jejich identifikaci naleznete v uživatelské příručce k soupravě DB-1219.

5 Doporučení pro vyhodnocování dat v softwaru CFX Maestro

1. Hodnoty v ose Y (RFU) lze zobrazit v lineární nebo logaritmicke (log10) škále. Mezi těmito zobrazeními se dá přepínat pomocí políčka „Log Scale“ v pravé spodní části grafu.
2. Minimum osy Y je defaultně nastaveno na 100 RFU. Toto nastavení je pro naprostou většinu analýz dostačující. V ojedinělých případech, kdy je nutné snížit Threshold pod 100 je dobré toto minimum snížit. Lze tak provést kliknutím na ikonu „Chart setting“ (druhá ikona v pravé části grafu nebo výběr po kliknutí do grafu pravým tlačítkem myši). V podzáložce „Axis Scale“ odškrtněte tlačítko „Auto scale“ a v poli „Y-Axis (log 10)“ změňte hodnotu „Min“ na požadované minimum (doporučujeme 1 nebo 0).



3. Pro lepší vizuální kontrolu nastavených Threshold hodnot si můžete jejich hodnotu v grafu zobrazit pomocí pravého kliku do grafu a výběru pole „Show Threshold Values“.

6 Právní upozornění

V plném rozsahu povoleném zákony vaší jurisdikce, je DIANA Biotechnologies, s.r.o. zbavena odpovědnosti za jakékoli přímé nebo nepřímé škody spojené nebo vzniklé v souvislosti s tímto dokumentem a jeho použitím, jakož i za jakékoli přímé a nepřímé škody spojené nebo vzniklé v souvislosti se soupravou DB-1219 COVID-19 Multiplex RT-PCR kit a s jejím použitím.

