



DB-1254

COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit 2

Návod k použití

Verze návodu: DB-1254-004-230922

Revize: 1.3 CZ

Poslední aktualizace: 22.09.2023



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 materiálů.....	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.....	15
5.9	Analýza dat.....	15
5.9.1	Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (Ct).....	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, 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 slabě s Ct > 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 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 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 Ct > 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 µL 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_{95%} pro jeden nebo dva nebo tři pozitivní kanály ze tří sledovaných

DB-1254	LOD _{95%} v jamce	LOD _{95%} mL ⁻¹ (5 µL 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 Ct jako průměr získaných Ct hodnot. V **Tabulce 2, 3 a 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 Ct

Kit	RNA	Kanál	Očekávané hodnoty Ct		
			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)

*Počet kopií izolační kontroly (IC) je ve všech třech reakcích shodný.

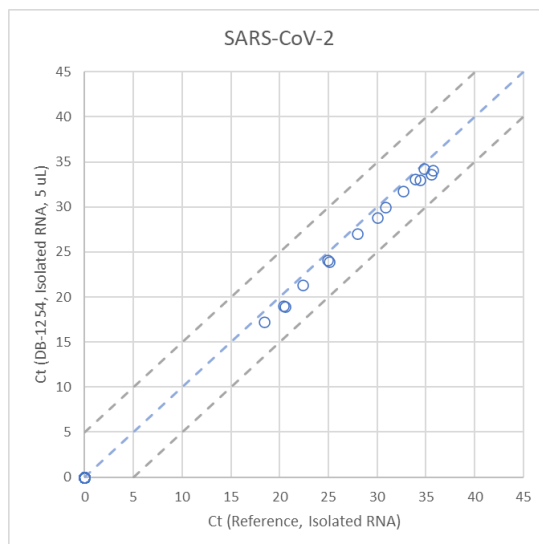
2.4 Klinická výkonnost, souhrnné výsledky

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 Ct 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“).

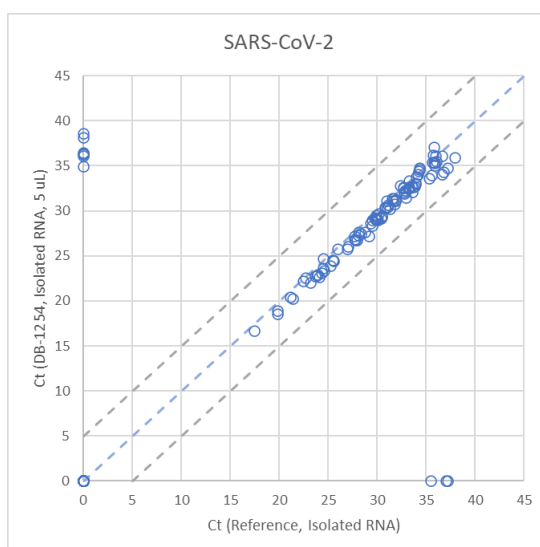


„Positive percent agreement“ (PPA) prostředku dosáhl ve vzorcích slin a stěrů pro SARS-CoV-2 97.5 %, zatímco „negative percent agreement“ (NPA) dosáhl 100.0 %. Hodnoty PPA i NPA prokazují, že prostředek je vhodný a účinný pro detekci viru SARS-CoV-2.



Obrázek 1: Porovnání naměřených Ct pro vzorky nosohltanových stěrů s referenčními měřeními

Na ose y grafu je vynesena minimální hodnota Ct ze dvou, příp. tří kanálů soupravy DB-1254, které je 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 vynesena průměr obou Ct. 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 Ct 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 Ct pro vzorky slin s referenčními měřeními



Na ose **y** grafu je vyneseno odpovídající kanál soupravy DB-1254. Konkrétně je vyneseno minimální Ct ze 2, příp. 3 kanálů (**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-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 Ct >30 a zároveň hodnoty Ct 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 ⁽²⁾	FP ⁽¹⁾	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 Ct v alespoň jedné ze souprav pod 37 cyklů. Následně byly vzorky změřeny soupravou DB-1254 a vzorky, které měly Ct 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 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-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 Ct >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.

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, ROX a Cy5– **postupujte podle návodu poskytnutého výrobcem daného přístroje**
- Kalibrované jednonálové/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 ^[8]	Složky soupravy ^[8]	REF kód ^[7]	Objem (μL) ^[6]	Podmínky skladování	Popis a barva víčka
DB-1254-100rxns	Enhancer mix (4x)	RF00506	500	≤ -18 °C ^[2,3]	1
	Primer mix (4x)	RF06288	500	≤ -18 °C ^[1,2,3]	2
	Enzyme mix (4x)	RF07929	500	≤ -18 °C ^[2,3]	3
	Positive control	RF09960	150	≤ -18 °C ^[2,3]	4
	Isolation control ^[4]	RF05323	150	≤ -18 °C ^[2,3]	5
DB-1254-1000rxns	Enhancer mix (4x)	RF00506	5000	≤ -18 °C ^[2,3]	1 ^[5]
	Primer mix (4x)	RF06288	5000	≤ -18 °C ^[1,2,3]	2 ^[5]
	Enzyme mix (4x)	RF07929	5000	≤ -18 °C ^[2,3]	3 ^[5]
	Positive control	RF09960	2x 750	≤ -18 °C ^[2,3]	4
	Isolation control ^[4]	RF05323	2x 750	≤ -18 °C ^[2,3]	5



[1] Uchovávejte na temném místě (obsahuje látky, které jsou citlivé na světlo). **[2] Skladujte celou soupravu 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 rozalíkvotujte 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 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 -18 °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, rozalíkvtujte 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 rozalíkvtováno a zamrazeno co nejdříve po přípravě master mixu. Je nutné zamrazení při teplotě ≤ -70 °C a následně je možné skladovat až 1 měsíc při teplotě -70 °C nebo nižší (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 -18 °C nebo nižší.

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 cyklieru). 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 ^[1]	5	500
Primer mix (4x)	2 ^[1]	5	500
Enzyme mix (4x)	3 ^[1]	5	500
Isolation control (volitelné) ^[2]	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 při teplotě ≤ -70 °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 teplotě -70 °C nebo nižší. 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 při teplotě ≤ -70 °C,** připravte od každého z roztoků Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x) 10 alikvotů po 510 μ L. Tyto alikvoty uchovejte při teplotě ≤ -18 °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 μ L. Tyto alikvoty mohou být uchovány podle potřeby optimálně při teplotě ≤ -70 °C, ale lze je skladovat i při teplotě ≤ -18 °C.

Alikvotování izolační kontroly

Z dodaných vialek si připravte z každé pět jednorázových alikvotů izolační kontroly, každý s objemem 150 μ L. Tyto alikvoty mohou být uchovány podle potřeby optimálně při teplotě ≤ -70 °C, ale lze je skladovat i při teplotě ≤ -18 °C.

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

5.7 Přidání vzorku do RT-PCR reakce

Přidejte 5 μ L vzorku do jamek/mikrozkumavek, které obsahují 15 μ L 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 μ L Positive control z vialky č. 4 (červené víčko ●)**. V případě negativní kontroly přidejte místo vzorku buď **5 μ L RNA izolované ze známého negativního vzorku** nebo **5 μ L elučňícího pufru** ze soupravy pro izolaci RNA anebo **5 μ L ultračisté / PCR grade vody** (viz kapitola 5.3). Celkový objem reakce po přidání vzorku nebo kontrol je 20 μ L.

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 (Ct)

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 Ct 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 Ct 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 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 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 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 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 Ct posunout o rozdíl mezi vámi určenou hodnotou Ct pozitivní kontroly a referenční hodnotou Ct (28. cyklus pro kanály FAM a HEX a 27. cyklus pro kanál ROX). Například, pokud vámi určená hodnota Ct FAM kanálu pro pozitivní kontrolu bude 24, tak pro aplikaci **Tabulky 10** buď přičtete 4 cykly k hodnotám Ct klinických vzorků, anebo 4 cykly odečtete od prahových Ct v **Tabulce 10**.

** 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.*

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 Ct 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 Ct 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 μ 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 negativní kontrola prošla izolací, pokud přidáváte 5 μ L negativní 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 Ct 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 Ct > 37, je nutné zkontrolovat amplifikaci kontroly v Cy5. V případě, že je Ct 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 (Ct) v každém kanálu a výsledky interpretujte dle **Tabulky 10** 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 FAM, HEX i ROX kanál 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 10** přepočítat, jak je uvedeno výše v kapitole 5.9.1.



Tabulka 10: Interpretace výsledků

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

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

[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 µL), hodnota Ct 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 **Obrazek 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 Ct okolo 35. cyklu nebo vyššími. Pokud by signál pozitivních virových kanálů byl vysoký (Ct < 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 Ct 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 Ct 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 Ct 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 Ct > 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.

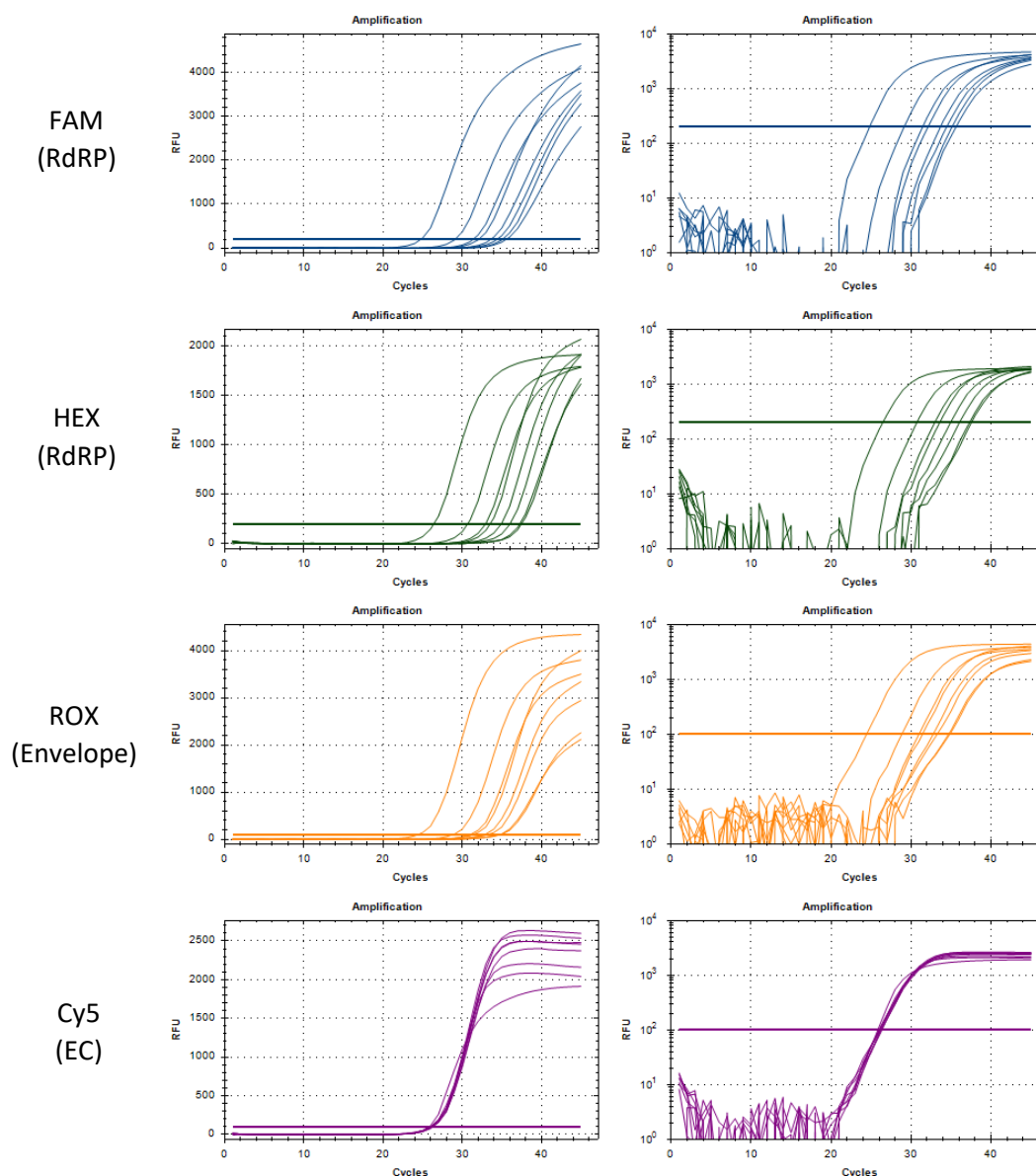
[9] V jakémkoliv kanále může dojít k autofluorescenci vzorku projevující se vysokou fluorescencí od brzkých cyklů PCR protokolu, typicky s Ct < 10 a s koncovou fluorescencí v řádu stovek RFU. Nejčastěji se autofluorescence vyskytují v kanále ROX.

[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, 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 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
- REF** DB-1225 Saliva Collection Set 1.4IM
- REF** DB-1230 Saliva Collection Set 1.4IF



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	≤ -18 °C	1
Primer mix (4x)	500	5000	≤ -18 °C	2
Enzyme mix (4x)	500	5000	≤ -18 °C	3
Positive control	150	2x 750	≤ -18 °C	4
Isolation control	150	2x 750	≤ -18 °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)
	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>

