

**EliGene® COVID19 UKV RT****REF****90082-RT (pro 100 stanovení)****90082-RT-500 (pro 500 stanovení)****Složení soupravy:**

90082-RT (pro 100 stanovení):
5 x 300 µl CoV UKV Mix
2 x 55 µl Enzyme Mix
2 x 260 µl IC RNA
1 x 150 µl PC CoV UKV
1 x Návod na použití

90082-RT-500 (pro 500 stanovení):
5 x 1450 µl CoV UKV Mix
2 x 280 µl Enzyme Mix
2 x 1300 µl IC RNA
1 x 150 µl PC CoV UKV
1 x Návod na použití

Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

Účel použití

Souprava EliGene® COVID19 UKV RT je určena pro kvalitativní detekci RNA viru SARS-CoV-2 souběžně s genotypizační mutací N501Y a P681H přítomných ve spike proteinu charakteristických pro variantu B.1.1.7 (20I/501Y.V1) nazývanou také britská varianta.

Princip metody

Tato diagnostická souprava je založena na reverzní transkripci virové RNA SARS-CoV-2 a následné jednorukové analýze qPCR. Detekce SARS-CoV-2 se provádí amplifikací dvou nezávislých cílů zaměřených na gen RdRp a gen E (kanál FAM). Jedinečně navržená vnitřní kontrola, která se používá pro monitorování správného průběhu zpracování vzorku (včetně izolace RNA, reverzní transkripce a qPCR), je zaznamenána v HEX kanálu. Specifické genotypizační sondy zaměřené na mutace N501Y a P681H se zaznamenávají v kanálu Cy5 a TexasRed paralelně s detekcí SARS-CoV-2. Zvýšená citlivost a specificita této soupravy je založena na amplifikaci více nezávislých cílů pro virus SARS-CoV-2 v jedné reakci qPCR.

Obecný úvod

Na konci prosince 2019 se ve Wu-chanu v provincii Hubei v Číně vyskytlo ohnisko neznámé choroby zvané pneumonie z neznámé příčiny. Příčinný virus byl pojmenován jako „severe acute respiratory syndrome coronavirus 2“ (**SARS-CoV-2**) a příslušná infekční choroba byla pojmenována jako koronavirová nemoc 2019 (COVID-19). Koronaviry byly objeveny v 60. letech 20. století a byly zařazeny do čeledi Coronaviridae, což je největší rodina řádu Nidovirales. SARS-CoV-2 je obalený sférický virus s jednovláknovou RNA s pozitivní polarizací, který se vyznačuje tím, že z povrchu virionu vyčnívají „spike“ proteiny. Jedná se o obalený virus (obal je lipidová dvojvrstva odvozená od membrány hostitelské buňky) s virovou strukturou tvořenou primárně ze strukturálních proteinů jako je spike protein (S), membránový protein (M), obalový protein (E), nukleokapsidový protein (N) a hemagglutinin-esteráza (HE). Pro replikaci a transkripci se používá komplex multiproteinových replikáz-transkriptáz. Tento komplex obsahuje konzervovaný RdRp protein (RNA-dependentní RNA polymeráza) jako hlavní protein replikázy-transkriptázy pro zpětnou syntézu subgenomických vláken RNA z virové RNA a transkripci molekul subgenomové RNA z odpovídajících mRNA v pozitivním směru. RNA genom koronavirových je druhým největším ze všech RNA virů, SARS-CoV-2 má velikost 29,9 kilobází.



V prosinci 2020 byly správní orgány Spojeného království upozorněny na vznik varianty SARS-CoV-2 genetické linie B.1.1.7. Spike protein linie B.1.1.7 obsahuje 8 mutací: jedna mutace (N501Y) v RBD, tři mutace (Δ H69 / V70, Y144 a A570D) v rámci S1 a čtyři mutace (P681H, T716I, S982A a D1118H) v rámci S2. Varianta B.1.1.7 byla izolována koncem září a na začátku prosince představovala ve Velké Británii více než 60 % případů. Podle výsledků *in silico* analýz sekvenovaných různých genetických linií SARS-CoV-2 je společný výskyt obou mutací N501Y a P681H specifický pro genetickou linii B.1.1.7.

Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:

Doporučená izolace NK:

Stěry (nosohltan, bukalní),
sliny, sputum, moč

Manuální: **EliGene Viral RNA/DNA FAST Isolation kit** (15 min protokol)
chemagic Viral DNA/RNA Kit (chemagen - PerkinElmer)
QIAamp Virus Spin Kit nebo kity dle doporučení by Qiagen
Vakuum/centrifugace: EliGene Viral RNA/DNA FAST 96 Vacuum Isolation Kit (<40 min/96 vzorkový protokol)

Sérum, plasma

chemagic Viral DNA/RNA Kit (chemagen - PerkinElmer)
QIAamp Virus Spin Kit nebo kity dle doporučení by Qiagen

Automatická izolace:

ZEPHYRUS Magneto automat (ELISABETH PHARMACON)

Kity dle aktuálního doporučení

chemagic 360 izolační automat (chemagen - PerkinElmer)

chemagic Viral DNA/RNA Kit

chemagic Viral NA/gDNA Kit

QIAcube izolační automat (Qiagen)

Kity dle aktuálního doporučení

EliGene® COVID19 UKV RT (90079-RT a 90079-RT-500) je určen k primární detekci viru SARS-CoV-2 se současnou genotypizací mutací N501Y a P681H charakteristických pro variantu B.1.1.7 (20I / 501Y.V1) také známý jako britská varianta. Sada je doplňkem sad EliGene® COVID19 BASIC A RT (90077-RT), EliGene® COVID19 BASIC A500 RT (90077-RT-500), EliGene® COVID19 CONFIRM RT (90078-RT), EliGene® COVID19 CONFIRM 500 RT (90078-RT-500) a EliGene® COVID19 Triple RIC RT (90079-RT a 90079-RT-500). Interní kontroly všech souprav EliGene® pro detekci viru SARS-CoV-2 jsou identické, proto lze RNA izolovanou interní kontrolou ze soupravy BASIC, CONFIRM nebo Triple RIC analyzovat pomocí EliGene® COVID19 UKV RT a naopak.

RNA se doporučuje eluovat do vody pro molekulární biologii. Vzhledem ke složení elučních pufrů některých výrobců může dojít k inhibici PCR reakce sloučeninami elučního pufru. Eluční pufr EliGene virové RNA/DNA FAST izolační soupravy lze použít bez obav z inhibice PCR, stejně jako eluční pufrы izolačních souprav doporučených výše. Pokud máte v úmyslu použít izolační soupravy od jiných výrobců, musí být k izolaci RNA přidána interní kontrola amplifikace (RNA) obsažená v této soupravě, aby byla vyloučena inhibice elučním pufrém.

Sérum nebo plazma:



Podle standardního postupu odeberte vzorek séra do sterilní zkumavky. Vzorky přepravujte při 4 °C do laboratoře. Vzorky séra jsou za těchto podmínek stabilní maximálně 4 dny. Pro delší skladování zamrazte vzorek na -70 °C.

Doporučujeme použít objem 200 µl séra a eluční objem 50 µl vody PCR. Před izolací musí být ke 200 µl vzorku přidán lyzační roztok a poté 5 µl interní kontroly RNA (IC RNA).

Stěry:

Stěry odebírejte dle standardního protokolu do odběrových zkumavek.

Doporučené odběrové tampony:

Flocked swabs (tampony vyrobené technikou semišování) po provedení stěru vkládat do transportního média pro viry.

Nepoužívejte bavlněné tampony z důvodu možné inhibice PCR reakce. Pro transport nepoužívejte suché tampony!

Vzorky by měly být přepravovány do laboratoře při 4 °C (modrý led). Stěry z oropharyngu i nasopharyngu jsou při 4 °C v transportním médiu pro viry stabilní minimálně 3 dny od odběru vzorků. Pro delší skladování zamrazte

vzorek na -70 °C.

Další možností je používání inaktivačních transportních médií. **Každé inaktivační médium musí být validováno pro použitou metodu izolace RNA!**

V případě odběru vzorků do transportního média by mělo být pro izolaci RNA použito 200 µl nebo množství doporučené v návodu k použití použité izolační soupravy. Po přidání lyzačního pufru musí být do 200 µl vzorku

použitého k izolaci RNA přidáno 5 µl RNA interní kontroly (IC RNA).

Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Automatické pipety 1-1000 µl a sterilní špičky s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE).
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodný pro daný qPCR přístroj. Vždy používejte pouze originální plasty nebo plasty doporučené výrobcem příslušného systému qPCR. **Použití neoriginálního plastu může vést k potížím s odečtením fluorescence a stanovením prahové hodnoty. Při použití neoriginálních nebo neschválených plastů nemůžeme zaručit správnou interpretaci výsledků.**
- Sterilní stojánek bez DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Zařízení pro qPCR – souprava je určena pro qPCR přístroje LightCycler® 480 (Roche; **je nezbytná kompenzace fluorescenčních barev pomocí kitu Elisabeth Pharmacon!!!, objednejte si EliGene® 4-channel Color Compensation Kit, (kat. č. 90080-CC),** QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific), Rotor-Gene Q (Qiagen) a CFX96 (Bio-Rad). RT-qPCR pro detekci a genotypizaci RNA SARS-CoV-2 RNA využívá technologii TaqMan (sondy FAM, HEX, Texas Red a Cy5) a lze ji provádět na jiných přístrojích, které mohou pracovat s těmito kanály.
- **Laboratorní ochranné rukavice a respirátory FFP3. Pracujte prosím v příslušných boxech pro biologické nebezpečí. Také odštěďování vzorků musí být prováděno v boxech pro biologické nebezpečí. Mějte na paměti, že i virová RNA může způsobit infekci.**
- **Protože se jedná o závažný patogen, dodržujte prosím aktuální doporučení WHO pro laboratoře BSL2+ nebo BSL3.**

Konfigurace qPCR přístroje



- Pro detekci cílových sekvencí SARS-CoV-2 se používají dvě sondy značené FAM (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci Interní kontroly je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm)
- Pro detekci mutace P681H je použita sonda značená TexasRed barvou (exc. 589 nm – em. 615 nm)
- Pro detekci mutace N501Y je použita sonda značená Cy5 barvou (exc. 650 nm – em. 670 nm)

LightCycler® 480 (Roche):

Používejte prosím bílé destičky určené pouze pro LightCycler® 480 II. Použití průhledných desek může vést ke snížení citlivosti soupravy. Nepoužívejte destičky opakovaně; během manipulace s deskami může dojít ke kontaminaci vaší laboratoře.

Vytvoření detekčního profilu:

Otevřete „Panel nástrojů“ v „Hlavní nabídce“ (ikona s klíčem) a vyberte „Formáty detekce“. Vyberte detekční formát „Nový“ a přiřaďte mu název podle vašeho výběru. V matici excitačních a emisních spekter v pravém horním rohu klikněte na políčka s následujícími kombinacemi:

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time
465	510	FAM	1	10	2
533	580	HEX	1	10	2
533	610	TexasRed	1	10	2
618	660	Cy5	1	10	2

V nabídce „Detection format“ zvolte formát který jste vytvořili.

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 - Analysis mode "None", 1 Cycle

55°C 15 min Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

Step 2 - Analysis mode "None", 1 Cycle

95°C 2 min Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

Step 2 - Analysis mode "Quantification", 45 Cycles

95°C 5 s Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

55°C 15 s Ramp rate (2.2°C/s) Acquisition mode "Single"

67°C 15 s Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

Step 3 - Analysis mode "None", 1 Cycle

40°C 20 s Ramp rate (2.2°C/s) Acquisition mode "None"

Kompletní teplotní profil může být také nahrán z Run Template „EliGene COVID19 UKV RT_LC480.ixi“. Run Template může být importován do softwaru v menu „Navigator“ kliknutím na ikonu „Import“ z CD přiloženého v kitu.

QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type, „Presence/Absence“, Chemistry „TaqMan Probes“ a Run Mode „Standard“. Jako reportér používají barviva FAM (SARS-CoV-2), VIC (IC RNA), ROX (P681H) a Cy5 (N501Y). **Nepoužívejte žádné pasivní referenční barvivo!**

**Nastavte následující teplotní profil:***Udržovací fáze (Holding stage)*

55°C 15 min Ramp rate (1.6°C/s)

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min Ramp rate (1.6°C/s)

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cyklů

95°C 5 s Ramp rate (1.6°C/s)

55°C 15 s Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON

67°C 15 s Ramp rate (1.6°C/s)

Post-Read Stage

40°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s)

Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 55 °C.

Kompletní teplotní profil lze nahrát ze šablony spuštěním „EliGene COVID19 UKV RT_QS3.edt“ nebo „EliGene COVID19 Triple RIC RT_QS5.edt“. Šablonu pro spuštění lze zkopírovat z disku CD, který je součástí sady.

RotorGene Q (Qiagen):

V okně “New Run” vyberte volbu “Three Step”

Vyberte příslušný typ rotoru “Rotor Type” a klikněte na tlačítko “Next”.

Nastavte následující teplotní profil:*Udržovací fáze (Holding stage)*

55°C 15 min

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cyklů

95°C 5 s

55°C 15 s Odečet signálu v kanálech (Acquiring in channels) "Green", "Yellow", "Orange" and "Red"

67°C 15 s

Udržovací fáze (Holding stage)

40°C 20 s

Pro možnost “Gain Optimization” vyberte možnost "Automatic gain optimization before first acquisition". Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene COVID19 UKV RT_Q-GENE.ret". Šablonu pro spuštění lze zkopírovat z disku CD, který je součástí sady.

CFX96 Touch (Bio-Rad):

V úvodní možnosti “Startup Wizard” založte “New Experiment” a vytvořte nový protokol “Create New Protocol”.

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 55°C 15 min

Step 2 95°C 2 min

Step 3 95°C 5 s

Step 4 55°C 15 s + Plate Read



Step 5 67°C 15 s

Step 6 GOTO Step 3 44x

Step 7 40°C 20 s

Doplňte "Sample Volume" na 20µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 4 při 55 °C.

Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM, HEX TexasRed a Cy5. Označte pozice s umístěnými vzorky jako „Unknown“ vzorky nebo „Standard“. Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene COVID19 UKV RT_CFX.pcr1" anebo může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

Příprava reagensí

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkušavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagenty zcela rozmražené, krátce promíchané na vortexu a krátce stočené.
- 5 µl interní kontroly RNA (IC RNA) přidávejte až po přidání lyzačního roztoku do vzorku. V žádném případě nepřidávejte interní kontrolu k izolované RNA až těsně před PCR analýzou!

VAROVÁNÍ: Je možná kontaminace v laboratorním prostoru! Používejte samostatnou pipetu pro Master Mixy, samostatnou pipetu pro pozitivní kontroly a samostatnou pipetu pro vzorky! Dodržujte všechna doporučení pro laboratoře provádějící analýzy RNA.

Příprava reakčního mixu

1. Vezměte zkušavku označenou CoV UKV Mix a zkušavku Enzyme Mix a rozmrazte při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce odstředte v centrifuze. Připravte Master Mix smícháním 14 µl CoV UKV Mixu a 1 µl Enzyme Mixu na reakci a krátce odstředte.
2. Detekce: Přidejte 15 µl Master Mixu do amplifikačních zkušavek nebo destiček a přidejte 5 µl izolovaného vzorku RNA. Při pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili křížové kontaminaci vzorků. Připravený Master Mix by měl být použit do 30 minut a nelze jej znovu použít. Připravený Master Mix nemrazte.
3. Pozitivní kontrola: Napipetujte 15 µl Master Mixu samostatně do amplifikační zkušavky nebo destičky. Poté přidejte 5 µl PC CoV UKV. Při pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. **K pipetování pozitivních kontrol použijte mikropipetu určenou pouze pro pipetování pozitivních kontrol.**

Vložte mikrozkušavky nebo destičku do qPCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace qPCR přístroje výše.

Odečet výsledků

LightCycler® 480 (Roche):

V nabídce "Sample Editor" zvolte možnost "Abs Quant".

V nabídce "Analysis" zvolte možnost "Abs Quant/2nd Derivative Max".

Je nutné provést analýzu dat s aktivní kompenzací barev. Jinak nelze data z kanálu HEX a Texas Red interpretovat. Vyberte soubor kompenzace barev pro FAM, HEX, TexasRed a Cy5.

Pozitivní výsledek na SARS-CoV-2: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (465-510). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.



Pozitivní výsledek pro P681H mutaci: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu TexasRed (533-610). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Pozitivní výsledek pro N501Y mutaci: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu Cy5 (618-660). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (533-580).

QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

V nabídce "Analyse Settings" vyberte možnosti "Automatic Threshold" a "Automatic Baseline" a zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek na SARS-CoV-2: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek pro P681H mutaci: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu TexasRed (ROX). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Pozitivní výsledek pro N501Y mutaci: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu Cy5. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX (VIC) kanálu.

Rotor-Gene Q (Qiagen):

Klikněte v hlavní nabídkové liště na ikonu "Analysis" a vyberte Analýzu "Quantitation". V okně „Quantitation Analysis“ zvolte možnosti "Dynamic Tube" a "Slope Correct". V nabídce "Outlier Removal" nastavte NTC Threshold na 10 %.

Pozitivní výsledek na SARS-CoV-2: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (Green). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek pro P681H mutaci: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu TexasRed (Orange). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Pozitivní výsledek pro N501Y mutaci: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu Cy5 (Red). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (Yellow).

CFX96 Touch (Bio-Rad):

V okně "Data Analysis" zvolte možnost "Quantification". V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Setting“ a vyberte „Baseline Subtracted Curve Fit“ a možnost „Apply Fluorescence Drift Correction“.

V okně "Data Analysis" zvolte jeden fluorofor (FAM, HEX, TexasRed, Cy5) kliknutím na políčko vedle názvu fluoroforu pod grafem zesílení a přečtěte si výsledky pro jednotlivé vzorky.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2: V nabídce „Nastavení“ vyberte možnost „Baseline Threshold“ a nastavte „Single Threshold“ na hodnotu „Auto Calculated“. Pozitivní výsledek je charakterizován růstem fluorescenčního signálu v kanálu FAM. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Pozitivní výsledek pro P681H mutaci: V nabídce „Nastavení“ vyberte možnost „Baseline Threshold“ a nastavte „Single Threshold“ na hodnotu „Auto Calculated“. Pozitivní výsledek je charakterizován růstem fluorescenčního signálu v kanálu TexasRed. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Pozitivní výsledek pro N501Y mutaci: V nabídce „Nastavení“ vyberte možnost „Baseline Threshold“ a nastavte „Single Threshold“ na hodnotu „Auto Calculated“. Pozitivní výsledek je charakterizován růstem fluorescenčního



signálu v kanálu Cy5. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. V nabídce „Settings“ vyberte možnost „Baseline Threshold“ a nastavte "Single Threshold" na nastavte na hodnotu „Auto Calculated“. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu.

Interpretace výsledků

Negativní výsledek:

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM před 40. cyklem, s příslušným nastavením baseline hodnoty, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně negativní nebo s koncentrací RNA pod detekčním limitem soupravy (15 genomových RNA/reakci). Signál pro interní kontrolu (IC RNA) musí být pozitivní (viz kapitola Kontrola kvality). Pozitivní signál v kanálech TexasRed a Cy5 sami o sobě neznamenaají přítomnost SARS-CoV-2 viru ve vzorku, pokud zároveň není pozitivní signál v kanálu FAM. **U slabě pozitivních vzorků, kdy je hodnota Ct vyšší než 30 v kanálu pro FAM pro detekci koronaviru, nemusí být pozitivita pro mutace správně odečitatelná.**

Výsledek nevylučuje přítomnost infekce virem SARS-CoV-2 a určení mutací N501Y a P681H ve vzorku, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku i jeho zpracování. Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované RNA viru. **Bylo zjištěno, že viry mohou být vylučovány přerušovaně, a dokonce i u infikovaného pacienta může být hladina viru v klinických vzorcích v daných dnech pod detekčním limitem jakékoli metody RT-qPCR. Z tohoto důvodu se doporučuje provést alespoň dvě, nejlépe více RT-qPCR vyšetření u jednoho pacienta v průběhu několika dnů.**

Pozitivní výsledek:

Pokud se amplifikační signál v kanálu FAM, TexasRed a Cy5 objeví před cyklem číslo 40 s příslušným nastavením baseline hodnoty, je ve vzorku detekována RNA příslušného viru. **Je naprosto nezbytné vyhodnotit signál v každém kanálu zvlášť! Fluorescenční signál v kanálu FAM je silnější než ve zbývajících kanálech! Signál v kanálech Texas Red a Cy5 musí být vyhodnocen s ohledem na kanál FAM. Rozdíl mezi hodnotami počtu cyklů mezi kanály FAM a Texas Red / Cy5 by neměl být větší než 3.**

Je třeba dodat, že amplifikační signál pro obě mutace v kanálech Texas Red a Cy5 může být nerozeznatelný od pozadí u slabě pozitivních vzorků (počet cyklů vyšší než 30), i když je mutace přítomna. Hodnoty počtu cyklů v kanálech Texas Red a Cy5 musí ležet v rozdílu nejvýše 3 cyklů, pokud jsou přítomny obě mutace. Vyšší rozdíl znamená neprůkazný výsledek.

DŮLEŽITÉ!

Kvůli rychlému vývoji viru SARS-CoV-2 může v budoucnu dojít k nové mutaci a může se změnit definice variant. Doporučujeme uživatelům zkontrolovat nejnovější informace o klasifikaci SARS-CoV-2, aby se zabránilo možné nesprávné klasifikaci viru SARS-CoV-2. Důrazně se doporučuje provést sekvenování vzorků v konkrétním časovém úseku a oblasti (celý genom nebo jen část genomu viru SARS-CoV-2), aby bylo možné přesně identifikovat variantu viru SARS-CoV-2 přítomnou v dané oblasti!

Tato sada pro detekci a genotypizaci viru SARS-CoV-2 je určena pro rutinní screening velkých sad vzorků a neslouží k úplné genotypizaci variant viru SARS-CoV-2. Použití této sady nenahrazuje sekvenování.



Tabulka interpretace výsledků

SARS-CoV-2 FAM kanál	P681H Texas kanál	N501Y Cy5 kanál	Interpretace
Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Detekována varianta B.1.1.7 (20I/501Y.V1)
Pozitivní	Pozitivní	Negativní	Detekována jiná varianta SARS-CoV-2 viru*
Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Detekována jiná varianta SARS-CoV-2 viru, pravděpodobně jihoafrická nebo brazilská varianta**
Pozitivní (>30)	Negativní	Negativní	Varianta B.1.1.7 (20I/501Y.V1) nebo jihoafrická a brazilská varianta nemůže být určena
Pozitivní (<30)	Negativní	Negativní	Varianta B.1.1.7 (20I/501Y.V1) nebo jihoafrická a brazilská varianta není detekována

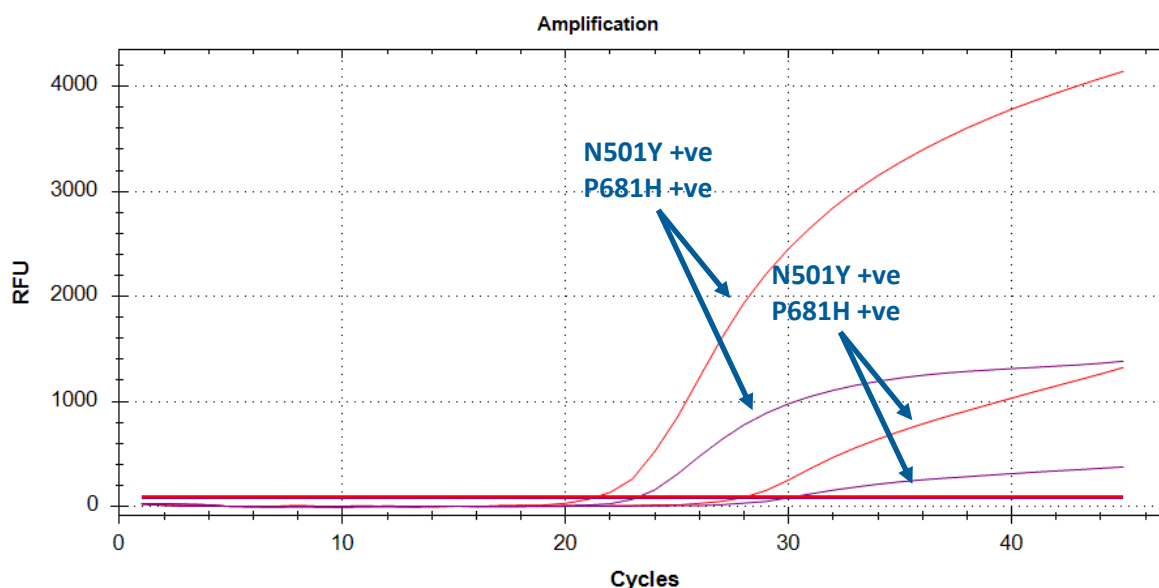
* Nedostatečná přítomnost N501Y nebo P681H může být známkou nové varianty. Doporučuje se provést sekvenování k potvrzení nepřítomnosti N501Y nebo P681H a identifikaci dalších klinicky důležitých mutací.

** Vzorek obsahuje detekovatelné množství specifické RNA pro variantu N501Y viru SARS-Cov-2, která je také známá jako jihoafrická, brazilská nebo jiná varianta.

Příklady čtení výsledků a interpretace:

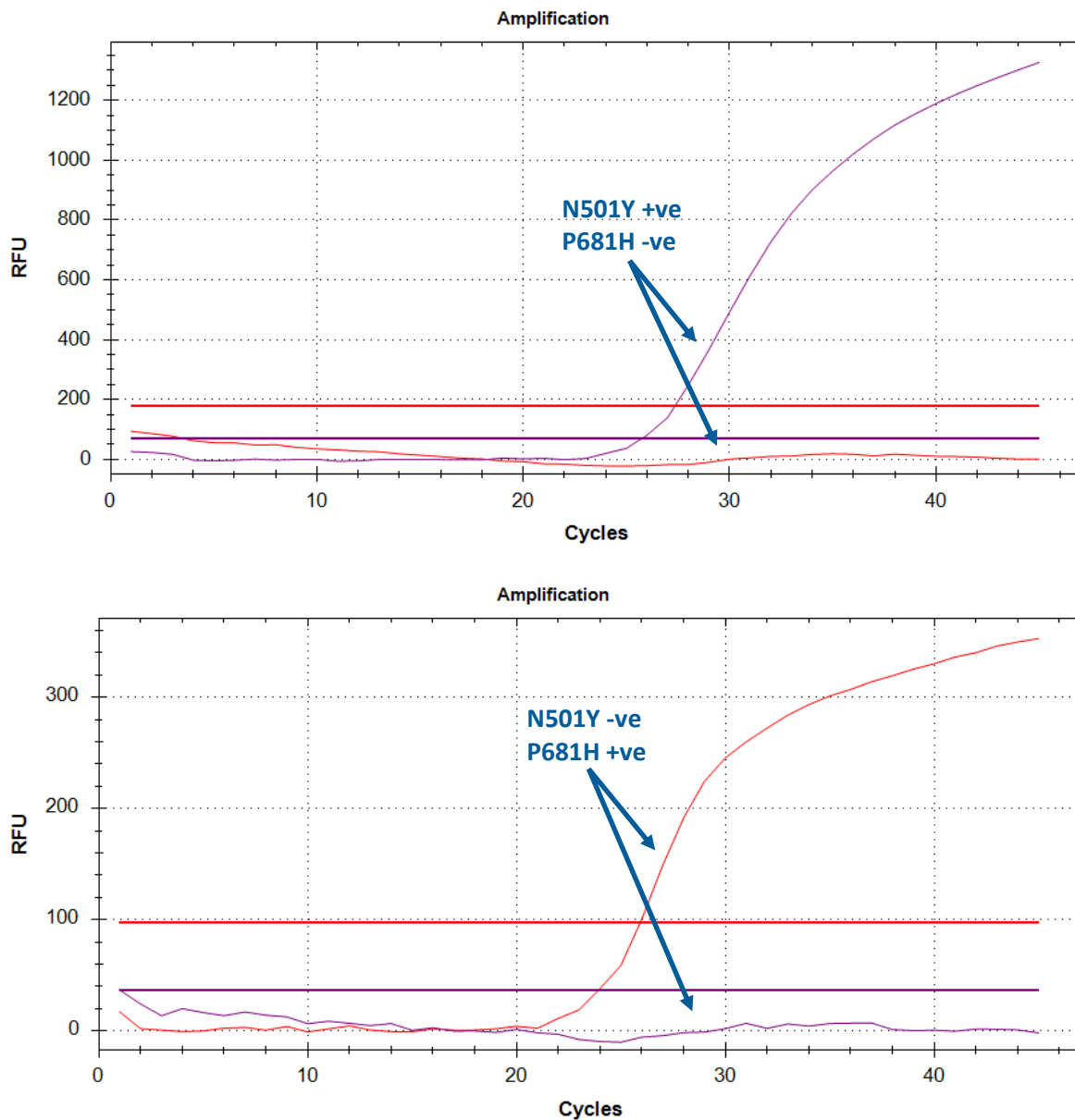
Oranžové a fialové křivky představují signály v kanálu Texas Red (P681H) a Cy5 (N501Y).

Současná přítomnost mutací N501Y a P681H ve vzorku



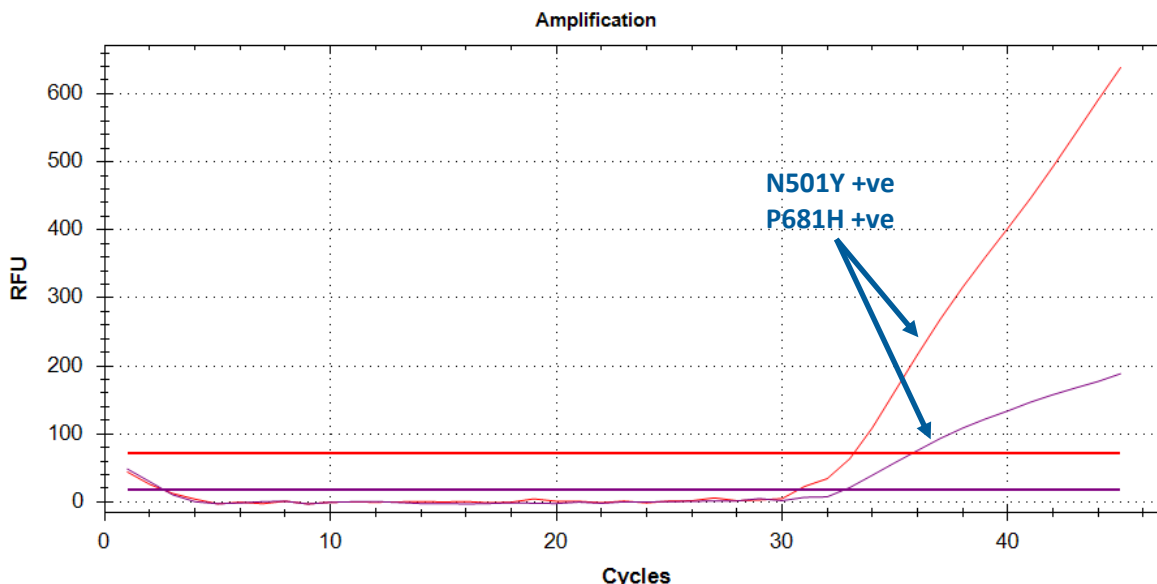


Přítomnost buď N501Y nebo P681H v různých vzorcích





Současná přítomnost mutací N501Y a P681H ve slabě pozitivním vzorku



Inhibovaný vzorek:

V případě, že v žádném z kanálů, včetně HEX kanálu pro IAC, není pozorováno zvýšení amplifikačního signálu, je třeba analýzu opakovat, nejlépe s nově izolovanými vzorky RNA. Ujistěte se, že eluční pufr neinhibuje reakci qPCR. V tomto případě se doporučuje provést eluci do vody pro molekulární biologii.

Kontrolní postup

Souprava EliGene® COVID19 UKV RT zahrnuje interní kontrolu (IC RNA). Interní kontrola sleduje kvalitu izolace RNA a detekuje inhibici procesu reverzní transkripce a amplifikace. Interní kontrola musí být přidána přímo do vzorku s lyzačním pufrem před izolací virální RNA. I v případě že nedojde k amplifikaci v kanálech FAM, TexasRed a Cy5, musí být přítomna amplifikace v kanálu HEX (amplifikace interní kontroly) nejvýše v 36. cyklu.

Kromě toho **hodnoty počtu cyklů všech vzorků podstupujících stejný postup izolace RNA musí mít hodnotu čísla cyklu IAC v kanálu HEX v rozsahu 3 cyklů**. Vyšší fluktuace hodnot počtu cyklů v jednom běhu qPCR naznačuje nestandardní podmínky v izolaci RNA. Tato podmínka se však nevztahuje na vysoce pozitivní vzorky (počet cyklů v kanálu FAM <20).

Referenční materiál:

Ke sledování celého vyšetřovacího procesu zahrnujícího izolaci RNA a detekci qPCR je možné použít referenční virový materiál pozitivní na SARS-CoV-2. Pozitivní komerční materiál není k dispozici. Nepoužívejte umělou RNA nebo DNA ani pozitivní kontroly od jiných výrobců.

Řešení problémů:

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly (IC RNA), může jít o závadu v postupu izolace RNA, nebo použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro qPCR.
2. Pokud je rozsah počtu cyklů interní kontroly amplifikace vyšší než 3 cykly, jedná se o pravděpodobně o nehomogenitu v izolaci RNA, která způsobila částečnou inhibici qPCR. V tomto případě je třeba zvážit opakování izolace RNA. Další možností je dvakrát nebo případně i vícekrát zředit izolovanou RNA.



3. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době expirace nebo o závalu na přístroji pro qPCR. Dále se může jednat o nedodržení doporučeného postupu při přípravě a vyhodnocení vzorku.

Funkční charakteristiky

Analytické funkční charakteristiky:

Analytická citlivost soupravy EliGene® COVID19 UKV RT definovaná jako nejnižší počet kopií genomové RNA přítomných v amplifikační reakci, kterou lze úspěšně amplifikovat ve 3 nezávislých opakováních, je 5 genomových RNA SARS-CoV-2 přidaných do Master Mixu. Citlivost postupu RT-qPCR závisí na metodě izolace RNA. Citlivost metody byla ověřena následovně. Byly připraveny série ředění pozitivní kontroly známé koncentrace. Byly testovány třikrát. Detekce SARS-CoV-2 byla 100% úspěšná ve všech vzorcích, které obsahují 5 nebo 50 a více RNA v Master Mixu.

Analytická citlivost je 5 kopií SARS-CoV-2 v reakčním Mixu.

Analytická specifita metody je 100 %. Všechny primery a sondy byly převzaty z odborné literatury a/nebo schváleny úřady jako WHO, CDC nebo ECDC. Kromě toho byla analytická specifita metody analyzována porovnáním sekvencí primerů a sond se všemi známými sekvencemi RNA a DNA v databázi GenBank a nebyla nalezena žádná křížová reakce. Nebyla nalezena žádná křížová reakce s lidským genomem.

Klinická specifita a senzitivita byla testována na 3439 klinických vzorcích SARS-CoV-2. Jako vzorky referenčního materiálu byla použita kombinace orofaryngeálních a nasofaryngeálních výtěrů. Vzorky byly nezávisle testovány soupravou EliGene® COVID19 UKV RT a referenční metodou - CE IVD soupravou EliGene® COVID19 CONFIRM RT.

Senzitivita a specifita SARS-CoV-2 detekce

A = 553 Skutečně pozitivní	B = 0 Falešně pozitivní
C = 0 Falešně negativní	D = 2886 Skutečně negativní

$$\text{Senzitivita} = A/(A+C) = 553/(553+0) = 100\%$$

$$\text{Specifita} = D/(D+B) = 2886/(2886+0) = 100\%$$

Klinická specifita a senzitivita soupravy EliGene® COVID19 UKV RT kit pro SARS-CoV-2 je 100%.

Specifita a senzitivita detekce mutací byla stanovena porovnáním výsledků ze sekvenace Spike proteinu u dvaceti vzorků s výsledky detekce soupravou EliGene® COVID19 UKV RT kit. Shoda byla 100% u všech vzorků s hodnotou CT nižší než 30.



Specifita a senzitivita detekce mutací

Vzorek	sekvenování		EliGene® COVID19 UKV RT	
	N501Y	P681H	N501Y	P681H
A2	WT	WT	negativní	negativní
A3	WT	WT	negativní	negativní
B2	WT	WT	negativní	negativní
B3	mutace	mutace	mutace	mutace
B4	WT	WT	negativní	negativní
C2	WT	WT	negativní	negativní
C3	WT	WT	negativní	negativní
C4	mutace	mutace	mutace	mutace
D2	mutace	mutace	mutace	mutace
D3	WT	WT	negativní	negativní
D4	mutace	mutace	mutace	mutace
E2	mutace	mutace	mutace	mutace
E3	mutace	mutace	mutace	mutace
E4	WT	WT	negativní	negativní
F2	WT	WT	negativní	negativní
F3	WT	WT	negativní	negativní
G2	WT	WT	negativní	negativní
G3	mutace	mutace	mutace	mutace
H2	mutace	mutace	mutace	mutace
H3	mutace	mutace	mutace	mutace

Analytická specifita a senzitivita pro detekci mutací **N501Y** a **P681H** je 100% u vzorků s Ct hodnotou pod 30.

Diagnostické výkonnostní charakteristiky:

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci 5×10^0 – 5×10^8 virových RNA molekul v reakční směsi.

Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality se používá interní kontrola (IC RNA) pro kontrolu procesu izolace RNA, reverzní transkripce a amplifikace DNA. Používá se pozitivní kontrola pro funkční kontrolu Master Mixu a jako referenční vzorek.

Limitace testovacího postupu

Senzitivita soupravy závisí na manipulaci se vzorkem (izolace RNA). Důrazně se doporučuje používat izolační sady a postupy doporučené v této příručce.

Negativní výsledek nevylučuje výskyt virové infekce. Výsledky tohoto testu závisí na správném odběru a zpracování vzorku. Výsledky jsou také závislé na dostatečném množství analyzované RNA. Přítomnost viru v klinických vzorcích infikovaných osob závisí na fázi infekce a může být přerušovaná. Konečný závěr k diagnostice a léčbě pacientů musí dát ošetřující lékař.

Biologické referenční intervaly



Žádné použitelné pro tuto soupravu.

Upozornění

Po smíchání je Master Mix stabilní po dobu 30 minut.
Nezamrazujte zkumavky s Master mixem opakovaně!
Nemíchejte komponenty kitů různých šarží

Obecná varování a bezpečnostní opatření

Tato souprava je určena pouze pro použití in vitro.

- Laboratorní ochranné rukavice a respirátory FFP3 jsou nezbytné pro práci. Pracujte prosím v příslušných Biohazard boxech. Také odstředování vzorků musí být prováděno v Biohazard boxech. Mějte na paměti, že i virová RNA může způsobit infekci.
- SARS-CoV-2 je velmi nebezpečný patogen, dodržujte aktuální nařízení a doporučení WHO pro laboratoře BSL2+ nebo BSL3!
- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů.
- Všechny centrifugy, mini centrifugy a vortexy používejte pouze v Biohazard boxu, abyste zabránili kontaminaci aerosolem.
- Pracujte se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Všechny použité pomůcky, špičky a pracovní materiály a oděvy považujte za potencionálně infekční a zlikvidujte podle platných předpisů a doporučení pro manipulaci s vysoce infekčním odpadem.
- Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být dekontaminován 3 % chlornanem sodným po dobu nejméně 30 minut anebo autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut před umístěním do odpadu.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Pracujte ve standardním režimu oddělených místností: izolace, PCR set up, amplifikace, detekce
- Před započítáním práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagensy poskytované v rámci kitu a reagensy doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagensy z různých šarží!
- Nepoužívejte reagensy ze souprav jiných výrobců!
- Neměňte doporučené protokoly PCR analýzy!

Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.



- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro RNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagensy by mělo být pracováno v PCR boxu. Připravujte reagenty určené pro amplifikaci odděleně. Automatické pipety užívané pro práci s reagensy musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty po amplifikaci je třeba zacházet maximálně opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků. Automatické pipety užívané pro práci s PCR produkty musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

Zkumavky obsahující CoV UKV Mix a Enzyme Mix jsou jednorázové, a proto je nutné je použít při přípravě reakční směsi pouze jednou

Mixy obsahují následující bezpečnostní upozornění (P):

P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít

P281 Podle potřeby používejte osobní ochranné prostředky.

Zkumavky obsahující IC RNA jsou jednorázové, a proto se musí použít pouze jednou při přípravě reakční směsi.

V případě jakýchkoliv problémů se obraťte na zákaznické centrum společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Literatura

Ashour HM, Elkhatab WF, Rahman MM, Elshabrawy HA. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. Pathogens. 2020 Mar 4;9(3). pii: E186. doi: 10.3390/pathogens9030186.

He F, Deng Y, Li W. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): What we know? J Med Virol. 2020 Mar 14. doi: 10.1002/jmv.25766.

Khan S, Siddique R, Shereen MA, Ali A, Liu J, Bai Q, Bashir N, Xue M. The emergence of a novel coronavirus (SARS-CoV-2), their biology and therapeutic options. J Clin Microbiol. 2020 Mar 11. pii: JCM.00187-20. doi: 10.1128/JCM.00187-20.

Maison DP, Ching LL, Shikuma CM, Nerurkar VR. Genetic Characteristics and Phylogeny of 969-bp S Gene Sequence of SARS-CoV-2 from Hawaii Reveals the Worldwide Emerging P681H Mutation. bioRxiv . 2021 Jan 7:2021.01.06.425497. doi: 10.1101/2021.01.06.425497. PMID: 33442699; PMCID: PMC7805472.



Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci)



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98\79\EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol s r.o.

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká Republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: info@elisabeth.cz