



**DB-1254**

## **COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit 2**

### **Návod k použití**

Verze návodu: DB-1254-001-220519

Revize: 1.2 CZ

Poslední aktualizace: 29.11.2022



**REF** DB-1254-100rxns obsahuje reagentie pro 100 reakcí

**REF** DB-1254-1000rxns 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) .....	5
2.3	Intraassay a Interassay variabilita .....	5
2.4	Klinická výkonnost, souhrnné výsledky .....	6
3	Bezpečnostní upozornění .....	8
4	Seznam materiálu .....	9
4.1	Požadované laboratorní vybavení .....	9
4.2	Doporučené laboratorní vybavení .....	9
4.3	Požadovaný materiál, který není součástí soupravy .....	9
4.4	Materiál, který je součástí soupravy .....	10
4.5	Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu .....	11
5	Návod k použití .....	11
5.1	Obecné postupy .....	11
5.2	Jak zamezit kontaminacím (falešně pozitivním výsledkům) .....	11
5.3	Požadované kontroly v každém stanovení .....	12
5.4	Než začnete .....	12
5.5	Přidání kontroly izolace RNA (Isolation control) .....	12
5.6	Příprava RT-PCR master mixu .....	13
5.7	Přidání vzorku do RT-PCR reakce .....	14
5.8	Protokol RT-PCR .....	14
5.8.1	Nastavení přístrojů BioRad CFX96™ a BioRad CFX Opus 96 .....	14
5.9	Analýza dat .....	15
5.9.1	Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (C <sub>t</sub> ) .....	15
5.9.2	Vyhodnocení kontrol .....	16
5.9.3	Interpretace výsledků měřených vzorků .....	17
5.9.4	Typické výsledky .....	20
6	Právní upozornění .....	21
7	Seznam kompatibilních prostředků .....	21
8	Jednostránkový souhrnný protokol .....	22
8.1	Složky soupravy .....	22
8.2	Příprava RT-PCR .....	22
8.3	Protokol RT-PCR .....	22
9	Použité grafické symboly .....	23



# 1 Úvod

## 1.1 Použití (určený účel soupravy)

COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit 2 je určen k detekci viru SARS-CoV-2 (způsobující onemocnění COVID-19) pomocí jednokrokového RT-PCR protokolu z RNA izolované z různých biologických vzorků, například nasálních, nasofaryngeálních, orofaryngeálních nebo bukalních stěrů, nasofaryngeální tekutiny (aspirátu), nasofaryngeálního výplachu, slin, sputa, výplachů dutiny ústní a výplachů hltanu kloktáním – tzv. „gargling liquid“, stolice, moči, tkáňových biopsií, FFPE vzorků tkání anebo vody. Souprava je určena k použití jako pomůcka při diagnostice SARS-CoV-2 u lidí pomocí přístroje pro real-time PCR.

## 1.2 Souhrn a vysvětlení testu

RNA z viru SARS-CoV-2 je detekovatelná ve vzorcích lidských horních cest dýchacích během infekce. Pozitivní výsledek ukazuje na přítomnost RNA genomu viru SARS-CoV-2, avšak nevylučuje bakteriální infekci ani souběžnou infekci (koinfekci) jinými viry. Negativní výsledek tohoto testu nevylučuje infekci SARS-CoV-2 a neměl by být používán jako jediný základ pro rozhodnutí o léčbě pacienta. Negativní výsledek musí být kombinován s klinickými pozorováními, anamnézou pacienta a epidemiologickými informacemi.

Souprava COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit 2 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 viru SARS-CoV-2, kdy fluorescence je detekována pomocí techniky TaqMan™ hydrolyzačních prób. Vir **SARS-CoV-2 je detekován pomocí amplifikace tří nepřekrývajících se částí genomové RNA**: dva segmenty se nachází v genu pro RNA-dependentní RNA polymerázu (*RdRP*; kanály FAM a HEX) a třetí v genu pro Envelope (*E-gene*; kanál ROX). Design je tedy obdobný designu “Charité Berlin” a “Institut Pasteur” protože cílí do obdobných částí genomu, avšak námi cílené sekvence jsou jiné a jsou více konzervované oproti sekvencím ve zmiňovaných publikovaných primerech a próbách.

Tato souprava je určena k detekci virové RNA z RNA izolované z různých biologických vzorků. Souprava obsahuje kontrolu izolace RNA a primery a próbu pro její detekci. **Doporučujeme přidat kontrolu ke každému vzorku ještě před izolací RNA**, aby bylo možné ověřit výtěžek izolace. Kontrolu přidejte do lyzačního/vazebného pufru ze soupravy pro izolaci RNA, který bude následně smíchán se vzorkem, ze kterého je RNA izolována. Tímto postupem se ověří jak účinnost samotné RT-PCR reakce (odhalí se případná inhibice), tak i dostatečný výtěžek izolace RNA, což je klíčový předpoklad pro správnou diagnostiku. Méně preferovanou možností je přidání kontrolní RNA přímo do RT-PCR mixu – tímto způsobem se kontroluje pouze účinnost RT-PCR reakce. **Pro ověření správné funkce soupravy je nutné do každé analýzy přidat negativní a pozitivní kontrolu, která je dodávána v této soupravě.**

Pokud chcete virové RNA detekovat přímo v respiračních vzorcích bez předchozí izolace RNA, pak použijte soupravu DB-1255, která je stejného designu jako tato souprava (detekce stejných cílů



ve stejných kanálech za použití shodných primerů a prób), avšak je určena pro přímou detekci bez nutnosti izolace RNA.

## 1.4 Vhodné vzorky a kompatibilní odběrové sady

Tato souprava je vhodná pro detekci virové RNA izolované z různých biologických vzorků, např. nasálních, nasofaryngeálních, orofaryngeálních nebo bukalních stěrů, nasofaryngeální tekutiny (aspirátu), nasofaryngeálního výplachu, slin, sputa, výplachů dutiny ústní a výplachů hltanu kloktáním – tzv. „gargling liquid“, stolice, moči, tkáňových biopsií, FFPE vzorků tkání anebo vody s využitím souprav k tomu určených. Pro izolaci RNA mohou být použity jak kolonkové izolační soupravy, tak soupravy založené na magnetických částicích. Izolovaná RNA musí být eluována ve vodě, nebo v pufru, který neinhibuje RT-PCR reakci. Pro dosažení optimálních výsledků detekce SARS-CoV-2 ze slin nebo z nosohltanových stěrů v UTM nebo PBS doporučujeme použití DIANA RNA izolačních souprav Automated RNA Isolation Kit (Kat. č. DB-1206).

Vzorky slin a stěrů mohou být před izolací RNA inaktivovány, pokud je použita izolační sada DB-1206 Automated RNA Isolation Kit. Pokud jsou sliny v odběrových sadách DIANA Biotechnologies, například DB-1225 Saliva Collection Set 1.4IM nebo DB-1230 Saliva Collection Set 1.4IF nebo DB-1249 Saliva Collection Kit, tak je možné sliny inaktivovat v inkubátoru. Postupy inaktivace vzorků jsou popsány v manuálu pro DB-1206 Automated RNA Isolation Kit a jsou shodné s postupem pro bezizolační soupravu DB-1255 DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit 2. Postup pro inaktivaci slin byl validován výrobcem, postup pro inaktivaci médií je pouze doporučením a je zodpovědností uživatele jej validovat pro každý typ média (ověřit na cca 10 pozitivních vzorcích, z nichž některé musí být slabé s  $C_t > 30$ , že inaktivace nevede ke snížení výtěžků RNA).

## 1.5 Kompatibilní automatizace a PCR přístroje

Tuto soupravu lze používat manuálně, ale i automatizovaně na automatických laboratorních pipetovacích strojích. Výrobce dodává potřebné protokoly a plastik pro automatizaci na pipetovací stanici Agilent Bravo. Souprava DB-1206 Automated RNA isolation Kit obsahuje plastik a reagentie pro automatizovanou izolaci RNA z různých biologických vzorků na pipetovací stanici Agilent Bravo a také pro následnou automatizovanou přípravu RT-PCR destičky. Souprava DB-1214 Agilent Bravo Installation Package for Automated RNA Isolation Kit obsahuje protokoly pro automatizaci izolace RNA na pipetovací stanici Agilent Bravo.

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 manuálu 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 v kanálech FAM, HEX, ROX 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  $C_t > 30$ .



## 2 Charakteristiky testu

### 2.1 Analytická reaktivita (inkluzivita)

Na interně kvantifikovaných standardech izolované RNA ze SARS-CoV-2 variant „wild-type“, alfa, beta, gama, delta a omikron byla otestována amplifikace touto soupravou a bylo stanoveno, že všechny tyto varianty jsou detekovány se shodnou účinností.

### 2.2 Limit detekce (LOD)

Limit detekce byl určen jako přibližný počet kopií v reakci, při kterém 95 % jamek vyjde pozitivně, a je shrnut v **tabulce 1**. Pro určení LOD byly použity kvantitativní standard SARS-CoV-2 delta od firmy Vircell. Pro každou testovanou koncentraci byl změřen 24-plikát a podle počtu pozitivních jamek byl určen LOD. LOD je udáván v počtu kopií na jamku (druhý sloupec), ale i jako koncentrace v mL vzorku (třetí sloupec) za předpokladu, že je pro test použito 5  $\mu$ L izolované RNA a při izolaci nedojde k zakoncentrování vzorku (při izolaci kdy dojde k pětinasobnému zakoncentrování bude LOD na mL 5x nižší).

**Tabulka 1: LOD<sub>95%</sub> pro jeden nebo dva nebo tři pozitivní kanály ze tří sledovaných**

DB-1254	LOD <sub>95%</sub> v jamce	LOD <sub>95%</sub> mL <sup>-1</sup> (5 $\mu$ L vzorku)
alespoň 1 kanál ze 3 pozitivní	1	200
alespoň 2 kanály ze 3 pozitivní	2	400
3 kanály ze 3 pozitivní	5	1000

### 2.3 Intraassay a Interassay variabilita

Pro detekci SARS-CoV-2 (geny RNA-dependentní RNA polymeráza a Envelope gen v kanálech FAM, HEX a ROX) byla testována intra a interassay variabilita. Byly testovány tři koncentrace (1000 nebo 100 nebo 25 kopií v jamce) v osmi replikátech na třech různých destičkách, ve třech různých PCR strojích a vše bylo připraveno třemi různými operátory. Jako zdroj virové RNA byl použit komerční kvantifikovaný RNA standard SARS-CoV-2 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 genu (kanálu), bylo spočítáno očekávané C<sub>t</sub> jako průměr získaných C<sub>t</sub> hodnot. V **tabulkách 2, 3, 4** jsou všechny tyto tři parametry uvedeny pro každý z testovaných genů (kanálů). 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 2** je uveden průměr přes všechny detekované RNA uvnitř jednoho měření (intraassay), v **tabulce 3** je uveden průměr přes všechny detekované RNA mezi dvěma měřeními (interassay variability) a v **tabulce 4** je uveden průměr přes všechny detekované RNA vyjma kontroly (IC).



**Tabulka 2: hodnoty intraassay variability**

Kit	RNA	Kanál	Intraassay Variabilita		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1254	RdRP1	FAM	0.08 (0.04-0.10)	0.26 (0.19-0.33)	0.37 (0.32-0.42)
DB-1254	RdRP2	HEX	0.07 (0.05-0.09)	0.21 (0.16-0.26)	0.38 (0.34-0.44)
DB-1254	Envelope	ROX	0.09 (0.07-0.11)	0.17 (0.15-0.19)	0.30 (0.20-0.41)
DB-1254	IC	Cy5	0.11 (0.08-0.15)	0.15 (0.11-0.17)	0.13 (0.09-0.16)
DB-1254	All	All	0.08 (0.04-0.11)	0.21 (0.15-0.33)	0.35 (0.20-0.44)

**Tabulka 3: hodnoty interassay variability**

Kit	RNA	Kanál	Interassay Variabilita		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1254	RdRP1	FAM	0.09 (0.07-0.16)	0.22 (0.15-0.26)	0.23 (0.19-0.25)
DB-1254	RdRP2	HEX	0.15 (0.09-0.13)	0.23 (0.17-0.31)	0.39 (0.34-0.43)
DB-1254	Envelope	ROX	0.24 (0.16-0.21)	0.27 (0.16-0.36)	0.46 (0.41-0.55)
DB-1254	IC	Cy5	0.16 (0.15-0.33)	0.15 (0.07-0.19)	0.21 (0.13-0.28)
DB-1254	All	All	0.17 (0.07-0.33)	0.24 (0.15-0.36)	0.37 (0.19-0.55)

**Tabulka 4: Očekávané hodnoty  $C_t$**

Kit	RNA	Kanál	Očekávané hodnoty $C_t$		
			1000 kopií	100 kopií	25 kopií
DB-1254	RdRP1	FAM	29.46 (29.39-29.52)	32.55 (32.49-32.60)	34.48 (34.41-34.53)
DB-1254	RdRP2	HEX	30.02 (29.86-30.16)	33.12 (32.97-33.29)	35.15 (34.89-35.35)
DB-1254	Envelope	ROX	28.12 (27.90-28.35)	31.30 (31.06-31.51)	33.15 (32.83-33.55)
DB-1254	IC	Cy5	27.43 (27.34-27.56)	27.42 (27.32-27.57)	27.34 (27.14-27.52)
DB-1254	All	All	29.20 (27.90-30.16)	32.32 (31.06-33.29)	34.26 (32.83-35.35)

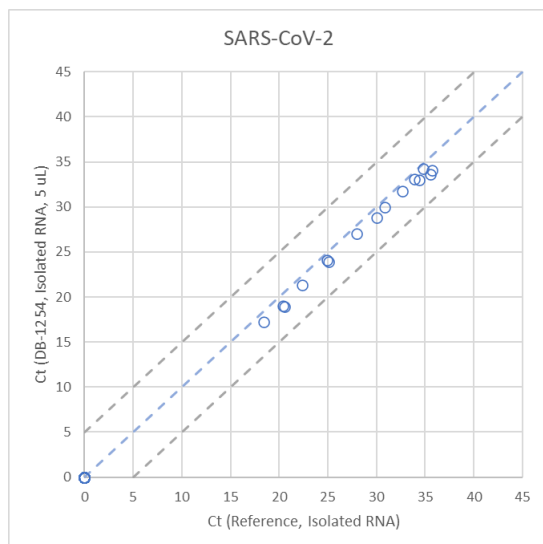
## 2.4 Klinická výkonnost, souhrnné výsledky

Celkem 93 vzorků nosohltanových stěrů a 182 vzorků slin, které byly odebrány jedincům z evropské populace pro indikované i preventivní testování pro COVID-19 a jiná respirační onemocnění, bylo pro SARS-CoV-2 otestováno dvěma referenčními soupravami a výsledky byly porovnány s výsledky detekce SARS-CoV-2 touto soupravou. Ze vzorků byla izolována RNA pomocí soupravy DB-1206 Automated RNA Isolation Kit od výrobce DIANA Biotechnologies. Následně byl v izolované RNA detekován SARS-CoV-2 dle pokynů výrobce použité RT-PCR soupravy. Pozitivní vzorky stěrů i slin na SARS-CoV-2 pocházejí z roku 2022 a jsou to varianta omikron. Vzorky pocházejí z několika různých laboratoří a stěry byly v různých transportních médiích.

Výsledky porovnání pro nosohltanové stěry jsou zobrazeny na **obrázku 1** a pro sliny na **obrázku 2**, kde jsou v grafech porovnány hodnoty  $C_t$  naměřené touto soupravou a referenčními soupravami. Počty TP („true positive“), FN („false negative“), TN („true negative“) a FP („false positives“) jsou uvedeny v **tabulce 5**. V tabulce jsou vypočteny také hodnoty PPA („positive percent agreement“) a NPA („negative percent agreement“).

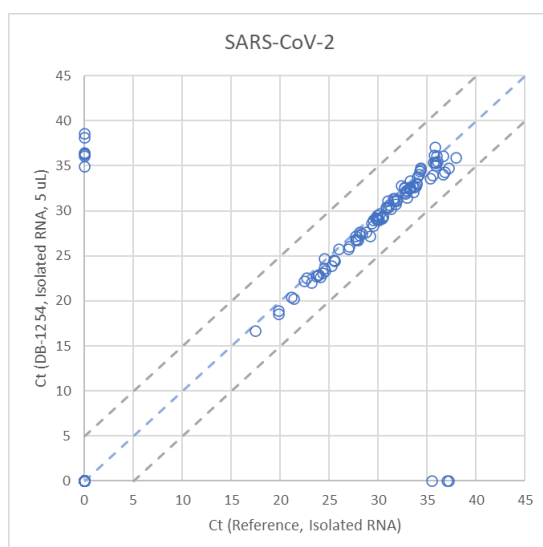


„Positive percent agreement“ (PPA) prostředku dosáhl ve vzorcích slin a stěrů pro SARS-CoV-2 97.5 %, zatímco „negative percent agreement“ (NPA) dosáhl 100.0 %. Hodnoty PPA i NPA prokazují, že prostředek je vhodný a účinný pro detekci viru SARS-CoV-2.



**Obrázek 1: porovnání naměřených  $C_t$  pro vzorky nosohltanových stěrů s referenčními měřeními**

Na ose y grafu je vynesena minimální hodnota  $C_t$  ze dvou, příp. tří kanálů soupravy DB-1254, které je porovnané s  $C_t$  naměřenými referenčními soupravami (osa x). Pokud byl signál naměřen pouze v jedné referenční soupravě ( $C_t < 37$ ), pak je zde vyneseno toto  $C_t$ , pokud bylo  $C_t$  v obou soupravách pod 40 (a alespoň v jedné pod 37), tak je vyneseno průměr obou  $C_t$ . Hodnoty ležící na ose x značí, že daný vzorek byl detekován pouze v referenčních soupravách, zatímco hodnoty ležící na ose y značí, že vzorek byl detekován pouze v DB-1254 soupravě. Hodnoty  $C_t$  byly v průměru v soupravě DB-1254 o 1 cyklus nižší než v referenčních soupravách, což ukazuje na potenciálně citlivější detekci SARS-CoV-2 v soupravě DB-1254.



**Obrázek 2: porovnání naměřených  $C_t$  pro vzorky slin s referenčními měřeními**



Na ose y grafu je vyneseno odpovídající kanál soupravy DB-1254. Konkrétně je vyneseno minimální  $C_t$  ze 2, příp. 3 kanálů (**osa y**) porovnané s  $C_t$  naměřenými referenčními soupravami (**osa x**). Pokud byl signál naměřen pouze v jedné referenční soupravě ( $C_t < 37$ ), pak je zde vyneseno toto  $C_t$ , pokud bylo  $C_t$  v obou soupravách pod 40 (a alespoň v jedné pod 37), tak je vyneseno průměr obou  $C_t$ . 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-1254 soupravě. Několik vzorků SARS-CoV-2 bylo detekováno pouze v soupravě DB-1254 a nikoliv v referenční soupravě (viz body na osách y). Při bližší analýze (**tabulka 5**) je vidět, že velká část z nich byla v některém z referenčních měření hraničně pozitivní a zbytek vzorků jde patrně na vrub vyšší citlivosti detekce soupravou DB-1254. Všechny tyto vzorky jsou s  $C_t > 30$  a zároveň hodnoty  $C_t$  jsou v DB-1254 oproti referenci nižší v průměru o jeden cyklus, a je tak velká šance, že se jedná o slabé vzorky, které nebyly v referenčním měření zachyceny.

**Tabulka 5: výsledky určení NPA a PPA pro vzorky izolované RNA z nosohltanových stěrů a slin**

Vzorek	Interpretace	TP	FN	TN	FP	FP <sup>(2)</sup>	FP <sup>(1)</sup>	PPA	NPA
Nosohltanové stěry	SARS-CoV-2*	15	0	78	0	0	0	100.0%	100.0%
	SARS-CoV-2 (FAM)	15	0	78	0	0	0	100.0%	100.0%
	SARS-CoV-2 (HEX)	15	0	78	0	0	0	100.0%	100.0%
	SARS-CoV-2 (ROX)	15	0	78	0	0	0	100.0%	100.0%
Sliny	SARS-CoV-2*	95	3	77	7	6	1	97.1%	100.0%
	SARS-CoV-2 (FAM)	95	3	79	5	4	1	97.1%	100.0%
	SARS-CoV-2 (HEX)	94	4	78	6	3	1	96.1%	97.5%
	SARS-CoV-2 (ROX)	96	2	71	13	6	3	98.1%	94.7%
Nosohltanové stěry + sliny	SARS-CoV-2*	110	3	155	7	6	1	97.5%	100.0%
	SARS-CoV-2 (FAM)	110	3	157	5	4	1	97.5%	100.0%
	SARS-CoV-2 (HEX)	109	4	156	6	3	1	96.6%	98.7%
	SARS-CoV-2 (ROX)	111	2	149	13	6	3	98.4%	97.4%

Všechny vzorky byly nejprve změřeny dvěma referenčními soupravami a jako pozitivní byly považovány všechny vzorky s  $C_t$  v alespoň jedné ze souprav pod 37 cyklů. Následně byly vzorky změřeny soupravou DB-1254 a vzorky, které měly  $C_t$  pod 40 a zároveň byly pozitivní v minimálně dvou kanálech ze tří, tak byly považovány za pozitivní. Pozitivita vzorků byla hodnocena jak v rámci celkového hodnocení positivity vzorku za splnění podmínky „pozitivity minimálně ve dvou ze tří kanálů“ (\*), tak pozitivita v jednotlivých kanálech FAM, HEX a ROX. Pokud se pozitivita shodovala s referencí, pak byly považovány za TP, pokud byly pozitivní pouze v DB-1254 tak za FP. V případě FP bylo ještě prověřeno, zda nebyly tyto vzorky hraničně pozitivní v jedné referenční soupravě (v jedné měl vzorek  $C_t$  37 až 40 a v druhé byl negativní, sloupec FP1) nebo obou referenčních soupravách (v obou měl vzorek  $C_t$  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-1254 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. Hodnota PPA i NPA celkového hodnocení positivity vzorku za splnění podmínky „pozitivita minimálně ve 2/3 kanálů“ (\*) i v rámci jednotlivých kanálů FAM, HEX a ROX byla pro vzorky izolované RNA z nosohltanových stěrů 100 %. Nižší hodnota PPA u vzorků izolované RNA ze slin byla v důsledku 3 slabých FN vzorků s  $C_t > 35$ .

### 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.



Součástí soupravy jsou složky **obsahující 0.02% azid sodný, který je toxický** a při styku s kyselinami vytváří toxický plyn. Příslušné bezpečnostní listy (MSDS) budou poskytnuty na vyžádání.







Při práci s biologickými vzorky věnujte pozornost bezpečnostním pravidlům pro práci s infekčním biologickým materiálem, použijte 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.



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, ROX a Cy5– **postupujte podle návodu poskytnutého výrobcem daného přístroje**
- Kalibrované jednokanálové/multikanálové pipety
- Rukavice a jiné ochranné prostředky

### 4.2 Doporučené laboratorní vybavení

- Stolní vortex a centrifuga
- V případě použití automatizovaného protokolu: pipetovací robot (doporučena 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
- Soupravy nebo reagensie pro izolaci RNA (např. DB-1206)
- Materiál, který bude sloužit jako negativní kontrola (viz kapitola 5.3)
- V případě použití automatizovaného protokolu: protokoly a plastik pro automatizaci (např. instalační balíček DB-1214 a sada DB-1206 pro pipetovací stanici Agilent Bravo)



## 4.4 Materiál, který je součástí soupravy

**Tabulka 6: Složky soupravy DB-1254**

Souprava <sup>[8]</sup>	Složky soupravy <sup>[8]</sup>	REF kód <sup>[7]</sup>	Objem (μL) <sup>[6]</sup>	Podmínky skladování	Popis a barva víčka
DB-1254-100rxns	Enhancer mix (4x)	RF00506	500	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	1
	Primer mix (4x)	RF06288	500	-20 °C <sup>[1,2,3]</sup>	2
	Enzyme mix (4x)	RF07929	500	<b>-20 °C</b> <sup>[2,3]</sup>	3
	Positive control	RF09960	150	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	4
	Isolation control <sup>[4]</sup>	RF05323	150	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	5
DB-1254-1000rxns	Enhancer mix (4x)	RF00506	5000	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	1 <sup>[5]</sup>
	Primer mix (4x)	RF06288	5000	-20 °C <sup>[1,2,3]</sup>	2 <sup>[5]</sup>
	Enzyme mix (4x)	RF07929	5000	<b>-20 °C</b> <sup>[2,3]</sup>	3 <sup>[5]</sup>
	Positive control	RF09960	2x 750	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	4
	Isolation control <sup>[4]</sup>	RF05323	2x 750	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	5

**[1] Uchovávejte na temném místě** (obsahuje látky, které jsou citlivé na světlo). **[2] Skladujte celou soupravu při teplotě -20 °C nebo nižší**; můžete skladovat také při -40 °C nebo -80 °C. 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] Přidejte do lyzačního/vazebného pufru před extrakcí RNA nebo přímo do RT-PCR mixu.** **[5] V soupravách pro 1000 reakcí mají složky č. 1-3 průhledná víčka.** **[6] Do zkumavek je plněn objem o 2 až 10 % vyšší, než je uvedeno v tabulce.** **[7] REF kódy a čísla šarží (LOT) soupravy i jednotlivých složek jsou uvedeny na obalu, obal proto pro referenci zachovejte, dokud nespotebujete celou soupravu. Nemíchejte složky z různých šarží souprav.** **[8] 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 (dvou oblastí genu RdRP v kanálech FAM a HEX; genu Envelope v kanále ROX) a izolační 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 aditiva. Dodáván jako 4x koncentrát.

### Positive control

Positivní kontrola obsahuje genomovou RNA viru SARS-CoV-2 o koncentraci přibližně 400 kopií na mikrolitr. Otevření této lahvičky může způsobit kontaminaci pracovního prostoru, proto tuto **vialku před otevřením vždy stočte!**



## Isolation control

Obsahuje RNA umělé sekvence o délce přes 2000 bází. Tato RNA se přidává do každého vzorku před izolací RNA za účelem kontroly účinnosti izolace a odhalení případné inhibice RT-PCR reakce.

### 4.5 Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu

**Složky 1, 2 a 3 (Enhancer, Primer a Enzyme Mix) dlouhodobě skladujte při teplotě -20 °C nebo nižší** (doba použitelnosti je uvedena na obalu). Vyhněte se opakovanému zamrazení/rozmrazení, nikdy nepřekračujte čtyři cykly zamrazení/rozmrazení. Pokud budete tyto složky používat vícekrát, rozaliquotujte je po prvním rozmrazení.

**Složky 1, 2 a 3** jsou stabilní přinejmenším 4 hodiny při 25 °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 °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 rozaliquotováno a zamrazeno co nejdříve po přípravě master mixu. Je nutné zamrazení v -80 °C a následně je možné skladovat až 1 měsíc v -80 °C (viz kapitola 5.6).

**Složky 4 a 5 (pozitivní a izolační kontroly)** obsahují RNA, rozmrazujte je na dobu nezbytně nutnou a uchovávejte je na ledu, avšak mohou být skladovány kumulativně přinejmenším 24 hodin na pokojové teplotě. Vyhněte se opakovanému zamrazení/rozmrazení pozitivní a izolační kontroly, nepřekračujte čtyři cykly zamrazení/rozmrazení. Optimální teplota pro dlouhodobé skladování je -80 °C, ale mohou být skladovány i při -20 °C.

## 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 reagensii a před otevřením vždy vialku s pozitivní kontrolou řádně stočte.
- Nádobu s reagensii nechávejte otevřenou pouze po dobu nezbytně nutnou.
- K ředění vzorku použijte ultračistou nebo PCR grade vodu (nebo z ní připravené pufr).

### 5.3 Požadované kontroly v každém stanovení

Pro odhalení případných falešně pozitivních a falešně negativních výsledků je nutné přidat pozitivní a negativní kontrolu na každou RT-PCR destičku. Negativní kontrolu lze vytvořit dvěma způsoby. Nejlepší je provést izolaci RNA se známým negativním vzorkem nebo s čistým médiem a přidat stejné množství eluátu do RT-PCR mixu, jako by se jednalo o skutečný vzorek. Taková negativní kontrola odhalí kontaminaci v kterémkoliv kroku procesu. Druhý způsob negativní kontroly je méně robustní a spočívá v přímém přidání čistého elučního roztoku nebo ultračisté / PCR grade vody do RT-PCR mixu, jako by se jednalo o vzorek. Tento postup ale odhalí pouze kontaminaci elučního pufru nebo RT-PCR mixu. Jako pozitivní kontrolu použijte SARS-CoV-2 genomovou RNA, která je součástí soupravy (Positive control, vialka č. 4).

### 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 reagensie 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 několikeré propipetování. Dostatečné promíchání je obzvláště důležité před rozdělením do alikvotů. Pokud vialku vortexujete, vždy ji před otevřením krátce stočte.

### 5.5 Přidání kontroly izolace RNA (Isolation control)

Kontrola izolace RNA (izolační kontrola) by měla být přidána do lyzačního/vazebného pufru před přidáním vzorku a následnou RNA izolací. Do lyzačního/vazebného pufru přidejte **1 µL RNA z vialky Isolation control (vialka č. 5, fialové víčko ●)** pro každý izolovaný vzorek (například do objemu lyzačního/vazebného pufru pro 10 izolací použijte celkem 10 µL). Tento postup důrazně doporučujeme, protože pro každý vzorek odhalí nejen případnou inhibici RT-PCR reakce, ale také případnou sníženou účinnost izolace RNA.



Pokud není možné přidat kontrolu izolace RNA do vzorku před samotnou izolací RNA, přidejte **0.1 µL z vialky Isolation control (vialka č. 5, fialové víčko ●)** pro každou reakci přímo do RT-PCR master mixu (například do master mixu pro deset reakcí přidejte 1 µL, viz 5. krok v kapitole 5.6).

## 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 7**.

1. Rozmrazte a promíchejte všechny složky RT-PCR master mixu (viz **tabulka 7** 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. **Volitelné:** pokud nepřidáváte kontrolu izolace RNA do vzorku před RNA izolací, **přidejte 0.1 µL z vialky Isolation control, v soupravě vialka č. 5 (fialové víčko ●)**, a promíchejte opakovaným pipetováním (pipeta by měla být pro míchání nastavena minimálně na ½ objemu míchaného roztoku) nebo s použitím vortexu.
6. Přeneste **15 µL směsi (RT-PCR master mix)** do 96-jamkové destičky nebo do mikrozkušavek (dle typu použitého PCR cykleru). 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 5.5, 5.6 a 5.7 bez ovlivnění citlivosti detekce.

**Tabulka 7: Příprava RT-PCR master mixu**

Složky soupravy	Č. a barva víčka	µL na 1 reakci	µL na 100 reakcí
Enhancer mix (4x)	1 <sup>[1]</sup>	5	500
Primer mix (4x)	2 <sup>[1]</sup>	5	500
Enzyme mix (4x)	3 <sup>[1]</sup>	5	500
Isolation control (volitelné) <sup>[2]</sup>	5	0.1	10
Celkový objem RT-PCR master mix		15	1500

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

**[2]** Objem Isolation control je zanedbán; do RT-PCR master mixu se přidává pouze v případě, že nebyla přidána při izolaci RNA (bližší informace viz kapitola 5.5).

## Alikvotování roztoků pro přípravu RT-PCR master mixu

Počty a objemy alikvotů jednotlivých složek této soupravy pro 1000 testů (1000rxns) jsou shrnuty v **tabulce 6**. Pokud nechcete použít celou soupravu najednou, je vhodné si po prvním rozmrazení připravit jednorázové alikvoty. Jsou dva možné způsoby přípravy jednorázových alikvotů pro analýzu 96 vzorků (např. s využitím pipetovací stanice Agilent Bravo a soupravy DB-1206):

1. **V případě možnosti uchování alikvotů v -80 °C:** smíchejte veškerý obsah Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x). Dodržte toto pořadí a vždy promíchejte



před přidáním Enzyme mixu. Poté znovu důkladně promíchejte a rozdělte do 10 alikvotů po 1,53 mL. Výsledkem bude 10 vialek s RT-PCR master mixem. Takto připravený RT-PCR mix musí být co nejdříve zamrazen a uchováván při -80 °C. Po rozmrazení mix použijte co nejdříve, ideálně do 30 minut, avšak na pokojové teplotě je stabilní až 2 hodiny.

2. **V případě, že nemáte možnost uchovávat alikvoty v -80 °C**, připravte od každého z roztoků Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x) 10 alikvotů po 510 µL. Tyto alikvoty uchovejte při -20 °C. Pro přípravu RT-PCR master mixu pro analýzu 96 izolací poté smíchejte vždy po jednom alikvotu od každé komponenty a vzniklý mix použijte celý. Po rozmrazení a před smícháním jsou jednotlivé komponenty RT-PCR master mixu stabilní při pokojové teplotě po dobu 4 hodin.

## Alikvotování pozitivní kontroly

Z dodaných vialek si připravte z každé pět jednorázových alikvotů pozitivní kontroly, každý s objemem 150 µL. Tyto alikvoty mohou být uchovány podle potřeby jak při -80 °C, tak při -20 °C.

## Alikvotování izolační kontroly

Z dodaných vialek si připravte z každé pět jednorázových alikvotů izolační kontroly, každý s objemem 150 µL. Tyto alikvoty mohou být uchovány podle potřeby jak při -80 °C, tak při -20 °C.

Podrobnosti ke stabilitě a skladování jednotlivých roztoků jsou uvedeny v kapitole 4.5.

## 5.7 Přidání vzorku do RT-PCR reakce

**Přidejte 5 µL vzorku do jamek/mikrozkmavek**, které obsahují 15 µL RT-PCR master mixu. Po přidání vzorků 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.** V případě pozitivní kontroly přidejte místo vzorku **5 µL Positive control z vialky č. 4 (červené víčko ●)**. V případě negativní kontroly přidejte místo vzorku buď **5 µL RNA izolované ze známého negativního vzorku** nebo **5 µL elučního pufry** ze soupravy pro izolaci RNA anebo **5 µL ultračisté / PCR grade vody** (viz kapitola 5.3). Celkový objem reakce po přidání vzorku nebo kontrol je 20 µL.

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 5.5, 5.6 a 5.7 bez ovlivnění citlivosti detekce.

## 5.8 Protokol RT-PCR

Zde popsaný 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, ROX 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 8**.



**Tabulka 8: Nastavení filtrů pro RT-PCR detekci na přístrojích BioRad.**

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

\*Názvy fluoroforů jsou v textu uváděny tak, jak jsou popsány 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 9**.

Objem vzorku „sample volume“ nastavte na 20 µL.

**Tabulka 9: 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	72	40
Hold time (hh:mm:ss)	00:10:00	00:02:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Plate read	NO	NO	NO	YES	NO	NO

Přibližná délka tohoto protokolu na přístrojích BioRad je 1 hod a 16 minut.

## 5.9 Analýza dat

### 5.9.1 Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu ( $C_t$ )

Provedte analýzu dat dle návodu k obsluze vašeho RT-PCR přístroje. Pro zobrazení fluorescence doporučujeme používat logaritmické zobrazení a doporučujeme používat barevnou kompenzaci mezi kanály FAM a HEX, pokud ji váš stroj nabízí. Níže 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 (byť od stejného výrobce).

Pro BioRad CFX96™ a BioRad CFX Opus 96 doporučujeme použít výchozí nastavení pro snímání kanálů FAM, HEX, ROX a Cy5. Pro určení hodnot  $C_t$  použijte výchozí metodu Single Threshold mode\* s **manuálně zvolenými thresholdy: 200 RFU pro FAM i HEX a 100 RFU pro ROX a Cy5. Všechny hodnoty  $C_t$  uváděné v kapitolách 5.9.2 a 5.9.3 odpovídají vyhodnocení s takto nastavenými thresholdy.** Protože biologické vzorky mohou v PCR autofluoreskovat, tak doporučujeme na strojích BioRad aktivovat nastavení „Apply Fluorescence Drift Correction“, což minimalizuje výskyt autofluorescenčních křivek. V případě potřeby je možné zvolené thresholdy manuálně navýšit oproti výše uvedeným hodnotám.

Naměřená data je v každém případě nutné vizuálně zkontrolovat, protože v důsledku použití prahové fluorescence pro výpočet  $C_t$  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 10). U BioRad strojů pozorujeme přibližně 2% přesvit z FAM do HEX, proto v případě vysoké fluorescence ve FAM (kolem 10 000 RFU) doporučujeme použít vyšší threshold pro HEX 300 RFU (namísto 200 RFU).

Získané hodnoty  $C_t$  se budou lišit v závislosti na použitém RT-PCR přístroji, metodě vyhodnocení a nastavení thresholdů. Hodnoty  $C_t$  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  $C_t$  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  $C_t$  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  $C_t$  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  $C_t$  uvedené níže u vyhodnocení kontrol a v **tabulce 10** 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 10** nutné naměřené hodnoty  $C_t$  posunout o rozdíl mezi vámi určenou hodnotou  $C_t$  pozitivní kontroly a referenční hodnotou  $C_t$  (28. cyklus pro kanály FAM a HEX a 27. cyklus pro kanál ROX). Například, pokud vámi určená hodnota  $C_t$  FAM kanálu pro pozitivní kontrolu bude 24, tak pro aplikaci **tabulky 10** buď přičtete 4 cykly k hodnotám  $C_t$  klinických vzorků, anebo 4 cykly odečtete od prahových  $C_t$  v **tabulky 10**.

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

## 5.9.2 Vyhodnocení kontrol

U **pozitivní kontroly** musí k amplifikaci dojít ve třech kanálech: virových genů ve FAM, HEX a ROX (v závislosti na použitém plastiku, cykleru a objemu vzorku jsou pro tyto kanály očekávané  $C_t$  hodnoty v rozmezí 26-33 cyklů). Pokud nedojde k amplifikaci v některém z těchto kanálů (tzn. že v některém z těchto kanálů bude  $C_t > 35$ ), PCR reakce neproběhla správně a výsledky z takové analýzy nejsou platné a musí být zopakovány. Pro určení hodnot  $C_t$  použijte výše popsané nastavení thresholdů v metodě Single Threshold mode. Amplifikace izolační kontroly v Cy5 by měla vést k  $C_t < 35$  cyklů, avšak pro správné vyhodnocení pozitivní kontroly to není nutné (signál kontroly v Cy5 bude měřitelný pouze pokud pozitivní kontrola prošla izolací, pokud přidáváte 5  $\mu$ L pozitivní kontroly přímo do RT-PCR reakce a nepřidáte zvlášť také izolační kontrolu, tak Cy5 bude negativní).

U **negativní kontroly** musí dojít k amplifikaci izolační kontroly v kanálu Cy5 (<40 cyklů), zatímco v ostatních kanálech nesmí být žádná amplifikace. Měřitelná amplifikace ve FAM, HEX nebo ROX kanálech ukazuje na možnou kontaminaci reagentů templátem, což může způsobit falešně pozitivní výsledky. V takovém případě je nutné otestovat větší počet negativních kontrol (signál kontroly v Cy5 bude měřitelný pouze pokud pozitivní kontrola prošla izolací, pokud přidáváte 5  $\mu$ L pozitivní kontroly přímo do RT-PCR reakce a nepřidáte zvlášť také izolační kontrolu, tak Cy5 bude negativní).







**Izolační kontrola** musí být vyhodnocena u každého vzorku, nicméně u pozitivních vzorků může být amplifikace izolační kontroly negativně ovlivněna amplifikací virových genů a  $C_t$  hodnoty v Cy5 kanále mohou být výrazně vyšší než u negativní kontroly, případně pod *thresholdem*. Pokud test vyhodnocujete pouze kvalitativně, **pozitivní vzorky jsou považovány za pozitivní i v případě, že nevyjde izolační kontrola**. U vzorků, které jsou v kanálech FAM, HEX a ROX negativní anebo s  $C_t > 37$ , je nutné zkontrolovat amplifikaci kontroly v Cy5. V případě, že je  $C_t$  v Cy5 u takového vzorku  $> 40$ . cyklus nebo je signál nedetekovatelný, lze usuzovat na nízkou účinnost izolace RNA nebo na inhibici RT-PCR reakce, a je nutné izolaci RNA z daného vzorku zopakovat.

### 5.9.3 Interpretace výsledků měřených vzorků

Stanovte hodnoty prahového detekčního cyklu ( $C_t$ ) v každém kanálu a výsledky interpretujte dle **tabulky 10** a dle výsledků vyhodnocení pozitivní kontroly. V případě, že používáte doporučený postup pro určení  $C_t$  a vámi získané hodnoty  $C_t$  pro pozitivní kontrolu odpovídají mezím uvedeným v předchozím oddíle (tj.  $C_t$  pro FAM, HEX i ROX kanál jsou mezi 26. a 33. cyklem), můžete interpretovat naměřená  $C_t$  dle této tabulky bez dalších přepočtů  $C_t$ . V opačném případě je nutno stanovené  $C_t$  před interpretací dle **tabulky 10** přepočítat, jak je uvedeno výše v kapitole 5.9.1.



### Tabulka 10: Interpretace výsledků

Symbol „-“ značí  $C_t > 40$  cyklů nebo nedetekovatelný signál; symbol „+“ značí  $C_t < 40$  cyklů.

V kanálech FAM, HEX i ROX jsou detekovány geny SARS-CoV-2 a v Cy5 izolační kontrola. Hodnoty  $C_t$ , 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 [8,9]	HEX [7,8,9]	ROX [8,9]	Cy5	Interpretace
$C_t < 40$	$C_t < 40$	$C_t < 40$	+ [1] / - [2]	<b>SARS-CoV-2 pozitivní</b> [3]
$C_t < 40$	$C_t < 40$	-	+ [1] / - [2]	<b>SARS-CoV-2 pozitivní</b> (jakékoliv dva ze tří virových kanálů jsou pozitivní) [3]
$C_t < 40$	-	$C_t < 40$	+ [1] / - [2]	
-	$C_t < 40$	$C_t < 40$	+ [1] / - [2]	
$C_t$ 30 až 40	-	-	+ [1]	<b>Slabě SARS-CoV-2 pozitivní</b> , opakovat pro potvrzení [4]
-	$C_t$ 30 až 40	-	+ [1]	
-	-	$C_t$ 30 až 40	+ [1]	
$C_t$ 30 až 40	-	-	-	<b>Slabě SARS-CoV-2 pozitivní</b> , inhibice RT-PCR, opakovat pro potvrzení [5]
-	$C_t$ 30 až 40	-	-	
-	-	$C_t$ 30 až 40	-	
$C_t < 30$	-	-	+ [1] / - [2]	<b>Nespolehlivý výsledek:</b> může ukazovat kontaminaci produktem amplifikace nebo mutace v detekovaných genech, doporučeno <b>zopakovat s RT-PCR soupravou, která detekuje jiné geny než tato souprava.</b> [6]
-	$C_t < 30$	-	+ [1] / - [2]	
-	-	$C_t < 30$	+ [1] / - [2]	
-	-	-	+ [1]	<b>Nedetekovatelné (negativní) pro SARS-CoV-2</b> [10]
-	-	-	-	<b>Nespolehlivý výsledek:</b> inhibice RT-PCR, <b>zopakovat</b> nebo <b>provést izolaci RNA.</b>

[1] Pokud byla do vzorku přidána kontrola izolace RNA před izolací RNA v množství podle pokynů a byl dodržen standardní protokol izolace (tj. pro RT-PCR bylo použito přibližně 1/10 eluce, např. 5 z 50  $\mu$ L), hodnota  $C_t$  pro Cy5 by měla být kolem 35. cyklu nebo nižší.

[2] Vysoké koncentrace virové RNA detekované v kterémkoliv kanále mohou způsobit zhoršení amplifikace izolační 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 ROX.

[3] Pozitivní signál alespoň ve dvou virových kanálech ze tří značí pozitivní výsledek a typicky amplifikace v některém kanále může chybět u slabých vzorků s  $C_t$  okolo 35. cyklu nebo vyššími. Pokud by signál pozitivních virových kanálů byl vysoký ( $C_t < 30$ ) a jeden kanál byl stále negativní, tak to může být známkou mutace vyskytující se v příslušném genu, pro který amplifikace chybí. I tak výsledek znamená pozitivitu vzorku na virus SARS-CoV-2, avšak v případě výskytu takovýchto vzorků prosíme o kontaktování aplikačních specialistů výrobce.

[4] V případě, že je pozitivní pouze jeden z virových kanálů s  $C_t$  mezi 30. až 40. cyklem, a zároveň vyšla pozitivně i izolační kontrola, lze výsledek považovat za pozitivní, avšak je nutné pro potvrzení test zopakovat (se stejným vzorkem pro vyloučení náhodné kontaminace nebo s novým odběrem pro potvrzení klinické relevance). Opakovaně pozitivní výsledek v daném kanále je považován za pozitivitu na daný virus.



**[5]** V případě, že je  $C_t$  v kanálech FAM, HEX nebo ROX mezi 30. až 40. cyklem a zároveň je signál v Cy5 kanále vyšší než 40. cyklus nebo nedetekovatelný, pak je nutné test opakovat, protože pravděpodobně došlo k inhibici RT-PCR nebo ke snížení účinnosti izolace RNA. Opakovaně pozitivní výsledek v daném kanále je považován za pozitivitu na daný virus.

**[6]** V případě, že je  $C_t$  v jednom z kanálů FAM, HEX nebo ROX nižší než 30 cyklus a zbylé dva kanály jsou negativní, je výsledek nespolehlivý. Může se jednat o kontaminaci produktem amplifikace nebo o mutace ve dvou cílových sekvencích, které vyšly negativně. Je proto doporučeno zopakovat test s RT-PCR soupravou detekující jiné cílové geny než tato souprava. V případě výskytu takovýchto vzorků prosíme o kontaktování aplikačních specialistů výrobce.

**[7]** Kvůli přesvitu signálu z kanálu FAM do HEX je potřeba vyloučit křivky s maximálním RFU v HEX do 300 v případě, že ve FAM je fluorescence okolo 10 000 RFU.

**[8]** 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.

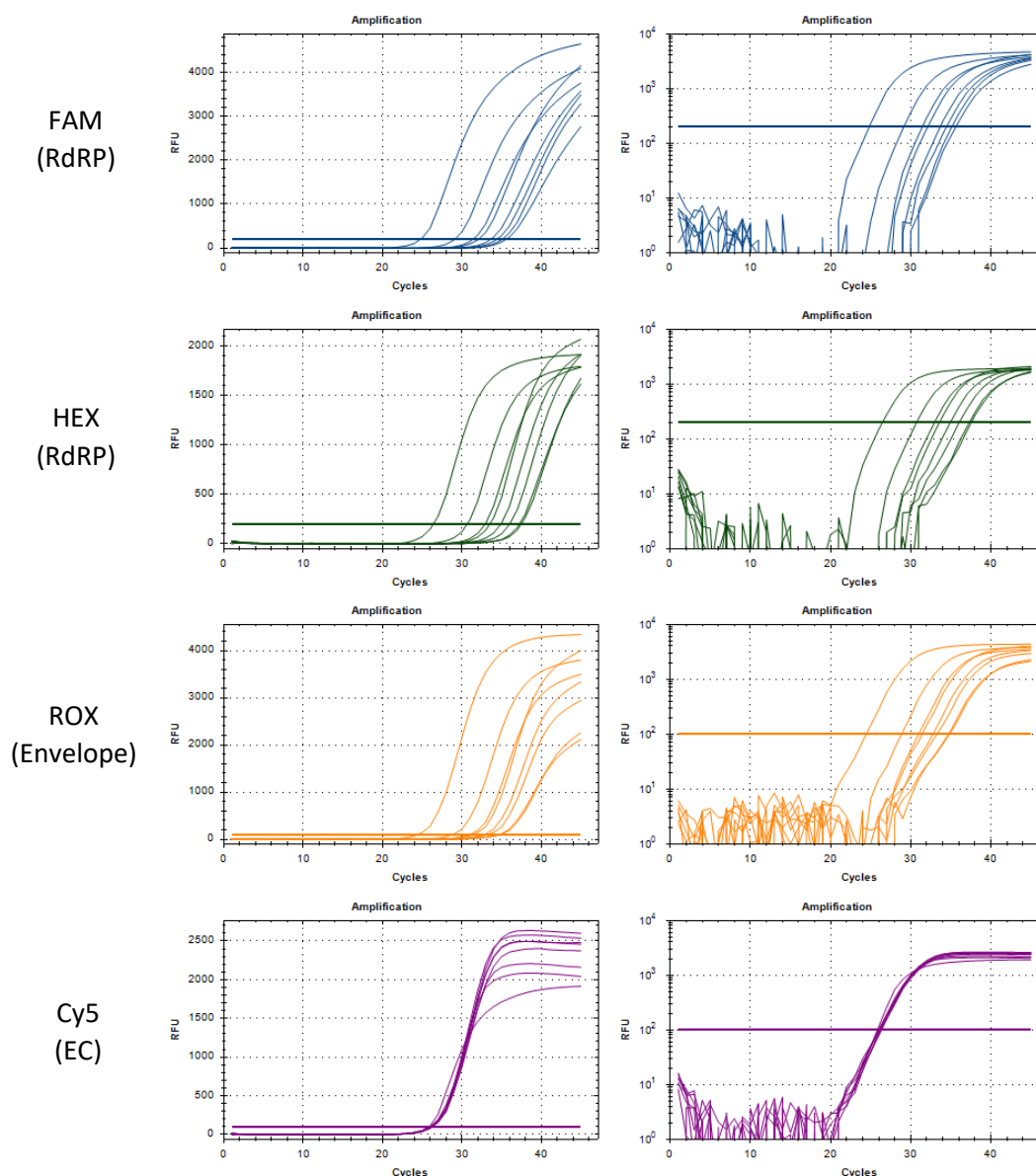
**[9]** V jakémkoliv kanále může dojít k autofluorescenci vzorku projevující se vysokou fluorescencí od brzkých cyklů PCR protokolu, typicky s  $C_t < 10$  a s koncovou fluorescencí v řádu stovek RFU. Nejčastěji se autofluorescence vyskytují v kanále ROX.

**[10]** Negativní výsledek nevylučuje infekci tímto virem a neměl by být používán jako jediný základ pro rozhodnutí o léčbě pacienta.



### 5.9.4 Typické výsledky

Na **obrázku 3** jsou vyobrazena ilustrativní data naměřená s ředící řadou virové RNA se soupravou DB-1255, která používá identické primery a próby jako DB-1254.



**Obrázek 3: Detekce ředící řady virových RNA v množství od 10 000 do 5 kopií v jamce na přístroji BioRad CFX96™.**

První dvojice grafů ukazuje amplifikaci signálu v kanálu FAM (gen pro RdRP viru SARS-CoV-2), druhá v HEX (gen pro RdRP viru SARS-CoV-2), třetí v ROX (gen kódující Envelope viru SARS-CoV-2) a čtvrtá v Cy5 (externí kontrola, která se používá místo izolační kontroly v soupravě DB-1255). 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, 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 s kitem COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit 2 a jeho použitím.

## 7 Seznam kompatibilních prostředků

**REF** DB-1206 Automated RNA Isolation Kit

**REF** DB-1214 Agilent Bravo Installation Package for Automated RNA Isolation Kit



## 8 Jednostránkový souhrnný protokol

### 8.1 Složky soupravy

Složky soupravy	Objem (μL)		Podmínky skladování	Popis a barva víčka
	100rxns	1000rxns		
Enhancer mix (4x)	500	5000	-20 °C	1
Primer mix (4x)	500	5000	-20 °C	2
Enzyme mix (4x)	500	5000	-20 °C	3
Positive control	150	2x 750	-20 °C	4
Isolation control	150	2x 750	-20 °C	5

### 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 5 μL vzorku (izolované RNA), zalepte destičku optickou fólií a co nejdříve spusťte RT-PCR reakci.
- Pro pozitivní a negativní kontrolu přidejte místo vzorku 5 μL pozitivní (vialka č. 4) nebo negativní kontroly.

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
Isolation control (volitelné)	5	0.1	10
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	72	40
Hold time hh:mm:ss	00:10:00	00:02:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Plate read	NO	NO	NO	YES	NO	NO

Snímání musí být nastaveno pro současnou detekci kanálů FAM, HEX, ROX 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
	Upper limit of temperature / Horní mez teploty* (*pro X odpovídající konkrétní teplotě)
	Do not use if package is damaged / Nepoužívat, jestliže je balení poškozeno
	Use by date / Použit do data
	Do not reuse / Nepoužívat opětovně
	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>