



DB-1253

DBdirect™ Respiratory panel 2:

SARS-CoV-2/Flu/RSV

Návod k použití

Verze návodu: DB-1253-003-230918

Revize: 1.3 CZ

Poslední aktualizace: 22.09.2023



REF DB-1253-100rxns obsahuje reagentie pro 100 reakcí

REF DB-1253-1000rxns obsahuje reagentie pro 1000 reakcí

Obsah

1	Úvod	3
1.1	Použití (určený účel soupravy)	3
1.2	Souhrn a vysvětlení testu	3
1.3	Princip fungování testu	3
1.4	Vhodné vzorky a kompatibilní odběrové sady	4
1.5	Kompatibilní automatizace a PCR přístroje	4
2	Charakteristiky testu	5
2.1	Analytická reaktivita (inkluzivita)	5
2.2	Limit detekce (LOD)	6
2.3	Intraassay a Interassay variabilita	7
2.4	Analytická citlivost v klinických vzorcích (reprodukovatelnost)	8
2.5	Testování kompetitivní interference (detekce koinfekcí)	9
2.6	Klinická výkonnost, souhrnné výsledky	10
3	Bezpečnostní upozornění	15
4	Seznam materiálů	15
4.1	Požadované laboratorní vybavení	15
4.2	Doporučené laboratorní vybavení	15
4.3	Požadovaný materiál, který není součástí soupravy	15
4.4	Materiál, který je součástí soupravy	16
4.5	Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu	17
5	Návod k použití	18
5.1	Obecné postupy	18
5.2	Jak zamezit kontaminacím (falešně pozitivním výsledkům)	18
5.3	Požadované kontroly v každém stanovení	18
5.4	Než začnete	19
5.5	Skladování a příprava vzorků	19
5.6	Příprava RT-PCR master mixu	20
5.7	Přidání vzorku a externí kontroly do RT-PCR reakce	21
5.8	Protokol RT-PCR	23
5.8.1	Nastavení přístrojů BioRad CFX96™ a BioRad CFX Opus 96	23
5.9	Analýza dat	23
5.9.1	Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (Ct)	23
5.9.2	Vyhodnocení kontrol	25
5.9.3	Interpretace výsledků měřených vzorků	25
5.9.4	Typické výsledky	28
6	Právní upozornění	29
7	Seznam kompatibilních prostředků	29
8	Jednostránkový souhrnný protokol	30
8.1	Složky soupravy	30
8.2	Příprava RT-PCR	30
8.3	Protokol RT-PCR	30
9	Použité grafické symboly	31



1 Úvod

1.1 Použití (určený účel soupravy)

DBdirect™ Respiratory panel 2: SARS-CoV-2/Flu/RSV je určen pro současnou detekci a diferenciaci nukleových kyselin virů SARS-CoV-2, chřipky (Influenza A, IAV a Influenza B, IBV) a respiračního syncytiálního viru (RSV) ze širokého spektra respiračních vzorků (například nasálních, nasofaryngeálních, orofaryngeálních nebo bukalních stěrů v různých transportních médiích, slin, sputa, nasofaryngeální tekutiny (aspirátu) nebo nasofaryngeálního výplachu, výplachů dutiny ústní a výplachů hltanu kloktáním – tzv. „gargling liquid“) pomocí jednokrokového RT-PCR protokolu bez nutnosti předchozí izolace RNA. Souprava je určena k použití jako pomůcka při diferenciální diagnostice SARS-CoV-2, Influenza A/B a RSV u lidí pomocí přístroje pro real-time PCR.

1.2 Souhrn a vysvětlení testu

RNA z virů SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B a RSV jsou detekovatelné ve vzorcích lidských horních cest dýchacích během infekce. Pozitivní výsledek ukazuje přítomnost SARS-CoV-2, Influenza A/B a/nebo RSV RNA. Pozitivní výsledek na kterýkoliv detekovaný virus však nevylučuje bakteriální infekci ani souběžnou infekci (koinfekci) jinými viry a to včetně ostatních virů testovaných negativně v tomto testu. Negativní výsledek pro jakýkoliv vir nevylučuje infekci tímto virem a neměl by být používán jako jediný základ pro rozhodnutí o léčbě pacienta. Negativní výsledky musí být kombinovány s klinickými pozorováními, anamnézou pacienta a epidemiologickými informacemi.

Souprava DBdirect™ Respiratory panel 2: SARS-CoV-2/Flu/RSV je určena pro použití výhradně kvalifikovaným personálem klinické laboratoře, speciálně vyškoleným v metodách *in vitro* diagnostiky real-time PCR.

1.3 Princip fungování testu

Souprava obsahuje primery a próby pro provedení real-time RT-PCR detekce RNA virů SARS-CoV-2, Influenza A/B a/nebo RSV, kdy fluorescence je detekována pomocí techniky TaqMan™ hydrolyzačních prób. Vir **SARS-CoV-2 je detekován v kanále FAM** pomocí amplifikace dvou segmentů genomové RNA v oblastech genů *EndoRNase* a konzervované části *Spike*, stejné sekvence jsou detekovány v soupravách DB-1211 a DB-1219 a byly tak prověřeny již v několika milionech provedených testů. Primery použité pro Influenza A i B jsou dle doporučení CDC s adaptacemi, aby odpovídaly i současně kolujícím kmenům a cílí pro Influenza A do Matrix proteinu 1 (M1) na segmentu 7 a pro Influenza B do Nonstructural protein 1 (NS-1) na segmentu 8. Primery pro Influenza A sekvenčně odpovídají nejčastějším subtypům H1N1, H1N1-pdm, H3N2, H5N1 i H7N9, ale i H2N2, H1N2, H5N6 a H9N2 a **Influenza A je detekována v kanále HEX**. Primery pro Influenza B sekvenčně odpovídají subtypům Victoria i Yamagata a **Influenza B je detekována také v kanále HEX**. Souprava tak nerozlišuje Influenza A a Influenza B, pokud chcete tyto viry odlišit, tak použijte soupravu DB-1251 DBdirect™ Respiratory panel 1: SARS-CoV-2/Flu/RSV, která používá stejné primery a próby, avšak dokáže rozlišit Influenza A a B díky využití jednoho dalšího kanálu. Primery pro RSV jsou dle doporučení WHO s adaptacemi, aby odpovídaly i současně kolujícím kmenům a cílí pro oba viry (RSV A i RSV B) na oblast RdRP. **RSV je detekován v kanále Texas Red (TEX)**.

Tato souprava je určena k detekci virové RNA přímo v respiračních vzorcích bez předchozí izolace RNA. Proto souprava obsahuje externí RNA kontrolu a primery s próbou pro její detekci. **Tuto externí RNA kontrolu je nutné přidat do každé RT-PCR reakce, a to až po přidání vzorku.** Tímto



postupem ověříte účinnost RT-PCR reakce v každém vzorku testu (odhalíte případnou inhibici reverzní transkriptázy nebo polymerázy vzorkem nebo nevhodným médiem, stejně jako případnou degradaci RNA vzorkem: vždy se projeví pozdější amplifikací této kontroly). **Pro ověření správné funkce soupravy je nutné do každé analýzy přidat alespoň jednu negativní a alespoň jednu pozitivní kontrolu (dodávané v této soupravě) a doporučujeme také jeden známý klinický pozitivní vzorek** stejného typu jako je analyzován v daném testu: například vzorek slin či vzorek v používaném stěrovém transportním médiu.

Pokud chcete virové RNA detekovat v izolované RNA, pak použijte soupravu DB-1252, která je stejného designu jako tato souprava (detekce stejných virů ve stejných kanálech za použití shodných primerů a prób), avšak je určena pro detekci v izolované RNA a obsahuje izolační kontrolu. Tu je možné přidat ke vzorku před izolací RNA a její inhibice může kromě inhibice reverzní transkriptázy a/nebo polymerázy či degradace RNA ukazovat také na případné ztráty během procesu izolace RNA.

1.4 Vhodné vzorky a kompatibilní odběrové sady

Tato souprava je vhodná pro detekci virové RNA přímo v respiračním vzorku bez nutnosti předchozí izolace RNA, a to díky složení RT-PCR mixu, které dokáže RNA uvolnit z virionu a RNA ochránit před degradací vzorkem. Souprava byla validována pro dva základní typy vzorků: nosohltanové stěry v transportním médiu a sliny. Pro odběr slin doporučujeme použít odběrové sady na sliny DIANA Biotechnologies.

Pro použití s touto soupravou byly validovány následující vzorky a média:

- **Sliny** poté, co jsou tepelně inaktivovány: inaktivace zlepší pipetovatelnost vzorků a zvýší citlivost stanovení.
- **Nosohltanové stěry** po tepelné inaktivaci v různých transportních médiích: vhodná jsou běžná neinaktivační virová transportní média, fenolová červeň neinterferuje. Příklady médií validovaných pro použití s touto soupravou zahrnují:
 - LMS Corotest VTM, HCUTM médium, VTM DULAB, Qanto VTM, MWE Σ-VCM, MWE Σ-Virocult, ZÚ Ostrava VTM, Copan Universal Transport Medium a další. Pro použití s jinými médii je nutné soupravu jednotlivě validovat.
 - Vhodná jsou i PBS média (například testované složení 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4; vždy je nutné otestovat pro konkrétní složení; silné pufrы jsou nevhodné).
 - Nevhodná jsou inaktivační média, např. na bázi guanidinium isothiokyanátu.
 - Nevhodná mohou být i koncentrovaná média s vysokým obsahem solí.

Souprava byla klinicky validována pro použití v diagnostice sice pouze pro nosohltanové stěry v neinaktivačních virových transportních médiích a ve slinách, je ale možné ji použít i na jiné typy respiračních vzorků, například pro jiné různé stěry, aspiráty, výplachy anebo kloktání. V takových případech bývá typicky médiem PBS nebo obdobné pufrы, které jsou s touto soupravou kompatibilní. Nicméně použití jiného typu vzorků, jiného způsobu odběru slin, či každého použitého média je nutné validovat porovnáním výsledků pro alespoň 10 pozitivních vzorků po izolaci RNA vs. při přímé detekci touto soupravou.

1.5 Kompatibilní automatizace a PCR přístroje

Tuto soupravu je možné používat manuálně i automatizovaně na automatických laboratorních pipetovacích strojích. Výrobce je dodáván plastik a předpřipravený protokol pro automatizaci



na pipetovací stanici Agilent Bravo. Souprava DB-1224 Bravo Installation Package for DBdirect™ obsahuje potřebné protokoly pro přípravu RT-PCR reakcí ze slin i ze stěrů. Souprava DB-1222 DBdirect™ Bravo Extension Kit for Swab obsahuje další potřebný plastík pro přípravu RT-PCR reakcí ze stěrů, jednotlivé části mohou být použity i k jiným laboratorním účelům. Odběrové sady na sliny DIANA Biotechnologies obsahují plastík potřebný k odběru, transportu a uchování slin, který je také vhodný pro automatizaci. Souprava DB-1226 DBdirect™ Bravo Extension Kit for Saliva 1.4IM pak obsahuje plastík pro automatizaci přípravy RT-PCR reakcí ze slin s použitím těchto odběrových sad, jednotlivé části mohou být použity i k jiným laboratorním účelům. Soupravy DB-1228 Sample Rack 1.4IM a DB-1240 Sample Rack 1.4IF obsahují stojánky k přípravě zkumavek do formátu vhodného pro automatické zpracování.

Tato souprava byla validována na strojích BioRad CFX96™ Real-Time PCR detekční systém (BioRad CFX96™) a BioRad CFX Opus 96 Real-Time PCR systém (BioRad CFX Opus 96), které nabízí dle výrobce shodné možnosti a mohou být používány s touto soupravou záměnně. Veškeré protokoly a nastavení popsané v tomto návodu k použití se vztahují a byly validovány pro tyto dva PCR stroje. Soupravu je ale možné používat i na dalších PCR strojích (například Roche LC96), přesné nastavení a validace protokolů je nicméně zodpovědností uživatele. Souprava využívá detekci ve FAM, HEX, TEX a Cy5, tyto kanály jsou na téměř všech běžně používaných strojích. Validovat PCR protokol je možné buď změřením ředící řady vzorku o známé koncentraci anebo změřením setu alespoň 10 klinických vzorků o známé koncentraci, z nichž by alespoň několik mělo být slabě pozitivních s Ct > 30.

2 Charakteristiky testu

2.1 Analytická reaktivita (inkluzivita)

Pro ověření schopnosti soupravy detekovat různé kmeny chřipky A a B a RSV A a B bylo otestováno celkem 27 různých kmenů (3x Influenza A H1N1, 5x Influenza A H1N1 pandemic, 7x Influenza A H3N2, 8x Influenza B, 2x RSV A a 2x RSV B). Ty byly komerčně zakoupeny ve formě virové kultury, a protože byly v různých médiích, přičemž některá byla inhibiční, tak nebyly testovány protokolem bez izolace RNA, ale RNA byla nejprve izolována soupravou DB-1206 Automated RNA Isolation Kit a následně otestována soupravou DB-1252 RT-PCR Respiratory panel 2: SARS-CoV-2/Flu/RSV. Ta je určena pro izolovanou RNA a používá stejné primery a próby jako tato souprava, zde uvedená data tak pocházejí z měření se soupravou DB-1252. Izolované RNA z jednotlivých kultur (kmenů virů) byly otestovány ve třech různých ředěních (500x, 5000x a 50 000x, nejnižší testovaná koncentrace se lišila mezi virovými kmeny, ale byla vždy v rozsahu 0.002 až 0.4 TCID₅₀ „kopie“ v reakci) a výsledky měření byly vyhodnoceny dle návodu k použití DB-1250. Koncentrace virových kultur byly dodavatelem udávány v hodnotách TCID₅₀/mL, a proto se výsledné LOD analýzy vztáhly na tyto jednotky.

Souprava DB-1252 dokázala detekovat ve správném fluorescenčním kanále všechny testované kmeny chřipky A a B a RSV A a B v množství menším než 1 TCID₅₀ v reakci. V Tabulce 1 jsou pro každý testovaný kmen uvedeny hodnoty LOD na jednu reakci a v jednom mililitru (množství kopií viru je udáno v jednotkách TCID₅₀) a dále přibližná hodnota Ct v případě přítomnosti 1 TCID₅₀ viru v reakci. Vzhledem k tomu, že jednotky TCID₅₀ zjednodušeně udávají počet infekčních částic, tak rozdílné hodnoty LOD pro dané kmeny nemusejí nutně znamenat rozdílnou citlivost detekce, ale budou spíše odrážet rozdílnou infektivitu daných kultur. Určení LOD pro každý kmen bylo provedeno na základě porovnání Ct hodnot získaných z analýzy dané kultury (vždy měřeny tři body o různých množstvích TCID₅₀) a ředící řady standardu (použit jeden pro každý virus Influenza A



nebo B nebo RSV) o známém množství kopií RNA. Na základě porovnání bylo určeno kolika kopiím virové RNA odpovídá dané ředění TCID₅₀, a z této hodnoty pak byla dopočítána hodnota LOD (dle LOD naměřeného pro kvantitativní standardy, viz kapitola limit detekce) v jednotkách TCID₅₀.

Tabulka 1: Výsledky detekce různých kmenů virů chřipek a RSV

Virus	Kmen	LOD pro jednotlivé kmeny:		Ct pro 1 TCID ₅₀ /reakce
		TCID ₅₀ /reakce	TCID ₅₀ /mL	
Influenza A H1N1	A/Singapore/63/04	0.04	9	33.2
Influenza A H1N1	A/Brisbane/59/07	0.005	1	30.1
Influenza A H1N1	A/Taiwan/42/06	0.1	26	34.7
Influenza A H1N1pdm	A/Michigan/45/15	0.0007	0.1	27.1
Influenza A H1N1pdm	A/California/07/09	0.0007	0.1	27.2
Influenza A H1N1pdm	A/New York/18/09	0.002	0.4	28.5
Influenza A H1N1pdm	A/NY/03/09	0.07	13	33.8
Influenza A H1N1pdm	A/Mexico/4108/09	0.05	9	33.2
Influenza A H3N2	A/Perth/16/09	0.05	9	32.3
Influenza A H3N2	A/Texas/50/12	0.006	1	29.3
Influenza A H3N2	A/Hong Kong/4801/14	0.003	0.7	28.6
Influenza A H3N2	A/Wisconsin/67/05	0.01	2	30.4
Influenza A H3N2	A/Kansas/14/17	0.01	2	30.1
Influenza A H3N2	A/Brisbane/10/07	0.07	14	33.0
Influenza A H3N2	Singapore/INFIMH-16-0019/16	0.03	5	31.5
Influenza B	B/Brisbane/33/08	0.00009	0.02	22.5
Influenza B	B/Florida/04/06	0.0006	0.1	25.1
Influenza B	B/Brisbane/60/08	0.001	0.2	25.9
Influenza B	B/Texas/2/13	0.0004	0.08	24.6
Influenza B	B/Victoria/504/00	0.004	0.7	27.7
Influenza B	B/Florida/02/06	0.0005	0.1	25.0
Influenza B	B/Colorado/06/17	0.0006	0.1	25.2
Influenza B	B/Malaysia/2506/04	0.002	0.4	27.0
RSV-A	12/2014 Isolate #2	0.0002	0.04	24.5
RSV-A	3/2015 isolate #3	0.0002	0.05	25.0
RSV-B	CH93-18(18)	0.000005	0.0009	19.4
RSV-B	3/2015 Isolate #1	0.00003	0.007	22.2

Tabulka shrnuje názvy kmenů (2. sloupec) jednotlivých virů (1. sloupec) a hodnoty TCID₅₀ v reakci a v mililitru (3. a 4. sloupec) v RNA izolované z jednotlivých kultur. V posledním sloupci je pak očekávaná hodnota Ct pro 1 TCID₅₀ kopií v reakci. Podrobnější popis a vysvětlení je v textu.

Pro detekci viru SARS-CoV-2 jsou v soupravě použité stejné primery jako v soupravách DB-1211 a DB-1219. Tyto soupravy jsou používány od začátku pandemie a bylo ověřeno, že dokáží beze změny citlivosti detekovat všechny významné varianty tohoto viru, tj. varianty „wild-type“, alfa, beta, gama, delta i omikron.

2.2 Limit detekce (LOD)

Limit detekce byl určen jako přibližný počet kopií v reakci, při kterém vyjde 95 % jamek pozitivně. Pro určení LOD byly použity kvantitativní standardy od firmy Vircell. Pro každou testovanou koncentraci byl změřen 24plikát a podle počtu pozitivních jamek byl určen LOD. **Tabulka 2** shrnuje



přibližné LOD_{95%}. Pro RSV jsou reálné hodnoty pravděpodobně lepší, protože pro stanovení byly použity staré kmeny RSV, které se od dnešních liší a nesou záměny v cílených sekvencích oproti použitým primerům. LOD je udávána v počtu kopií na jamku (druhý sloupec), ale i jako koncentrace v mL vzorku (třetí sloupec), za předpokladu otestování 2 nebo 4 µL vzorku.

Tabulka 2: LOD_{95%} pro vybrané cílené viry

DB-1253	LOD _{95%} v jamce	LOD _{95%} mL ⁻¹ (4 µL vzorku)	LOD _{95%} mL ⁻¹ (2 µL vzorku)
SARS-CoV-2	2	500	1000
IAV H1N1-pdm	5	1250	2500
IAV H3N2	10	2500	5000
IBV Victoria	5	1250	2500
RSV-A	5	1250	2500
RSV-B	10	2500	5000

2.3 Intraassay a Interassay variabilita

Pro vybrané virové cíle (SARS-CoV-2, Influenza A H3N2, Influenza B Victoria, RSV A, RSV B) byla testována intra a interassay variabilita. Od každého cíle byly testovány tři koncentrace (1000 nebo 100 nebo 25 kopií v jamce) v osmi replikátech (1000 kopií pouze ve čtyřech) na třech různých destičkách, ve třech různých PCR strojích a vše bylo připraveno třemi různými operátory. Jako zdroj virových RNA byly použity komerční kvantifikované standardy RNA od výrobce Vircell. Pokus byl proveden na stroji BioRad CFX96™.

Z variance mezi jamkami v rámci jedné destičky byly spočítány standardní odchylky pro intraassay variability, a z variance mezi jamkami mezi destičkami byly spočítány standardní odchylky pro interassay variability. Ze všech měření jedné koncentrace, jednoho viru bylo spočítáno očekávané Ct jako průměr získaných Ct hodnot. V **Tabulce 3, 4 a 5** jsou všechny tyto tři parametry uvedeny pro každý z testovaných virů. Číslo vždy udává průměrnou hodnotu dané veličiny (respektive u standardních odchylek odmocninu průměru variancí v počtu cyklů) a v závorce je poté uvedeno rozmezí, které je definováno minimální a maximální hodnotou pro danou veličinu. V posledním řádku v **Tabulce 3** je uveden průměr přes všechny detekované RNA uvnitř jednoho měření (intraassay), v **Tabulce 4** je uveden průměr přes všechny detekované RNA mezi dvěma měřeními (interassay variability) a v **Tabulce 5** je uveden průměr přes všechny detekované RNA vyjma kontroly (EC).



Tabulka 3: Hodnoty intraassay variability

Kit	RNA	Kanál	Intraassay Variabilita		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1253	SARS-CoV-2	FAM	0.08 (0.05-0.10)	0.09 (0.08-0.10)	0.18 (0.12-0.21)
DB-1253	IAV H3N2	HEX	0.11 (0.06-0.14)	0.20 (0.19-0.21)	0.50 (0.45-0.58)
DB-1253	IBV	HEX	0.09 (0.06-0.11)	0.11 (0.08-0.13)	0.31 (0.31-0.32)
DB-1253	RSV-A	TEX	0.11 (0.08-0.14)	0.12 (0.08-0.16)	0.28 (0.23-0.36)
DB-1253	RSV-B	TEX	0.14 (0.03-0.19)	0.30 (0.23-0.36)	0.61 (0.51-0.76)
DB-1253	EC	Cy5	0.10 (0.05-0.13)	0.09 (0.05-0.14)	0.11 (0.08-0.14)
DB-1253	All	All	0.11 (0.03-0.19)	0.18 (0.08-0.36)	0.41 (0.12-0.76)

Tabulka 4: Hodnoty interassay variability

Kit	RNA	Kanál	Intraassay Variabilita		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1253	SARS-CoV-2	FAM	0.41 (0.18-0.57)	0.39 (0.24-0.55)	0.43 (0.28-0.59)
DB-1253	IAV H3N2	HEX	0.31 (0.11-0.41)	0.36 (0.23-0.47)	0.70 (0.51-0.91)
DB-1253	IBV	HEX	0.35 (0.18-0.48)	0.36 (0.17-0.47)	0.43 (0.25-0.56)
DB-1253	RSV-A	TEX	0.50 (0.11-0.66)	0.54 (0.20-0.73)	0.63 (0.37-0.81)
DB-1253	RSV-B	TEX	0.53 (0.22-0.72)	0.71 (0.47-0.96)	0.95 (0.41-1.20)
DB-1253	EC	Cy5	0.30 (0.12-0.44)	0.30 (0.11-0.42)	0.33 (0.10-0.48)
DB-1253	All	All	0.43 (0.11-0.72)	0.49 (0.17-0.96)	0.66 (0.25-1.20)

Tabulka 5: Očekávané hodnoty Ct

Kit	RNA	Kanál	Očekávané hodnoty Ct		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1253	SARS-CoV-2	FAM	26.66 (26.31-27.11)	29.86 (29.50-30.26)	31.72 (31.29-32.12)
DB-1253	IAV H3N2	HEX	29.55 (29.21-29.78)	32.89 (32.60-33.23)	35.03 (34.47-35.47)
DB-1253	IBV	HEX	28.27 (27.89-28.57)	31.53 (31.16-31.81)	33.51 (33.13-33.77)
DB-1253	RSV-A	TEX	29.63 (29.27-30.20)	32.61 (32.19-33.21)	34.46 (33.97-35.11)
DB-1253	RSV-B	TEX	30.11 (29.69-30.69)	33.29 (32.69-33.99)	35.05 (34.51-36.00)
DB-1253	EC*	Cy5	27.20 (26.75-27.52)	27.35 (26.97-27.63)	27.39 (26.97-27.64)
DB-1253	All	All	28.84 (26.31-30.69)	32.04 (29.50-33.99)	33.95 (31.29-36.00)

*Počet kopií externí kontroly (EC) je ve všech třech reakcích shodný.

2.4 Analytická citlivost v klinických vzorcích (reprodukovatelnost)

Pro určení analytické citlivosti v klinických vzorcích (reprodukovatelnosti) bylo 93 vzorků stěrů a 79 vzorků slin (všechny vzorky byly negativní na všechny testované viry při testování soupravami DB-1251, DB-1253 a DB-1255) postupně „spikováno“ nízkou koncentrací RNA různých virů (SARS-CoV-2, Influenza A H3N2, Influenza B Victoria, RSV A a RSV B). **Tabulka 6** shrnuje výsledky detekce RNA ve stěrech, zatímco **Tabulka 7** výsledky detekce RNA ve slinách. Za pozitivní vzorek byl považován každý vzorek s Ct v daném kanále pod 40. cyklus.



Tabulka 6: Určení analytické citlivosti (reprodukovatelnosti) v nosohltanových stěrech od 93 jednotlivců

DB-1253	% Pozitivit			Median Ct		
	Nativní	Nativní	Inaktiv.	Nativní	Nativní	Inaktiv.
Stěry (2 µL v reakci)						
Kopíí RNA v jamce	25	100	25	25	100	25
SARS-CoV-2	100 %	100 %	100 %	32.0	30.0	32.0
Influenza A (H3N2)	98 %	98 %	99 %	34.7	33.7	34.9
Influenza B	100 %	100 %	100 %	33.7	31.7	33.7
RSV A	100 %	100 %	100 %	35.2	33.0	34.7
RSV B	99 %	100 %	97 %	34.3	33.3	34.7

Spikovány byly jak nativní nosohltanové stěry, tak po tepelné inaktivaci. Do nativních stěrů bylo přidáno 25 a 100 kopií RNA na jamku, do inaktivovaných pouze 25 kopií. V tabulce jsou uvedena procenta vzorků, které byly vyhodnoceny jako pozitivní, a také medián Ct pro jednotlivé detekované RNA pro každé měření (při dodržení doporučených thresholdů). V nativních vzorcích docházelo cca u 10 % vzorků ke snížení maximální fluorescence křivek, u některých z nich do té míry, že bylo nutné threshold fluorescence snížit z výchozích hodnot. I tak nebyla RNA v některých jamkách detekována, avšak vždy to byly jamky, kde zároveň byla snížena fluorescence v kontrolním Cy5 kanále a/nebo byl posunut Ct v Cy5 kanále o několik cyklů výše, příp. se jednalo o autofluorescenci vzorku, která je také na první pohled odhalitelná. Naproti tomu u tepelně inaktivovaných vzorků vykazovaly téměř všechny prakticky stejnou cílovou fluorescenci ve všech kanálech a stanovení po inaktivaci se tak ukázalo jako robustnější. Nicméně i tak nebyla v inaktivovaných stěrech ve čtyřech vzorcích nízká koncentrace RNA detekována: u jednoho vzorku nebyl detekován SARS-CoV-2, v této jamce byla zároveň inhibice v Cy5 (o více než 3 cykly vyšší Ct) a vzorek by byl odhalen, ve třech vzorcích nebyl detekován RSV, jednou se jednalo o autofluorescenci a dvakrát o amplifikaci s příliš nízkou fluorescencí by byla vyhodnocena.

Tabulka 7: Určení analytické citlivosti (reprodukovatelnosti) ve slinách od 79 jednotlivců

DB-1253	% Pozitivit				Median Ct			
	2	2	4	4	2	2	4	4
Objem v reakci (µL)								
Kopíí RNA v jamce	25	100	25	100	25	100	25	100
SARS-CoV-2	100 %	100 %	100 %	100 %	31.5	30.4	31.8	29.7
Influenza A (H3N2)	100 %	100 %	99 %	100 %	35.8	33.7	34.6	33.6
Influenza B	100 %	100 %	99 %	100 %	33.1	32.1	33.5	31.3
RSV A	100 %	100 %	100 %	100 %	34.1	33.2	34.7	32.3
RSV B	100 %	100 %	100 %	100 %	34.8	32.6	34.2	33.1

Sliny byly spikovány po tepelné inaktivaci (nativní sliny nebyly testovány) v objemu 2 a 4 µL v jamce. Bylo přidáno 25 a 100 kopií RNA na jamku. V tabulce jsou uvedena procenta vzorků, které byly vyhodnoceny jako pozitivní a také medián Ct pro jednotlivé detekované RNA pro každé měření (při dodržení doporučených thresholdů). Ve 4 µL slin docházelo až ve 20 % vzorků ke snížení maximální fluorescence v některém z kanálů, avšak v naprosté většině byla maximální fluorescence i tak na několiknásobku thresholdů a ty nebylo nutné kromě několika vzorků nijak upravovat. Ve 2 µL slin se obdobný pokles vyskytoval výjimečně a threshold nebylo nutné upravovat pro žádný ze vzorků. RNA nebyla detekována pouze ve dvou případech a to při 25 kopiích RNA a 4 µL slin: jednou pro Influenza A a jednou pro Influenza B. V obou případech šlo o stejný vzorek, kde Cy5 byla inhibována o 5 respektive o 12 cyklů, a v obou měřeních by tak vzorek byl identifikován jako inhibiční. Měření v objemu 2 i 4 µL slin se tak ukázalo jako možné, ve 2 µL byla RNA detekována v každém kanále v každé jamce.

2.5 Testování kompetitivní interference (detekce koinfekcí)

Tato souprava dokáže detekovat koinfekce dvěma a více viry najednou, ale pokud je nějaký z kanálů silně pozitivní, může docházet ke zhoršení citlivosti detekce ostatních virů v ostatních kanálech. Pro posouzení citlivosti detekce koinfekcí byla otestována detekce RNA různých virů v malé koncentraci, pokud se nacházely ve směsi s jinou virovou RNA ve velké koncentraci.



Vzhledem k vysoké infekčnosti SARS-CoV-2 je nejpravděpodobnější koinfekce virem SARS-CoV-2 v kombinaci s chřipkou nebo RSV, a proto jsme testovali tyto kombinace.

V první sadě testů jsme otestovali detekci malé koncentrace RNA virů Influenza A, Influenza B, RSV A a RSV B (koncentrace 3x LOD, 10x LOD a 50x LOD) pokud se nacházejí ve směsi s velkou koncentrací virové RNA SARS-CoV-2 (s Ct cca 20 cyklů, což odpovídá více než 10 000x LOD) a v druhé sadě testů jsme otestovali detekci malé koncentrace RNA SARS-CoV-2 (3x LOD, 10x LOD a 50x LOD) v přítomnosti velké koncentrace RNA virů Influenza A, Influenza B, RSV A a RSV B (s Ct cca 25 cyklů, což odpovídá cca 1 000x LOD). **Tabulka 8** shrnuje naměřené výsledky pro koinfekce.

Tabulka 8: Schopnost detekce slabé koinfekce (kompetitivní interference)

Virus 1 (Ct~20)	Virus 2	Virus 2 detekován	Virus 1 (Ct~25)	Virus 2	Virus 2 detekován
SARS-CoV-2	IAV H3N2	50x LOD	IAV H3N2	SARS-CoV-2	3x LOD
SARS-CoV-2	IBV	50x LOD	IBV	SARS-CoV-2	3x LOD
SARS-CoV-2	RSV-A	50x LOD	RSV-A	SARS-CoV-2	3x LOD
SARS-CoV-2	RSV-B	50x LOD	RSV-B	SARS-CoV-2	3x LOD

V případě, že se ve vzorku vyskytovala velká koncentrace SARS-CoV-2 RNA, pak byla pozorována výrazně slabší amplifikace pro malé koncentrace ostatních virů, a všechny tak byly detekovatelné až od 50x LOD a i tak jen s nízkou fluorescencí. Na druhou stranu, pokud byla v jamce velká koncentrace Influenza A, Influenza B, RSV A nebo RSV B a malá koncentrace SARS-CoV-2, tak ta byla spolehlivě detekována již od nejnižší testované koncentrace, tj. 3x LOD, a její detekce tak nebyla ovlivněna, přítomnost velké koncentrace Influenza B vedla pouze k nižší fluorescenci při detekci nejnižších koncentrací SARS-CoV-2.

Detekce SARS-CoV-2 v přítomnosti velké koncentrace RNA ostatních virů oslabena není a je spolehlivá i v malé koncentraci (3x LOD). Naproti tomu detekce ostatních virů je v přítomnosti vysoké koncentrace SARS-CoV-2 oslabena a všechny virové RNA byly detekované až při koncentraci 50x LOD a navíc s nižší fluorescencí. A i proto nesmí být negativita v jakémkoliv kanálu použita jako jediné vodítko pro vyloučení infekce daným virem.

2.6 Klinická výkonnost, souhrnné výsledky

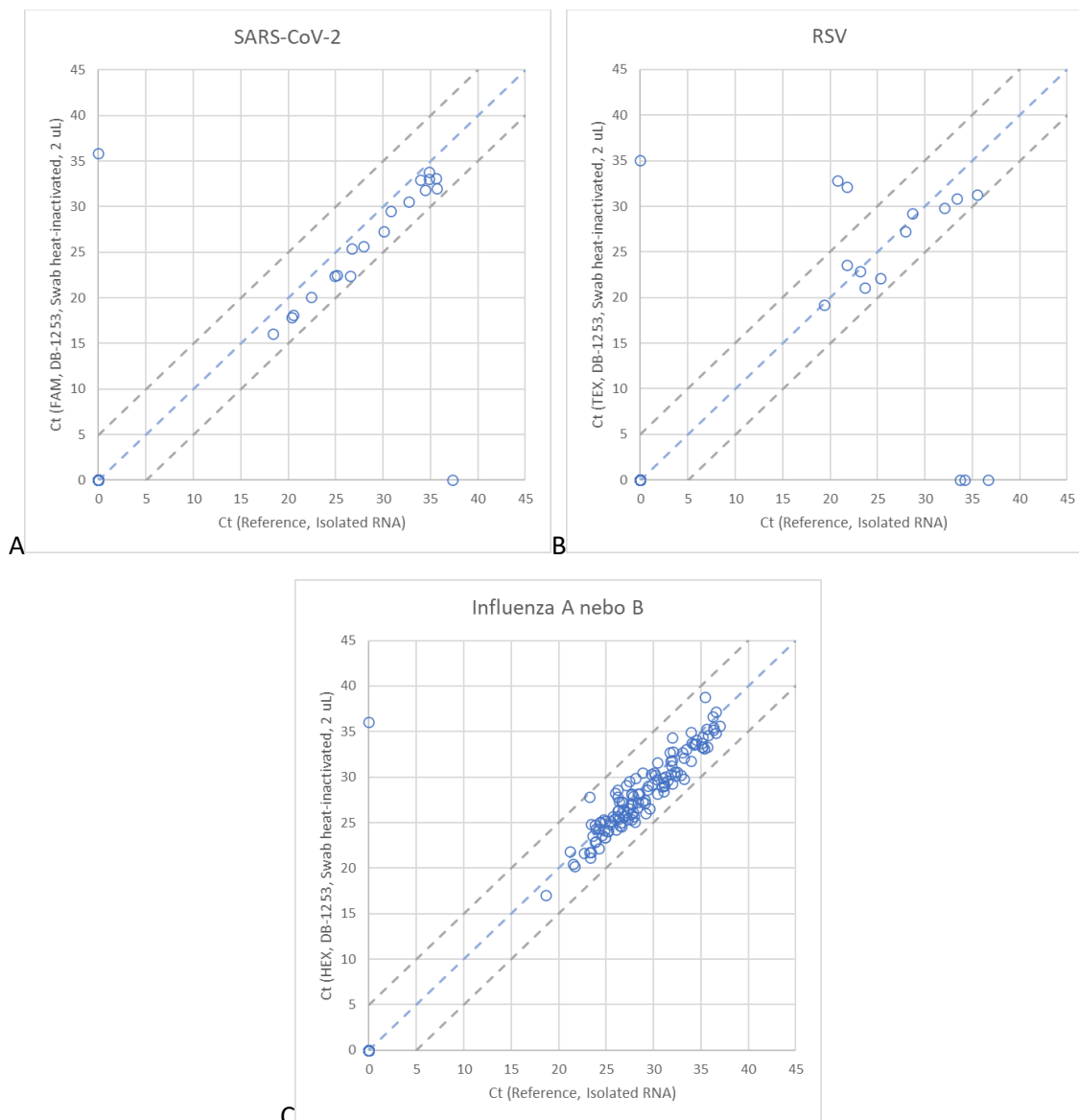
Celkem 186 vzorků nosohltanových stěrů a 386 vzorků slin, které byly odebrány jedincům z evropské populace pro indikované i preventivní testování pro COVID-19 a jiná respirační onemocnění bylo pro každý virus otestováno vždy alespoň dvěma referenčními soupravami a výsledky byly porovnány s výsledky detekce těchto virů touto soupravou. Ze vzorků byla izolována RNA pomocí soupravy DB-1206 Automated RNA Isolation Kit od výrobce DIANA Biotechnologies. Následně v izolované RNA detekovány jednotlivé viry pomocí referenčních souprav dle pokynů výrobce příslušné RT-PCR soupravy, ať už v multiplexu nebo jednotlivě (podle designu referenční soupravy). Touto soupravou ale byly viry detekovány protokolem bez izolace RNA, vždy ve 2 i 4 μ L slin i stěrů. Vzorky nosohltanových stěrů byly i v inhibičních médiích a dva vzorky inhibovaly RT-PCR reakci a byly proto z analýzy vyřazeny, dalších 10 bylo vyřazeno při měření 4 μ L, protože ve větším objemu už inhibovaly také. Pozitivní vzorky stěrů i slin na SARS-CoV-2 pocházejí z roku 2022 a jsou to varianta omikron. Vzorky stěrů pozitivní na RSV pocházejí z roku 2021 a sliny pozitivní na RSV z roku 2022. Vzorky stěrů pozitivních na Influenza A pocházejí z roku 2019, vzorky stěrů pozitivních na Influenza B z let 2017 a 2018 a vzorky slin pozitivních na Influenza A i B pocházejí z roku 2022. Vzorky pocházejí z několika různých laboratoří a stěry byly ve směsi různých transportních médií.



Výsledky porovnání pro 2 µL nosohltanových stěrů jsou zobrazeny na **Obrázku 1**, a pro 2 µL slin na **Obrázku 2**, kde jsou v grafech porovnány naměřené hodnoty Ct touto soupravou a referenčními soupravami (každý virus v jednom grafu). Počty TP („true positive“), FN („false negative“), TN („true negative“) a FP („false positives“) jsou uvedeny v **Tabulce 9**. V tabulce jsou vypočteny také hodnoty PPA („positive percent agreement“) a NPA („negative percent agreement“). V případě několika FN vzorků se jednalo o vzorky, ve kterých došlo ke koinfekci, kdy jeden z virů (SARS-CoV-2) byl ve vysoké náloži, a druhý virus byl v nízké koncentraci (Ct okolo 35. cyklu). V těchto vzorcích byl SARS-CoV-2 detekován, nebyl ale detekován druhý virus ve slabé koncentraci. Protože jsme výsledky porovnávali i se soupravami, které viry detekovaly jednotlivě (a v multiplexu nebyl SARS-CoV-2), tak je v tabulce vypočtena hodnota PPA*, ve které nebyly zohledněny tyto FN výsledky (respektive byly považovány za TN).

„Positive percent agreement“ (PPA) prostředku dosáhl ve vzorcích slin a stěrů pro SARS-CoV-2 99.2 %, pro Influenza A a B 100.0 % a pro RSV 95.1 %, zatímco „negative percent agreement“ (NPA) pro dané viry dosáhl postupně 97.6 %, 98.6 % a 97.8 %. Hodnoty PPA i NPA prokazují, že prostředek je vhodný a účinný pro detekci RSV, Influenza A a B a SARS-CoV-2 virů.

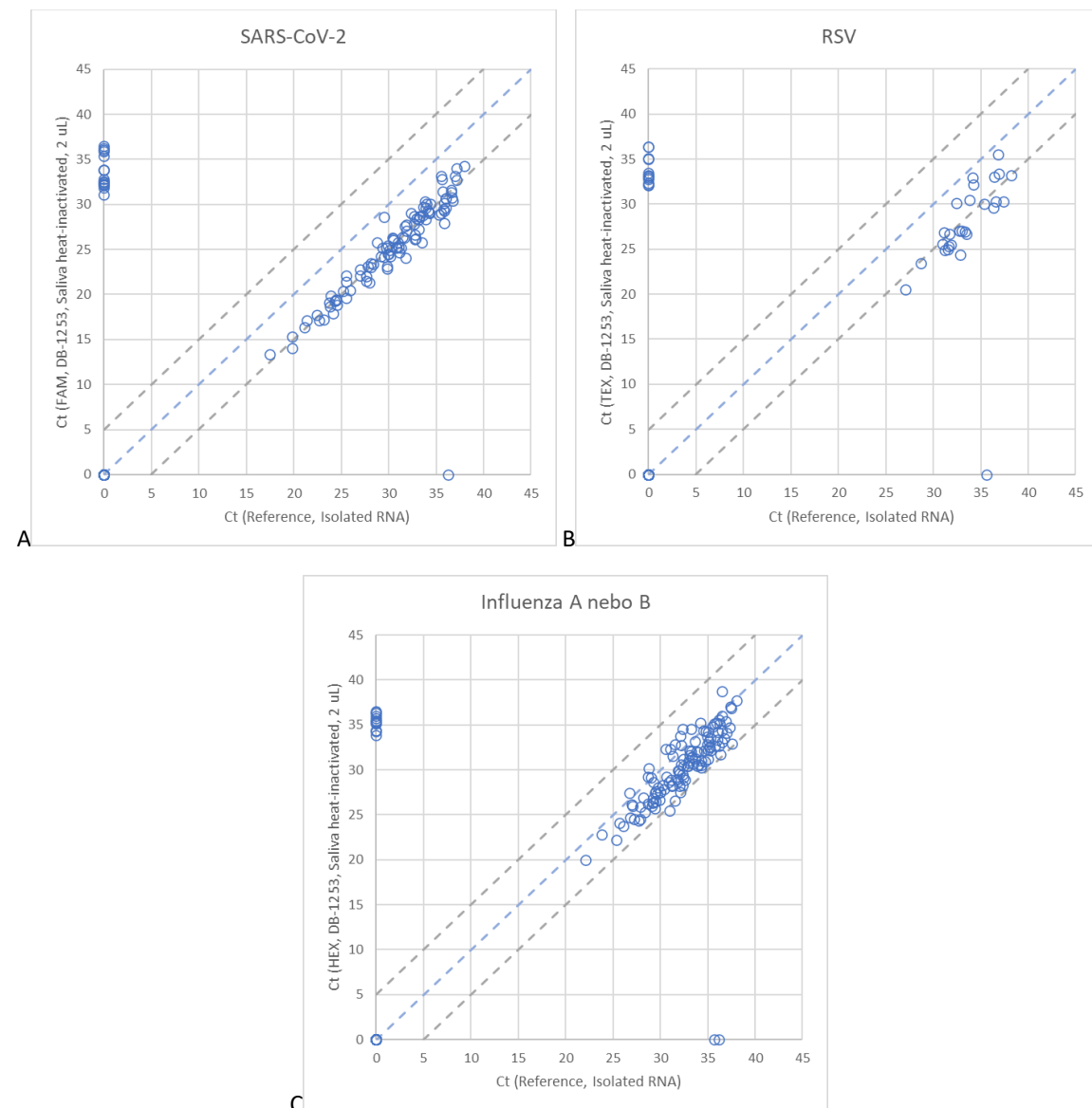




Obrázek 1: Porovnání naměřených Ct pro 2 μ L nosohltanových stěrů s referenčními měřeními

Detekce každého viru je v jednom grafu, na ose y grafu je vyneseno odpovídající kanál soupravy DB-1253. Konkrétně je vyneseno Ct z měření touto soupravou (osa y) porovnané s Ct naměřenými referenčními soupravami (osa x). Pokud byl signál naměřen pouze v jedné referenční soupravě (Ct < 37), pak je zde vyneseno toto Ct, pokud bylo Ct v obou soupravách pod 40 (a alespoň v jedné pod 37), tak je vyneseno průměr obou Ct. Hodnoty ležící na ose x značí, že daný vzorek byl detekován pouze v referenčních soupravách, zatímco hodnoty na ose y značí, že vzorek byl detekován pouze v DB-1253 soupravě. Vliv inhibice médií byl pozorován u dvou vzorků RSV, které měly oproti referenčním soupravám, které pracovaly s izolovanou RNA, výrazně vyšší Ct. Při jejich změření po izolaci RNA soupravou DB-1252 používající stejné primery byly oba vzorky detekovány s obvyklými Ct, což potvrzuje, že horší Ct je vlivem inhibice média a nikoliv primery. Zároveň ale byly hodnoty Ct v průměru v soupravě DB-1253 nižší než v referenčních soupravách (pro všechny detekované viry), což ukazuje na potenciálně citlivější detekci soupravou DB-1253.





Obrázek 2: Porovnání naměřených Ct pro 2 µL slin s referenčními měřeními

Detekce každého viru je v jednom grafu, na ose y grafu je vyneseno odpovídající kanál soupravy DB-1253. Konkrétně je vyneseno Ct z měření touto soupravou (osa y) porovnané s Ct naměřenými referenčními soupravami (osa x): pokud byl signál naměřen pouze v jedné referenční soupravě (Ct <37), pak je zde vyneseno toto Ct, pokud bylo Ct v obou soupravách pod 40 (a alespoň v jedné pod 37), tak je vyneseno průměr obou Ct. Hodnoty ležící na ose x značí, že daný vzorek byl detekován pouze v referenčních soupravách, zatímco hodnoty na ose y značí, že vzorek byl detekován pouze v DB-1253 soupravě. Pro SARS-CoV-2, Influenza A/B i RSV bylo detekováno mnoho vzorků pouze v soupravě DB-1253 a nikoliv v referenční soupravě (viz body na osách y). Při bližší analýze (Tabulka 9) je vidět, že část z nich byla v některém z referenčních měření hraničně pozitivní a zbytek vzorků jde patrně na vrub vyšší citlivosti detekce soupravou DB-1253. Všechny tyto vzorky jsou totiž s Ct >30 a zároveň hodnoty Ct jsou v DB-1253 oproti referenci nižší v průměru o pět cyklů pro SARS-CoV-2 a RSV a o čtyři cykly pro Influenza A/B a je velká pravděpodobnost, že se jedná o slabé vzorky, které nebyly v referenčním měření zachyceny.



Tabulka 9: Výsledky určení NPA a PPA pro vzorky z nosohltanových stěrů a slin (2 µL)

Vzorek	Interpretace	TP	FN	TN	FP	FP ²	FP ¹	PPA	PPA*	NPA
Nosohltanové stěry	SARS-CoV-2	18	1	164	1	0	0	94.7%	94.7%	99.4%
	Influenza A/B	128	0	55	1	1	0	100.0%	100.0%	100.0%
	RSV	12	3	168	1	0	1	81.3%	86.7%	100.0%
Sliny	SARS-CoV-2	100	1	250	17	6	4	99.1%	99.1%	97.3%
	Influenza A/B	120	2	231	15	8	5	98.5%	100.0%	99.1%
	RSV	26	1	329	12	0	0	96.3%	100.0%	96.5%
Nosohltanové stěry + sliny	SARS-CoV-2	118	2	414	18	6	4	98.5%	98.5%	98.1%
	Influenza A/B	248	2	286	16	9	5	99.2%	100.0%	99.3%
	RSV	38	4	497	13	0	1	90.7%	95.1%	97.6%

Všechny vzorky byly nejprve změřeny dvěma referenčními soupravami a jako pozitivní byly považovány všechny vzorky s Ct v alespoň jedné ze souprav pod 37 cyklů. Následně byly vzorky změřeny soupravou DB-1253 a vzorky, které měly Ct pod 37 anebo pod 40 a zároveň byly pozitivní v referenci, tak byly považovány za pozitivní. Pokud se pozitivita shodovala s referencí, pak byly považovány za **TP**, pokud byly pozitivní pouze v DB-1253 tak za **FP**. V případě FP bylo ještě prověřeno, zda nebyly tyto vzorky hraničně pozitivní v jedné referenční soupravě (v jedné měl vzorek Ct 37 až 40 a v druhé byl negativní, sloupec **FP¹**) nebo obou referenčních soupravách (v obou měl vzorek Ct mezi 37 až 40, sloupec **FP²**). Tyto pozitivní vzorky byly považovány pro účel výpočtu PPA a NPA jako TP (jejich součet byl přičten k TP a odečten od FP). Za **FN** byly považovány vzorky pozitivní pouze v referenci, zatímco za **TN** vzorky negativní v DB-1253 i v referenci. **PPA** bylo vypočteno jako počet TP lomeno součet TP a FN, zatímco **NPA** bylo vypočteno jako TN lomeno součet TN a FP. **PPA*** bylo vypočteno stejným způsobem jako PPA, avšak FN vzorky byly považovány za TN pokud platilo, že nebyl detekován vir s Ct >30, který byl ve vzorku zároveň s dalším virem s Ct <25. Tj. pokud nebyl detekován vir, který byl ve vzorku zároveň s dalším virem o mnohem vyšší náloži, podrobnosti viz text. Celkem se jednalo o čtyři vzorky.

Tabulka 10: Výsledky určení NPA a PPA pro vzorky z nosohltanových stěrů a slin (4 µL)

Vzorek	Interpretace	TP	FN	TN	FP	FP ²	FP ¹	PPA	PPA*	NPA
Nosohltanové stěry	SARS-CoV-2	19	0	155	0	0	0	100.0%	100.0%	100.0%
	Influenza A/B	118	0	55	1	0	1	100.0%	100.0%	100.0%
	RSV	12	3	159	0	0	0	80.0%	85.7%	100.0%
Sliny	SARS-CoV-2	100	1	246	22	6	6	99.1%	99.1%	96.1%
	Influenza A/B	120	2	233	15	8	3	98.5%	100.0%	98.3%
	RSV	27	0	330	11	0	0	100.0%	100.0%	96.8%
Nosohltanové stěry + sliny	SARS-CoV-2	119	1	401	22	6	6	99.2%	99.2%	97.6%
	Influenza A/B	238	2	288	16	8	4	99.2%	100.0%	98.6%
	RSV	39	3	489	11	0	0	92.9%	95.1%	97.8%

Všechny vzorky byly nejprve změřeny dvěma referenčními soupravami a jako pozitivní byly považovány všechny vzorky s Ct v alespoň jedné ze souprav pod 37 cyklů. Následně byly vzorky změřeny soupravou DB-1253 a vzorky, které měly Ct pod 37 anebo pod 40 a zároveň byly pozitivní v referenci, tak byly považovány za pozitivní. Pokud se pozitivita shodovala s referencí, pak byly považovány za **TP**, pokud byly pozitivní pouze v DB-1253 tak za **FP**. V případě FP bylo ještě prověřeno, zda nebyly tyto vzorky hraničně pozitivní v jedné referenční soupravě (v jedné měl vzorek Ct 37 až 40 a v druhé byl negativní, sloupec **FP¹**) nebo obou referenčních soupravách (v obou měl vzorek Ct mezi 37 až 40, sloupec **FP²**). Tyto pozitivní vzorky byly považovány pro účel výpočtu PPA a NPA jako TP (jejich součet byl přičten k TP a odečten od FP). Za **FN** byly považovány vzorky pozitivní pouze v referenci, zatímco za **TN** vzorky negativní v DB-1253 i v referenci. **PPA** bylo vypočteno jako počet TP lomeno součet TP a FN, zatímco **NPA** bylo vypočteno jako TN lomeno součet TN a FP. **PPA*** bylo vypočteno stejným způsobem jako PPA, avšak FN vzorky byly považovány za TN pokud platilo, že nebyl detekován vir s Ct >30, který byl ve vzorku zároveň s dalším virem s Ct <25. Tj. pokud nebyl detekován vir, který byl ve vzorku zároveň s dalším virem o mnohem vyšší náloži, podrobnosti viz text. Celkem se jednalo o tři vzorky.



3 Bezpečnostní upozornění

Tato souprava je určena pouze pro profesionální použití. Dodržujte obecné zásady chemické bezpečnosti. Používejte ochranné pomůcky (rukavice, brýle), zamezte přímému kontaktu s chemikáliemi a vyvarujte se jídlu nebo pití v laboratořích.



Při práci s biologickými vzorky věnujte pozornost bezpečnostním pravidlům pro práci s infekčním biologickým materiálem, používejte vhodné ochranné vybavení (např. štít, respirátor) a pracujte se vzorky pouze ve vyhrazených biohazard boxech nebo ve vyhrazených pracovních prostorech. S infekčními vzorky pracujte pouze v laboratořích kategorie BSL2+ nebo BSL3. Potenciálně infekční odpad zlikvidujte v souladu s platnými právními předpisy, interními postupy laboratoře a bezpečnostními listy soupravy.



Průběžně kontrolujte, zda v pracovním prostoru nejsou rozlité chemikálie nebo biologické vzorky. V případě rozlití pracovní plochu okamžitě dekontaminujte. Pokud dojde ke kontaktu reagensů s pokožkou nebo k zasažení očí, okamžitě postižené místo opláchněte pod tekoucí vodou.

4 Seznam materiálu

4.1 Požadované laboratorní vybavení

- Real-time PCR cykler se softwarem schopným multiplexní detekce v kanálech FAM, HEX, Texas Red a Cy5 – **postupujte podle návodu poskytnutého výrobcem daného přístroje**
- Kalibrované jednobáňové/multibáňové pipety
- Rukavice a jiné ochranné prostředky

4.2 Doporučené laboratorní vybavení

- Stolní vortex a centrifuga
- V případě testování vzorků slin: inkubátor s nuceným oběhem vzduchu a se schopností výhřevu na 90 °C; lze použít i pro inaktivaci stěrů
- V případě použití automatizovaného protokolu: pipetovací robot (doporučená je např. pipetovací stanice Agilent Bravo)

4.3 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

- Jednorázové pipetovací špičky (doporučujeme špičky s filtrem)
- Jednorázové zkumavky pro míchání jednotlivých složek
- PCR destička a adhezivní optická fólie pro zalepení PCR destičky
- V případě použití automatizovaného protokolu: potřebné protokoly a plastik pro automatizaci (např. pro pipetovací stanici Agilent Bravo: sady DB-1222 a DB-1226)



4.4 Materiál, který je součástí soupravy

Tabulka 11: Složky soupravy DB-1253

Souprava ^[7]	Složky soupravy ^[7]	REF kód ^[6]	Objem (μL) ^[5]	Podmínky skladování	Popis a barva víčka
DB-1253-100rxns	Enhancer mix (4x)	RF02930	500	≤ -18 °C ^[2,3]	1
	Primer mix (4x)	RF02074	500	≤ -18 °C ^[1,2,3]	2
	Enzyme mix (4x)	RF01000	500	≤ -70 °C ^[2,3]	3
	Positive control A	RF02991	150	≤ -18 °C ^[2,3]	4A
	Positive control B	RF02557	150	≤ -18 °C ^[2,3]	4B
	External control	RF02505	500	≤ -18 °C ^[2,3]	5
	Negative control	RF05353	150	≤ -18 °C ^[2]	6
DB-1253-1000rxns	Enhancer mix (4x)	RF02930	5000	≤ -18 °C ^[2,3]	1 ^[4]
	Primer mix (4x)	RF02074	5000	≤ -18 °C ^[1,2,3]	2 ^[4]
	Enzyme mix (4x)	RF01000	5000	≤ -70 °C ^[2,3]	3 ^[4]
	Positive control A	RF02991	2x 750	≤ -18 °C ^[2,3]	4A
	Positive control B	RF02557	2x 750	≤ -18 °C ^[2,3]	4B
	External control	RF02505	5000	≤ -18 °C ^[2,3]	5 ^[4]
	Negative control	RF05353	2x 750	≤ -18 °C ^[2]	6



[1] Uchovávejte na temném místě (obsahuje látky, které jsou citlivé na světlo). **[2] Skladujte celou soupravu při teplotě ≤ 70 °C**; jednotlivé složky s výjimkou Enzyme mix (4x) můžete skladovat i při teplotě -18 °C nebo nižší. Přeprava prostředku musí probíhat na suchém ledu a je povinností distributora zajistit jeho dostatečné množství po celou dobu přepravy. Nepoužívejte soupravu, pokud složky byly při dodání rozmrazené, jejich stav při předání zkontrolujte, pokud v přepravním boxu nebyl suchý led či ho bylo málo. **[3] Minimalizujte počet zamrazení/rozmrazení**, roztoky rozalíkujte po prvním rozmrazení. **[4]** V soupravách pro 1000 reakcí mají složky č. 1-3 průhledná víčka a externí kontrola (složka č. 5) má fialový štítek. **[5]** Do zkumavek je plněn objem o 10 % vyšší, než je uvedeno v tabulce. **[6]** REF kódy a čísla šarží (LOT) soupravy i jednotlivých složek jsou uvedeny na obalu, obal proto pro referenci zachovejte, dokud nespoteřebujete celou soupravu. Nemíchejte složky z různých šarží souprav. **[7]** Na obalu soupravy i jednotlivých složek soupravy jsou uvedeny čárové kódy se základními informacemi.

Enhancer Mix (4x)

Obsahuje různé soli zvyšující účinnost RT-PCR reakce. Dodáván jako 4x koncentrát.

Primer Mix (4x)

Obsahuje primery a hydrolyzační próby pro detekci SARS-CoV-2 (FAM), Influenza A a Influenza B (HEX), RSV (TEX) a externí kontroly (Cy5). Dodáván jako 4x koncentrát.

Enzyme Mix (4x)

Obsahuje termostabilní reverzní transkriptázu, "hot-start" Taq polymerázu, nukleotidy, pufr, soli, detergenty, inhibitory RNáz a další látky k ochraně RNA před degradací, a speciální přísady pro extrakci virové RNA z viru. Dodáván jako 4x koncentrát.



Positive control A a Positive control B

Pozitivní kontrola 4A obsahuje směs genomové RNA virů SARS-CoV-2, Influenza A H3N2 a RSV B. Pozitivní kontrola 4B obsahuje směs genomové RNA virů SARS-CoV-2, Influenza B Victoria a RSV A. Otevření těchto lahviček může způsobit kontaminaci pracovního prostoru, proto tyto **vialky před otevřením vždy stočte!**

External control a Negative control

Externí kontrola obsahuje syntetickou RNA uměle vytvořenou sekvenci o délce 2000 bází. Tato RNA se přidává do RT-PCR reakce po přidání vzorku a odhalí tak případnou inhibici reverzní transkriptázy nebo polymerázy, stejně jako degradaci RNA vzorkem. Negativní kontrola obsahuje PCR grade vodu.

4.5 Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu

Souprava DB-1253 DBdirect™ Respiratory panel 2: SARS-CoV-2/Flu/RSV představuje inovativní formulaci RT-PCR mixu, který dokáže extrahovat virovou RNA bez nutnosti předchozí izolace RNA. Složení navíc umožňuje provést RT-PCR analýzu v přítomnosti vzorku, aniž by došlo k její inhibici nebo degradaci RNA. Z těchto důvodů některé složky obsahují reagenty, které nejsou v RT-PCR běžně používané, a mají speciální nároky na skladování. Na základě důkladných testů stability je proto prozatím nutné některé složky skladovat při nízké teplotě $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tak, aby se udržela funkčnost všech složek, a detekce přímo v biologických matricích byla robustní. Ze stejného důvodu je limitován počet rozmrazení některých složek. Doba použitelnosti celé soupravy je uvedena na obalu soupravy.

Složky 1 (Enhancer Mix) a 2 (Primer Mix) dlouhodobě skladujte při teplotě $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vyhněte se opakovanému zamrazení/rozmrazení, nikdy nepřekračujte čtyři cykly zamrazení/rozmrazení. Pokud budete tyto složky používat vícekrát, rozalíkovat je po prvním rozmrazení.

Složku 3 (Enzyme Mix) je nutné dlouhodobě skladovat při teplotě $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vyhněte se opakovanému zamrazení/rozmrazení, avšak při rozmrazování při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zamrazování při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší je možné tuto složku až čtyřikrát zamrazit/rozmrazit. Pokud budete tyto složky používat vícekrát, rozalíkovat je po prvním rozmrazení.

Složky 1, 2 a 3 jsou stabilní přinejmenším 4 hodiny při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pokud nejsou smíchané dohromady, avšak doporučujeme složky použít co nejdříve po rozmrazení. Uchovávejte složky soupravy mimo přímé sluneční světlo, působení běžného denního světla po dobu přinejmenším 8 hodin nemá vliv na jejich funkci. Primer mix by ale měl být dlouhodobě uchováván na tmavém místě.

RT-PCR Master Mix (směs složek 1, 2 a 3; viz kapitola 5.6) je stabilní po dobu až 2 hodin při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, avšak doporučujeme RT-PCR master mix použít (smíchat se vzorky) do 30 minut od jeho přípravy. Master mix uchovávejte mimo přímé sluneční světlo, působení běžného denního světla po dobu přinejmenším 8 hodin nemá vliv na jeho funkci.

RT-PCR Master Mix může být jednou zamrazen. Lze si tedy předem připravit master mix pro několik PCR destiček, nicméně vše musí být rozalíkováno a zamrazeno co nejdříve po přípravě master mixu. Je nutné zamrazení při teplotě $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně je možné skladovat až 1 měsíc při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší (viz kapitola 5.6).



Složky 4 (pozitivní kontrola) a 5 (externí kontrola) obsahují RNA, rozmrazujte je na dobu nezbytně nutnou a uchovávejte je na ledu, avšak mohou být skladovány kumulativně přinejmenším 24 hodin na pokojové teplotě. Maximální počet cyklů zamrazení/rozmrazení je devět pro externí kontrolu a čtyři pro pozitivní kontrolu. Optimální teplota pro dlouhodobé skladování je při teplotě ≤ -70 °C, ale mohou být skladovány i při teplotě -18 °C nebo nižší.

Negativní kontrolu (PCR vodu) lze dlouhodobě skladovat při -18 °C nebo nižší teplotě a opakovaně mrazit a rozmrazovat. Pro rychlejší rozmrazení doporučujeme přípravu menších alikvotů.

5 Návod k použití

5.1 Obecné postupy

- Nepoužívejte součásti soupravy, které jsou při přijetí poškozené nebo rozmrazené. Jejich stav při předání zkontrolujte, pokud v přepravním boxu nebyl suchý led či ho bylo málo. Uschovejte je pro případnou reklamaci a kontaktujte výrobce.
- Nesprávné zacházení se složkami soupravy a nedodržení postupů uvedených v tomto návodu k použití může nepříznivě ovlivnit výsledky.
- Používejte stejnou verzi a aktuální revizi návodu k použití (viz záhlaví), která je uvedena na obalu.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti, která je uvedena na obalu.
- Nemíchejte složky z různých šarží souprav (číslo šarže složky je uvedeno na vialce).

5.2 Jak zamezit kontaminacím (falešně pozitivním výsledkům)

Je třeba dodržovat správnou laboratorní praxi, aby se zabránilo křížové kontaminaci vzorků, a používat jednorázové pipetovací špičky s filtry, které se mění pro každý krok protokolu.

Manipulace s klinickými vzorky, pozitivními kontrolami (templátová RNA) nebo amplifikovanými PCR produkty (templátová DNA) by měla být prostorově oddělena od manipulace se zásobními složkami 1, 2 a 3, aby se minimalizovalo riziko náhodných kontaminací templátovou RNA/DNA. Nejlepší praxí je připravit RT-PCR master mix ze složek 1, 2 a 3 a napipetovat tuto směs do PCR destičky v prostoru, ve kterém se nepracuje s templátovou RNA/DNA (např. PCR box). Tento prostor by měl mít vyhrazené vybavení (např. pipety, laboratorní plastik), které se nepoužívá pro jiné účely a které nikdy nepřichází do styku s templátovou RNA/DNA. PCR destičky s master mixem by následně měly být přeneseny na jiné místo (např. do jiného PCR boxu), kde jsou přidány vzorky nebo pozitivní kontroly.

Další obecné pokyny, jak zabránit náhodné kontaminaci:

- **Nikdy neotvírejte zkumavku/destičku s amplifikovanými PCR produkty.**
- Nikdy neotvírejte nebo jinak nemanipulujte se vzorky, pozitivními kontrolami nebo s amplifikovanými PCR produkty v prostorech, ve kterých je připravován RT-PCR mix.
- Před manipulací s templátovou RNA/DNA uzavřete ostatní lahvičky s reagensiemi a před otevřením vždy vialku s pozitivní kontrolou řádně stočte.
- Nádoby s reagensiemi nechávejte otevřené pouze po dobu nezbytně nutnou.
- K ředění vzorku použijte ultračistou nebo PCR grade vodu (nebo z ní připravené pufry).

5.3 Požadované kontroly v každém stanovení

Pro odhalení případných falešně pozitivních a falešně negativních výsledků je nutné přidat pozitivní a negativní kontroly na každou RT-PCR destičku. Jako negativní kontrolu použijte buď



dodanou negativní kontrolu (PCR grade water, vialka č. 6), nebo čisté odběrové médium. Jako pozitivní kontrolu použijte ideálně obě pozitivní kontroly, které jsou součástí soupravy (Positive control A a Positive control B, vialky č. 4A a 4B), anebo alespoň jednu z nich.

5.4 Než začnete

Složky soupravy jsou dodány a skladovány zamrazené, proto před každým použitím:

- Rozmrazte složky na pokojové teplotě (nerozmrazujte na ledu či v lednici).
- Před otevřením každou vialku stočte, abyste shromáždili veškerou tekutinu na dně.
- Před použitím reagentie promíchejte ve vialkách pomocí vortexu nebo pipetováním. Pipeta by měla být pro míchání nastavena minimálně na ½ objemu míchaného roztoku, pro správné promíchání je zapotřebí několikrát propipetování. Dostatečné promíchání je obzvláště důležité před rozdělením do alikvotů. Pokud vialku vortexujete, vždy ji před otevřením krátce stočte.

5.5 Skladování a příprava vzorků

Vzorky slin

Pro odběr slin používejte odběrové sady na sliny DIANA Biotechnologies. Vzorky slin je v těchto sadách možné skladovat přinejmenším 72 hodin při teplotách 4 °C až 25 °C. Vzorky je možné také alespoň jednou zamrazit (při teplotě ≤ -70 °C). Pokud chcete používat jiné odběrové sady, jejich použití konzultujte se zástupcem výrobce této soupravy, nikdy nepoužívejte sady, které obsahují inaktivační roztoky pro stabilizaci RNA nebo DNA.

V případě slin je nutné vzorek nejprve tepelně inaktivovat, tím se jednak sníží infekčnost vzorku, jednak se zvýší citlivost detekce. Pokud máte sliny ve zkumavkách z odběrových sad DIANA Biotechnologies, tak zašroubované zkumavky naskládejte do 96-jamkového stojánku („racku“, DB-1228 nebo DB-1240) tak, aby zaplnily každou druhou řádku (do každého racku se vejde 48 vzorků). Následně umístěte do inkubátoru s nuceným oběhem vzduchu předehřátého na 90 °C na 30 minut (nikdy nepřekračujte 60 minut). Tepelná inaktivace slin byla validována pro inkubátor o vnitřním objemu 60 L a doporučený postup je následovný: do inkubátoru nejprve vložte minimálně dvě litrové (případně čtyři půllitrové) lahve naplněné vodou a ponechte je vytemperovat po dobu 4 hod a až poté inkubátor používejte pro inaktivaci vzorků (takto se udrží stejné podmínky pro všechny vzorky bez ohledu na jejich počet). Do inkubátoru vkládejte najednou maximálně 8 napůl naplněných racků, tj. 384 vzorků. Pokud používáte jiné odběrové sady nebo inkubátor o jiném vnitřním objemu, pak je sliny nutné inaktivovat tak, aby vzorek byl po dobu alespoň 10 minut zahřátý na 80 °C. Toho můžete dosáhnout například přenesením 50 µL vzorku do PCR destičky či jiných mikrozkuvek a inkubací alespoň 10 minut při 80 °C v termálním cyklu (lze použít i jiné zkumavky vložené do termobloku, nepřekračujte 30 minut při 80 °C). Je na uživateli, aby postup tepelné inaktivace pro jiné odběrové sady nebo inkubátor o jiném vnitřním objemu řádně zvalidoval. Po inaktivaci vzorky zchladte na pokojovou teplotu, buď ponechte dalších 30 minut při 25 °C, nebo 10 minut ve 4 °C – bez zchlazení není možné vzorky pipetovat. Po inaktivaci není nutné sliny ihned otestovat, virová RNA je v nich stabilní dalších až 72 hodin při 25 °C.

Před pipetováním sliny stočte po dobu 1 až 2 minut na 100 až 200 g, to by mělo postačit na stočení slin z víčka a závitu víčka a usnadnit pipetování stočením největšího precipitátu či jiné debris ve slinách. Delší stáčení či stáčení s vyšší rychlostí může vést ke ztrátě citlivosti detekce.



Vzorky nosohltanových stěrů

Pro stěry používejte odběrové sady obsahující běžná transportní média (viz kapitola 1.4), inaktivační média nejsou vhodná. Stěry v transportním médiu doporučujeme skladovat dle instrukcí výrobce daného média.

Souprava byla validována pro řadu médií (více viz kapitola 1.4, pro aktuální list kontaktujte zástupce výrobce této soupravy). Je zodpovědností uživatele použití soupravy validovat pro každé další médium, které nebylo validováno výrobcem. Pro použití soupravy s konkrétním typem média je nutné vždy validovat porovnáním výsledků detekce virových RNA v pozitivních vzorcích v daném médiu pomocí RT-PCR po izolaci RNA a pomocí přímé detekce ve vzorcích s použitím této soupravy. Je vhodné otestovat přinejmenším 10 pozitivních vzorků a alespoň několik z nich by mělo být slabě pozitivních s Ct > 30.

U vzorků nosohltanových stěrů je vyžadována tepelná inaktivace, která přispívá ke zvýšení citlivosti detekce a snížení infekčnosti vzorku. Pro nasofaryngeální stěry a jiné vzorky stěrů v transportních médiích doporučujeme tepelnou inaktivaci v PCR cyklu. Přeneste 50 µl vzorku z primární odběrové zkumavky do PCR destičky, PCR stripu či jiných mikrozkušavek kompatibilních s vaším PCR cyklem. Inkubujte 5 minut při teplotě 80 °C v PCR cyklu.

Alternativou k inaktivaci v PCR cyklu je inaktivace v termobloku. V takovém případě použijte následující postup: přeneste 200 µl vzorku z primární odběrové zkumavky do 1,5 ml mikrozkušavky typu „Eppendorf“ a inkubujte 10 minut při teplotě 80 °C v termobloku.

Popsaný alternativní postup tepelné inaktivace v termobloku nebyl validován na klinických vzorcích a vychází z měření teplotního profilu uvedeného objemu, času a teploty v termoblocích Eppendorf Thermomixer C 5382 a Biosan Thermo-Shaker TS-100 vztaženého na výsledky validačních dat z tepelné inaktivace v PCR cyklu. Proces inaktivace v termobloku, zejména při použití jiného termobloku a/nebo jiného transportního média, než je uvedeno v kapitole 1.4, je nutné validovat.

V obou případech nikdy nepřekračujte dobu ani teplotu inkubace. Po inaktivaci vzorky zchladte na pokojovou teplotu, jinak může být obtížné je pipetovat. V případě potřeby před pipetováním stěry stočte po dobu 1 až 2 minut na 100 až 200 g. Delší stáčení či stáčení s vyšší rychlostí může vést ke ztrátě citlivosti detekce. Příliš vysoká teplota a/nebo příliš dlouhá doba inaktivace může vést ke snížení citlivosti (v důsledku precipitace).

Některá odběrová média mohou během tepelné inaktivace precipitovat. V případě precipitace odběrového média při 80 °C, které se projeví nižší citlivostí detekce, je alternativně možné provést inaktivaci při nižší teplotě a to následovně:

- PCR cykler - 50 µl vzorku inaktivujte při 65 °C po dobu 15 minut.
- Termoblok - 200 µl vzorku inaktivujte při 70 °C po dobu 15 minut.

5.6 Příprava RT-PCR master mixu

Příprava RT-PCR master mixu pro jednu reakci je popsána níže. Pokud připravujete RT-PCR master mix pro více reakcí, vynásobte objemy počtem reakcí (a připočtete pipetovací rezervu) – viz také **Tabulka 12**.

1. Rozmrazte a promíchejte všechny složky RT-PCR master mixu (viz **Tabulka 12** a kapitola 4.4).



2. Do čisté RNase/DNase free vialky napipetujte **5 µL Enhancer mixu (4x)**, v soupravě vialka **č. 1 (zelené ● nebo průhledné víčko)**.
3. Do stejné vialky přidejte **5 µL Primer mixu (4x)**, v soupravě vialka **č. 2 (modré ● nebo průhledné víčko)** a promíchejte opakovaným pipetováním.
4. Do stejné vialky přidejte **5 µL Enzyme mixu (4x)**, v soupravě vialka **č. 3 (černé ● nebo průhledné víčko)**, a promíchejte opakovaným pipetováním, dokud není směs homogenní (můžete také použít vortex a krátce stočit).
5. Přeneste **15 µL směsi (RT-PCR master mix)** do 96-jamkové destičky nebo do mikrozkušavek (dle typu použitého PCR cyklu). Pokud nemůžete hned pokračovat s přidáním vzorků a následným RT-PCR, tak destičky/mikrozkušavky přikryjte víčkem (podrobnosti ke stabilitě jednotlivých složek soupravy a RT-PCR mixu viz kapitola 4.5).

Pro automatizovanou přípravu destičky s RT-PCR mixem a přidání vzorků je potřeba mrtvý objem. Celkový objem reakce i objem vzorků je proto možné o 10 % zmenšit oproti hodnotám uvedeným v kapitolách 5.6 a 5.7 bez ovlivnění citlivosti detekce.

Tabulka 12: Příprava RT-PCR master mixu

Složky soupravy	Č. a barva víčka*	µL na 1 reakci	µL na 100 reakcí
Enhancer mix (4x)	1	5	500
Primer mix (4x)	2	5	500
Enzyme mix (4x)	3	5	500
Celkový objem RT-PCR master mix		15	1500

*Číslování vialek odpovídá pořadí přidávání jednotlivých složek, je důležité toto pořadí zachovat.

Alikvotování roztoků pro přípravu RT-PCR master mixu

Počty a objemy alikvotů jednotlivých složek této soupravy pro 1000 testů (1000rxns) jsou shrnuty v **Tabulce 11**. Pokud nechcete použít celou soupravu najednou, je vhodné si po prvním rozmrazení připravit jednorázové alikvoty. Pro přípravu jednorázových alikvotů pro analýzu 96 vzorků (např. s využitím pipetovací stanice Agilent Bravo a souprav DB-1222 nebo DB-1226) postupujte takto:

Od každého z roztoků Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x) připravte **10 alikvotů po 510 µL a zamrazte co nejdříve při teplotě -70 °C nebo nižší**. Pro přípravu RT-PCR master mixu pro analýzu 96 vzorků poté smíchejte vždy po jednom alikvotu od každé komponenty a vzniklý RT-PCR mix použijte celý. Podrobnosti ke stabilitě a skladování jsou uvedeny v kapitole 4.5.

Alternativně můžete připravit hotový RT-PCR master mix smícháním těchto tří složek a po promíchání připravte **10 alikvotů po 1530 µL, zamrazte co nejdříve při teplotě -70 °C nebo nižší a do měsíce spotřebujte**. Tento mix už znovu nepřemrazujte, spotřebujte vždy celý alikvot.

5.7 Přidání vzorku a externí kontroly do RT-PCR reakce

Vzorky slin

Přidejte 2 µL vzorku tepelně inaktivovaných a stočených slin do jamek/mikrozkušavek, které obsahují 15 µL RT-PCR master mixu, a během přidávání vzorku vypláchněte špičku opakovaným nasátím a vypuštěním kapaliny v jamce/mikrozkušavce. Pokud se ve slinách při inaktivaci vytvořil precipitát, tak se snažte nabrat kapalinu nad tímto precipitátem. Vizualně zkontrolujte, že sliny byly nejprve do špičky nabrány a následně vypuštěny. Další míchání reakční směsi není nutné.



Následně přidejte **3 µL RNA z vialky External control (vialka č. 5, fialové víčko ●)** a vypláchněte špičku opakovaným nasátím a vypuštěním kapaliny v jamce/mikrozkumavce. Externí kontrolu vždy přidejte až po vzorku. Další míchání reakční směsi není nutné.

Tyto objemy jsou vhodné pro manuální i automatizované pipetování, je ale možné pro zvýšení citlivosti detekce přidat i větší objem vzorku a menší objem kontroly: **4 µL vzorku a 1 µL externí kontroly**. Pokud přidáváte vzorky a kontroly automatizovaně, nastavte pipetovací program tak, aby vzorek i kontrola byly hned po přidání promíchány s RT-PCR mixem.

Vzorky nosohltanových stěrů

Přidejte 2 µL tepelně inaktivovaného vzorku stěru do jamek/mikrozkumavek, které obsahují 15 µL RT-PCR master mixu, a během přidávání vzorku vypláchněte špičku opakovaným nasátím a vypuštěním kapaliny v jamce/mikrozkumavce. Vizuálně zkontrolujte, že vzorek byl nejprve do špičky nabrán a následně vypuštěn. Další míchání reakční směsi není nutné.

Následně přidejte **3 µL RNA z vialky External control (vialka č. 5, fialové víčko ●)** a vypláchněte špičku opakovaným nasátím a vypuštěním kapaliny v jamce/mikrozkumavce. Externí kontrolu vždy přidejte až po vzorku. Další míchání reakční směsi není nutné.

Tyto objemy jsou vhodné pro manuální i automatizované pipetování. Pokud přidáváte vzorky a kontroly automatizovaně, nastavte pipetovací program tak, aby vzorek i kontrola byly hned po přidání promíchány s RT-PCR mixem.

Podobně jako u slin je možné i u stěrů pro zvýšení citlivosti přidat větší objem vzorku a menší objem kontroly (4 µL vzorku a 1 µL externí kontroly). Nicméně některá média mohou v tomto objemu RT-PCR stanovení částečně inhibovat a pokud chcete používat tento zvýšený objem, tak kontaktujte zástupce výrobce pro konzultaci, zda je vámi používané médium vhodné, a validujte postup na pozitivních vzorcích v konkrétním médiu.

Obecné postupy a použití kontrol



Externí kontrola musí být vždy přidána do každé jamky s každým vzorkem, protože pokud by došlo k inhibici RT-PCR reakce vzorkem, tak tato kontrola tuto inhibici odhalí. Pro správnou funkci musí být externí kontrola vždy přidána až po přidání vzorku, nikoliv naopak.

Po přidání vzorků a externí kontroly do 96-jamkové destičky ji zalepte adhezivní optickou fólií a spusťte RT-PCR reakci (do 60 minut od přidání vzorků), jak je popsáno v kapitole 5.8.



Každá destička musí obsahovat alespoň jednu pozitivní a jednu negativní kontrolu. Součástí soupravy jsou nicméně dvě pozitivní kontroly (Positive control A a Positive control B, vialky č. 4A a 4B) a je doporučeno používat pro každou destičku obě tyto kontroly. V případě pozitivní kontroly přidejte místo vzorku **2 nebo 4 µL Positive control z vialky č. 4A nebo 4B (červené víčko ●)**. V případě negativní kontroly přidejte místo vzorku **2 nebo 4 µL Negative control z vialky č. 6 (PCR grade water, bílé víčko ○)**. Následně přidejte do jamek s pozitivní i negativní kontrolou **1 nebo 3 µL External control z vialky č. 5 (fialové víčko ●)**. Objemy pozitivní, negativní a externí kontroly zvolte stejné, jako jste zvolili u vzorků. Celkový objem reakce po přidání vzorku a kontrol je 20 µL.



Na každé destičce doporučujeme také kontrolu známého pozitivního klinického vzorku ve stejném médiu jako ostatní vzorky, či stejného biologického typu vzorku (např. sliny). Doporučujeme takovou kontrolu rozalíkovat a používat opakovaně (kontrola není součástí soupravy).



Pro automatizovanou přípravu destičky s RT-PCR mixem a přidání vzorků je potřeba mrtvý objem. Celkový objem reakce i objem vzorků je proto možné o 10 % zmenšit oproti hodnotám uvedeným v kapitolách 5.6 a 5.7 bez ovlivnění citlivosti detekce.

5.8 Protokol RT-PCR

Zde popsáný RT-PCR protokol k této soupravě byl validován na přístrojích **BioRad CFX96™** a **BioRad CFX Opus 96**, jejichž nastavení je identické. Lze jej použít také s jinými přístroji, které jsou schopné současné detekce v kanálech FAM, HEX, Texas Red (TEX) a Cy5, je však na uživateli, aby provedl správné nastavení přístroje a ověřil fungování soupravy s využitím vhodných kontrol. Návod pro nastavení RT-PCR protokolu a detekce v příslušných kanálech naleznete v uživatelské příručce příslušného přístroje.

5.8.1 Nastavení přístrojů BioRad CFX96™ a BioRad CFX Opus 96

Pro detekci ve čtyřech kanálech použijte výchozí nastavení přístrojů a nastavení filtrů dle **Tabulky 13**.

Tabulka 13: Nastavení filtrů pro RT-PCR detekci na přístrojích BioRad

Fluorophores	Excitation (nm)	Detection (nm)
FAM	450-490	515-530
HEX	515-535	560-580
Texas Red (TEX)*	560-590	610-650
Cy5	620-650	675-690

* V závorce je uvedena zkratka fluoroforu tak, jak je uváděna zde v textu, před závorkou pak název fluoroforu tak, jak je popsán v CFX Maestro software.

Program se skládá ze 4 kroků:

1. Reverzní transkripce virové RNA (RT step)
2. Aktivace Taq polymerázy (Denature)
3. PCR amplifikace (45 cyklů; Cycling)
4. Ochlazení destičky (Cooling)

Nastavení cílové teploty a načasování každého kroku je uvedeno v **Tabulce 14**.

Objem vzorku „sample volume“ nastavte na 20 µL.

Tabulka 14: Protokol pro RT-PCR detekci na přístrojích BioRad

Variable	RT step	Denature	Cycling		Cooling
Cycles	1	1	45		1
Temperature (°C)	50	95	95	60	40
Hold time (hh:mm:ss)	00:10:00	00:02:00	00:00:05	00:01:00	00:00:30
Plate read	NO	NO	NO	YES	NO

Přibližná délka tohoto protokolu na přístrojích BioRad je 1 hod a 40 minut.

5.9 Analýza dat

5.9.1 Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (Ct)

Provedte analýzu dat dle návodu k obsluze vašeho RT-PCR přístroje. Pro zobrazení fluorescencí doporučujeme používat logaritmické zobrazení a doporučujeme používat barevnou kompenzaci mezi kanály FAM a HEX, pokud ji váš stroj nabízí. Nižší uvádíme doporučené hodnoty thresholdů



(prahů fluorescence) pro vybrané přístroje, avšak v případě potřeby jejich hodnotu upravte tak, aby thresholdy při logaritmickém zobrazení protínaly křivky v jejich lineární části (neplatí pro lineárně zobrazené křivky) a zároveň aby byl threshold vždy nad pozadím u všech negativních vzorků. Úprava thresholdů může být vyžadována buď vyšší autofluorescencí vzorků (zejména slin), a tím pádem vyšším pozadím, nebo rozdíly mezi jednotlivými přístroji (buť od stejného výrobce).

Pro BioRad CFX96™ a BioRad CFX Opus 96 doporučujeme použít výchozí nastavení pro snímání kanálů FAM, HEX, Texas Red (TEX) a Cy5. Pro určení hodnot Ct použijte výchozí metodu Single Threshold mode* s **manuálně zvolenými thresholdy: 200 RFU pro FAM i HEX a 100 RFU pro TEX a Cy5**. Protože biologické vzorky mohou v PCR autofluoreskovat, tak může být nutné manuálně zvolené thresholdy navýšit oproti výše uvedeným hodnotám. **Všechny hodnoty Ct uváděné v kapitolách 5.9.2 a 5.9.3 odpovídají vyhodnocení s výše uvedenými thresholdy.**

Naměřená data je v každém případě nutné vizuálně zkontrolovat, protože v důsledku použití prahové fluorescence pro výpočet Ct může dojít k nesprávnému vyhodnocení křivek. Metoda Single Threshold mode může například v důsledku neobvyklého tvaru křivky vyhodnotit negativní vzorek jako pozitivní – např. při skokovém nárůstu fluorescence v důsledku bubliny v reakční směsi atd. Všechny křivky se strmým a trvajícím nárůstem fluorescence musí být vyhodnoceny jako pozitivní (standardní vzhled křivek viz kapitola 5.9.4), zatímco ostatní křivky musí být vyhodnoceny jako negativní (vzhled problematických křivek je popsán v kapitole 5.9.3 pod **Tabulkou 15**). U strojů BioRad pozorujeme cca 2% přesvit fluorescence z kanálu FAM do HEX, v případě vysoké fluorescence ve FAM (fluorescence FAM může dosáhnout hodnot RFU i přes 10 000) tak může být chybně vyhodnocen jako pozitivní kanál HEX, i když by se jednalo pouze o přesvit. Doporučujeme proto pro jamky, ve kterých je fluorescence ve FAM vyšší než 5 000 RFU použít threshold pro HEX alespoň 300 RFU (namísto 200 RFU).

Získané hodnoty Ct se budou lišit v závislosti na použitém RT-PCR přístroji, metodě vyhodnocení a nastavení thresholdů. Hodnoty Ct tak nelze použít pro srovnání vzorků, pokud byly analyzovány v jiném běhu. Pro ilustraci, pozadí u strojů BioRad je typicky výrazně nižší než výše doporučené prahové fluorescence, a pokud nastavíte tento práh těsně k hodnotě pozadí, pak můžete dostat hodnoty Ct i o 3 až 5 cyklů nižší než s doporučenými prahy. Nevýhodou takto nízko nastavených prahů je náchylnost k falešně pozitivní interpretaci jamek s autofluoreskujícími vzorky nebo při přesvitu z jiného kanálu. Naopak, pokud nastavíte prahovou fluorescenci vysoko, tak můžete získat hodnoty Ct i o 3 až 5 cyklů vyšší a s minimálním rizikem falešně pozitivní interpretace, avšak můžete minout slabě pozitivní vzorky, které nedosáhnou této prahové fluorescence (maximální fluorescence vzorků se v jednotlivých kanálech pohybuje typicky mezi 1 000 a 10 000 RFU jednotek). Proto doporučujeme výše uvedené hodnoty jako prahové fluorescence. Hodnoty Ct ale nejsou přesně porovnatelné ani mezi různými měřeními na stejném typu přístroje a se stejně zvoleným thresholdem: z naší zkušenosti se naměřené fluorescence mezi různými běhy nebo různými přístroji BioRad liší až dvojnásobně.

Veškeré očekávané hodnoty Ct uvedené níže u vyhodnocení kontrol a v **Tabulce 15** předpokládají dodržení návodu (např. přidané objemy komponent) a výše popsaného nastavení BioRad přístrojů (metoda Single Threshold mode s manuálně nastavenými thresholdy). V případě použití jiného nastavení či jiné metody je pro přesnou interpretaci podle **Tabulky 15** nutné naměřené hodnoty Ct posunout o rozdíl mezi vámi určenou hodnotou Ct pozitivní kontroly a referenční hodnotou Ct = 29 (pro kanály FAM, HEX i TEX)**. Například, pokud vámi určená hodnota Ct pro pozitivní kontrolu bude 25, tak pro aplikaci **Tabulky 15** buď přičtete 4 cykly k hodnotám Ct klinických vzorků, anebo 4 cykly odečtete od prahových Ct v **Tabulce 15**.

* Metoda je také nazývána Threshold Crossing, Cycle Threshold nebo Fit Points, kde hodnota Ct odpovídá cyklu, kde fluorescence vzroste nad úroveň pozadí a překračuje předem stanovenou prahovou hodnotu.

**V případě přidání 2 μ L pozitivní kontroly do reakce, v případě přidání 4 μ L budou referenční cykly o jedna nižší.



5.9.2 Vyhodnocení kontrol

U **pozitivní kontroly** musí k amplifikaci dojít ve třech kanálech: virových genů ve FAM, HEX a TEX (v závislosti na použitém plastiku, cyklu a objemu vzorku jsou pro tyto kanály očekávané Ct hodnoty v rozmezí 26-33 cyklů). Pokud nedojde k amplifikaci v některém z těchto kanálů (tzn. že v některém z těchto kanálů bude Ct >35), PCR reakce neproběhla správně a výsledky z takové analýzy nejsou platné a musí být zopakovány. Pro určení hodnot Ct použijte výše popsané nastavení thresholdů v metodě Single Threshold mode. Amplifikace externí kontroly v Cy5 by měla vést k Ct <33 cyklů, avšak pro správné vyhodnocení pozitivní kontroly to není nutné.

U **negativní kontroly** musí dojít k amplifikaci externí kontroly v kanálu Cy5 (<33 cyklů), zatímco v ostatních kanálech nesmí být žádná amplifikace. Měřitelná amplifikace v kanálech FAM, HEX, TEX nebo Cy5 ukazuje na možnou kontaminaci reagensů templátem, což může způsobit falešně pozitivní výsledky. V takovém případě je nutné otestovat větší počet negativních kontrol.



Externí kontrola musí být vyhodnocena u každého vzorku: porovnejte hodnotu Ct v kanále Cy5 u negativní kontroly s Ct každého vzorku. U pozitivních vzorků může být amplifikace externí kontroly negativně ovlivněna amplifikací virových genů a Ct hodnoty v kanále Cy5 mohou být výrazně vyšší, případně pod thresholdem. Pokud test vyhodnocujete pouze kvalitativně, **pozitivní vzorky jsou považovány za pozitivní i v případě, že nevyjde externí kontrola**. U vzorků, které jsou v kanálech FAM, HEX a TEX negativní anebo s Ct > 37, je nutné porovnat hodnoty Ct v Cy5 u vzorku a kontrol. V případě, že je Ct v Cy5 u vzorku oproti kontrolám nižší nebo stejná, pak nedochází k žádné inhibici RT-PCR a citlivost detekce virové RNA není vzorkem negativně ovlivněna. V případě, že je Ct v Cy5 u vzorku oproti kontrolám vyšší, tak úměrně rozdíl lze kvantifikovat rozsah inhibice RT-PCR (externí kontrola je výrazně náchylnější na inhibici či degradaci než virová RNA, takže posun v Ct u virových kanálů bude vždy menší nebo maximálně stejný); např. pokud je Ct v Cy5 u vzorku o jeden cyklus vyšší, pak je inhibice až 50%, tzn. snížení analytické citlivosti detekce virové RNA až dvojnásobně. Pokud je Ct v Cy5 u vzorku vyšší o cca 3.3 cykly, pak může být analytická citlivost v takovém vzorku až desetkrát nižší (nejnižší detekované množství viru může být až desetkrát vyšší, při této a vyšší inhibici může dojít k falešně negativnímu výsledku v tomto vzorku, pokud by Ct pro virové kanály v neinhibované reakci bylo vyšší než cca 35). U vzorků, které mají Ct v Cy5 kanálu vyšší o cca 6.6 cyklů, tak analytická citlivost stanovení může být až 100x nižší.

Doporučujeme vyloučit výsledky vzorků s Ct v Cy5 o více jak 4 cykly vyšší oproti kontrole, a změřit tyto vzorky buď v menším objemu (např. namísto 4 µL stěrů pouze 2 µL), anebo alternativním způsobem s izolací RNA před RT-PCR. Frekvence inhibovaných vzorků by v případě slin neměla být vyšší než 0.5 % a v případě stěrů by měla být prakticky nulová. V případě inhibice u vzorků slin pipetovaných automatizovaně obvykle pomůže přeměření, ve kterém se vzorek přidá manuálně s vizuální kontrolou, že se nepřidal precipitát z inaktivace.

5.9.3 Interpretace výsledků měřených vzorků

Stanovte hodnoty prahového detekčního cyklu (Ct) v každém kanálu a výsledky interpretujte dle **Tabulky 15** a dle výsledků vyhodnocení pozitivní kontroly. V případě, že používáte doporučený postup pro určení Ct a vámi získané hodnoty Ct pro pozitivní kontrolu odpovídají mezím uvedeným v předchozím oddíle (tj. Ct pro kanály FAM, HEX i TEX jsou mezi 26. a 33. cyklem), můžete interpretovat naměřená Ct dle této tabulky bez dalších přepočtů Ct. V opačném případě je nutno stanovené Ct před interpretací dle **Tabulky 15** přepočítat, jak je uvedeno výše v kapitole 5.9.1.



Tabulka 15: Interpretace výsledků

Symbol „-“ v kanálech FAM, HEX a TEX značí Ct > 40 cyklů nebo nedetekovatelný signál; **symbol „-“** v kanále Cy5 pro externí kontrolu značí Ct ve vzorku o 4 a více cyklů vyšší než v negativní kontrole nebo nedetekovatelný signál; **symbol „+“** v kanále Cy5 značí Ct ve vzorku maximálně o 4 cykly vyšší než v negativní kontrole. V kanále FAM je detekován SARS-CoV-2, v HEX Influenza A/B, v TEX RSV a v Cy5 Externí kontrola. Hodnoty Ct, které jsou uvedené v této tabulce, předpokládají analýzu na strojích BioRad za vyhodnocení dle výše popsaného postupu a nastavení thresholdů (viz kapitoly 5.8.1 a 5.9.1).

FAM [7,8]	HEX [6,7,8]	TEX [7,8]	Cy5	Interpretace
Ct < 37	-	-	+ [1] / - [2]	SARS-CoV-2 pozitivní [5]
-	Ct < 37	-	+ [1] / - [2]	Influenza A/B pozitivní [5]
-	-	Ct < 37	+ [1] / - [2]	RSV pozitivní [5]
Ct 37–40 [3]	-	-	+ [1]	Slabě pozitivní pro SARS-CoV-2 , opakovat pro potvrzení [5]
-	Ct 37–40 [3]	-	+ [1]	Slabě pozitivní pro Influenza A/B , opakovat pro potvrzení [5]
-	-	Ct 37–40 [3]	+ [1]	Slabě pozitivní pro RSV , opakovat pro potvrzení [5]
Ct 37–40 [3]	-	-	-	Slabě pozitivní pro SARS-CoV-2 , inhibice RT-PCR, opakovat pro potvrzení [4,5]
-	Ct 37–40 [3]	-	-	Slabě pozitivní pro Influenza A/B , inhibice RT-PCR, opakovat pro potvrzení [4,5]
-	-	Ct 37–40 [3]	-	Slabě pozitivní pro RSV , inhibice RT-PCR, opakovat pro potvrzení [4,5]
Ct < 40	Ct < 40	-	+ [1] / - [2]	Příklad koinfekce dvou virů (SARS-CoV-2 a Influenza A/B) [5,6,9]
Ct < 40	Ct < 40	Ct < 40	+ [1] / - [2]	Příklad koinfekce více virů (SARS-CoV-2, Influenza A/B a RSV) [5,6,9]
-	-	-	+ [1]	Nedetekovatelné (negativní) pro vše (SARS-CoV-2, Influenza A a B a RSV) [5]
-	-	-	-	Nespolehlivý výsledek: inhibice RT-PCR, zopakovat nebo provést izolaci RNA.

[1] Při přidání 1 µL externí kontroly do reakce je hodnota Ct v kanálu Cy5 okolo 29. až 30. cyklu, v případě přidání 3 µL externí kontroly je hodnota Ct v kanálu Cy5 okolo 28. cyklu.

[2] Vysoké koncentrace virové RNA detekované v kterémkoliv kanále mohou způsobit zhoršení amplifikace externí kontroly, což se projeví snížením signálu v kanálu Cy5 či jeho úplnou absencí (podrobnosti viz **Obrázek 3**). Absence signálu v Cy5 nemění interpretaci pozitivních signálů ve FAM, HEX nebo TEX.

[3] Jakoukoliv amplifikaci ve FAM, HEX nebo TEX s Ct < 40. cyklus lze považovat za pozitivní výsledek, avšak pokud je Ct vyšší než 37. cyklus, pak je nutné pro potvrzení test zopakovat (se stejným vzorkem pro vyloučení náhodné kontaminace anebo s novým odběrem pro potvrzení klinické relevance). Opakovaně pozitivní výsledek v daném kanále je považován za pozitivitu na daný virus.

[4] V případě, že je Ct v kanálech FAM, HEX nebo TEX vyšší než 37. cyklus a zároveň je pozorována inhibice v Cy5 kanále o více jak 4 cykly, pak je nutné test opakovat, protože došlo k inhibici RT-PCR. Nebo je možné provést standardní stanovení po izolaci RNA prostřednictvím jiné soupravy (například DB-1252). Opakovaně pozitivní výsledek v daném kanále je považován za pozitivitu na daný virus.

[5] Negativita v jakémkoliv kanálu nesmí být použita jako jediné vodítko pro vyloučení infekce daným virem. Zejména pokud je nějaký z jiných kanálů pozitivní, může docházet k oslabení citlivosti detekce v ostatních kanálech. Přestože tato souprava dokáže detekovat koinfekce dvěma nebo více viry najednou, tak při silném



signálu ve FAM (~20. cyklus) byly virové RNA v ostatních kanálech detekované až v koncentraci 50x LOD a i tak jen s nízkou fluorescencí; naproti tomu v případě silného signálu v kanálech HEX nebo TEX (~25. cyklus) nebyla detekce SARS-CoV-2 ovlivněna ani při 3x LOD, a slabá koinfekce SARS-CoV-2 by tak měla být spolehlivě detekována.

[6] Pro interpretaci koinfekce Influenza A/B a SARS-CoV-2 je nutné vyloučit přesvit z FAM do HEX (vyloučit křivky s maximálním RFU v HEX do 300 v případě, že ve FAM je fluorescence více jak 5000 RFU).

[7] V jakémkoliv kanále může docházet k pozvolnému nárůstu signálu i v negativních vzorcích, nicméně typicky s $C_t > 30$ a s koncovou fluorescencí maximálně 100-200 RFU. Může být nutné zvýšit threshold příslušného kanálu pro vyloučení těchto křivek. Tyto „neamplifikační“ křivky je možné spolehlivě odhalit vizuální kontrolou jejich tvaru: mají zcela jiný tvar oproti standardním amplifikačním křivkám, kdy jim chybí postupný exponenciální nárůst z nízkého pozadí a koncové plató.

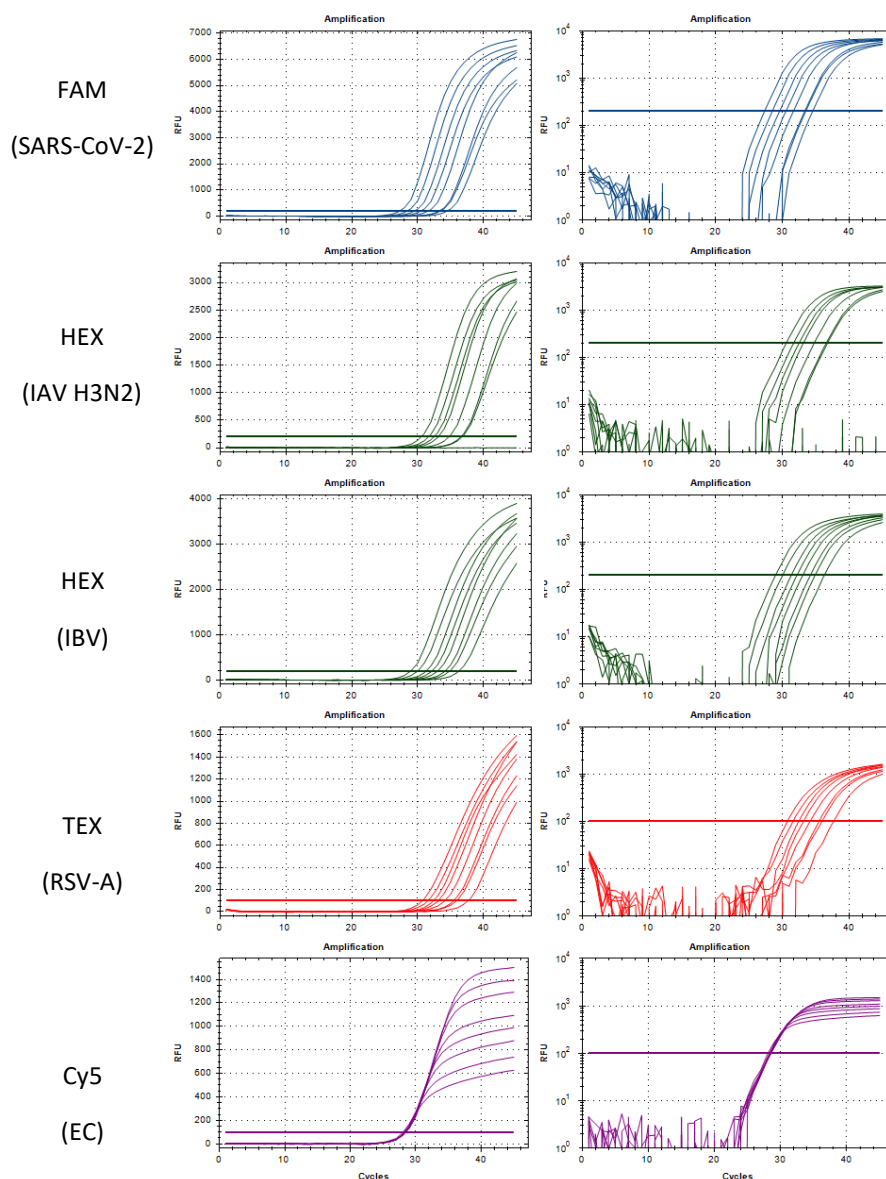
[8] V jakémkoliv kanále může dojít k autofluorescenci vzorku projevující se vysokou fluorescencí od brzkých cyklů PCR protokolu, typicky s $C_t < 10$ a s koncovou fluorescencí v řádu stovek RFU. Nejčastěji se autofluorescence vyskytují v kanále TEX. U slin navíc může u některých vzorků dojít ke zvýšení pozadí fluorescence a je tak nutné upravit threshold jak pro virové kanály (FAM, HEX a TEX), ale i pro externí kontrolu v Cy5.

[9] V případě, že je C_t v jakémkoliv z kanálů FAM, HEX nebo TEX mezi 37. až 40. cyklem, pak je nutné pro potvrzení positivity v daném kanále test zopakovat (pokud je test zároveň pozitivní v jiném kanále s $C_t < 37$, pak pozitivitu v tomto kanále není nutné potvrzovat opakováním; test opakujte se stejným vzorkem pro vyloučení náhodné kontaminace anebo s novým odběrem pro potvrzení klinické relevance). Opakovaně pozitivní výsledek ($C_t \leq 40$) v daném kanále je považován za pozitivitu na daný virus.



5.9.4 Typické výsledky

Na **Obrázku 3** jsou vyobrazena ilustrativní data naměřená s ředící řadou virové RNA se soupravou DB-1253.



Obrázek 3: Detekce ředící řady virových RNA v množství od 1 000 do 5 kopií v jamce na přístroji BioRad CFX96™

První dvojice grafů ukazuje amplifikaci signálu v kanálu FAM (SARS-CoV-2), druhá a třetí v HEX (Influenza A H3N2 a Influenza B), čtvrtá v TEX (RSV-A) a pátá v Cy5 (externí kontrola). Grafy vlevo ukazují fluorescenci v lineárním měřítku, zatímco grafy vpravo ukazují fluorescenci v logaritmickém měřítku. Koncové fluorescence (RFU) i tvary křivek se mohou lišit mezi jednotlivými kanály/esejemi. Amplifikace v kanále Cy5 je snížena při vysokých titrech virové RNA (křivky se snižující se maximální fluorescencí odpovídají jamkám se vzrůstajícím množstvím virových RNA). **Použitý materiál:** FrameStar 96 Well Semi-Skirted PCR plate (4ti-0951, white wells) a LightCycler 480 Sealing Foil (04729757001).

6 Právní upozornění

V plném rozsahu povoleném zákony vaší jurisdikce, je DIANA Biotechnologies, a.s., 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 s DBdirect™ Respiratory panel 2: SARS-CoV-2/Flu/RSV kitem a jeho použitím.

7 Seznam kompatibilních prostředků

- REF** DB-1224 Bravo Installation Package for Dbdirect™
- REF** DB-1222 Dbdirect™ Bravo Extension Kit for Swab
- REF** DB-1226 Dbdirect™ Bravo Extension Kit for Saliva 1.4IM
- REF** DB-1225 Saliva Collection Set 1.4IM
- REF** DB-1230 Saliva Collection Set 1.4IF
- REF** DB-1228 Sample rack 1.4IM
- REF** DB-1240 Sample rack 1.4IF



8 Jednostránkový souhrnný protokol

8.1 Složky soupravy

Složky soupravy	Objem (μL)		Skladovací teplota	Popis vialek
	100rxns	1000rxns		
Enhancer mix (4x)	500	5000	≤ -18 °C	1
Primer mix (4x)	500	5000	≤ -18 °C	2
Enzyme mix (4x)	500	5000	≤ -70 °C	3
Positive control A	150	2x 750	≤ -18 °C	4A
Positive control B	150	2x 750	≤ -18 °C	4B
External control	500	5000	≤ -18 °C	5
Negative control	150	2x 750	≤ -18 °C	6

8.2 Příprava RT-PCR

- Po rozmrazení všechny složky promíchejte, každou vialku před otevřením stočte.
- V následujícím pořadí smíchejte: 5 μL Enhancer mixu (vialka č. 1), 5 μL Primer mixu (vialka č. 2) a 5 μL Enzyme mixu (vialka č. 3). Promíchejte po přidání každé složky.
- Přeneste 15 μL tohoto RT-PCR master mixu do 96-jamkové destičky, přidejte 2 μL nebo 4 μL slin (po tepelné inaktivaci) nebo 2 μL stěru (po tepelné inaktivaci; pro 4 μL stěru nutná předchozí validace), poté doplňte do 20 μL externí kontrolou (vialka č. 5): 3 μL respektive 1 μL, následně zalepte destičku optickou fólií a co nejdříve spusťte RT-PCR reakci.
- Pro pozitivní a negativní kontrolu přidejte místo vzorku stejný objem pozitivní (vialka č. 4A nebo 4B) anebo negativní kontroly (PCR voda; vialka č. 6) a doplňte externí kontrolou do 20 μL.

Tabulka shrnující objemy jednotlivých složek RT-PCR master mixu potřebné pro 1 a 100 reakcí:

Složky soupravy	Popis	μL na 1 reakci	μL na 100 reakcí
Enhancer mix (4x)	1	5	500
Primer mix (4x)	2	5	500
Enzyme mix (4x)	3	5	500
Celkový objem RT-PCR master mixu		15	1500

8.3 Protokol RT-PCR















Tabulka sumarizující nastavení RT-PCR cyklu:

Variable	RT step	Denature	Cycling		Cooling
Cycles	1	1	45		1
Temperature (°C)	50	95	95	60	40
Hold time (hh:mm:ss)	00:10:00	00:02:00	00:00:05	00:01:00	00:00:30
Plate read	NO	NO	NO	YES	NO

Snímání musí být nastaveno pro současnou detekci kanálů FAM, HEX, TEX a Cy5. Postup pro nastavení detekce naleznete v kapitole 5.8 a v návodu příslušného přístroje.



9 Použité grafické symboly

	Manufacturer / Výrobce
	Caution / Pozor (výstraha)
	Lot Number / Kód dávky
	Operator's manual, operating instructions / Čtěte návod k použití
	Catalogue Number / Katalogové číslo
	Component volume / Objem komponenty
	Package contains / Balení obsahuje
	Positive control / Pozitivní kontrola
	Negative control / Negativní kontrola
	Upper limit of temperature / Horní mez teploty* (*pro X odpovídající konkrétní teplotě)
	Use by date / Použít do data
	Amount (No. of reactions) / Obsah postačuje pro <n> testů** (**pro n testů dle varianty kitu)
	CE marking / Prostředek označený CE značkou
	Diagnostic medical device in vitro / Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>