



EliGene[®] COVID19 CONFIRM RT

REF**90078-RT (pro 100 stanovení)**

Složení soupravy:

5 x 300 µl Confirm Mix
2 x 55 µl Enzyme Mix
2 x 260 µl IC RNA
1 x 150 µl PC SARS-CoV-2
1 x návod k 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

EliGene[®] COVID19 CONFIRM RT Kit je určen pro kvalitativní detekci RNA SARS-CoV-2 viru. Soupravu lze použít pro běžnou detekci i za účelem confirmace výsledků získaných jinou soupravou.

Princip metody

Tato diagnostická souprava je založena na reverzní transkripci virové RNA SARS-CoV-2 a následné jedнокrokové analýze pomocí qPCR. Použita je inovativní směs 3 sad primerů a 3 sond TaqMan (sondy označené FAM pro detekci virů a sondy označené HEX pro vizualizaci vnitřní kontroly) smíchané v hotové směsi SARS-CoV-2. Dva cíle amplifikují různé sekvence specifické pro SARS-CoV-2, ovšem jejich detekce probíhá v jediném kanálu. Tento postup zabezpečuje pozitivní výsledky i v případě mutace viru a byl zvolen s ohledem na jednoznačnou interpretaci výsledků a uživatelský komfort. Zároveň takový formát přispívá k vysoké citlivosti metody. Zvýšená citlivost a specifita této soupravy je založena na amplifikaci dvou nezávislých cílů SARS-CoV-2 v jediné PCR reakci. Jedná se o cíle v genu ORF1ab a v genu E v RNA sekvenci viru SARS-CoV-2. Primery a sondy použité v soupravě byly schváleny a doporučeny WHO. Veškeré specifické primery a sondy použité v soupravách jsou každý měsíc ověřovány na základě databáze GenBank s novými známými sekvencemi viru, aby byla kontinuálně zabezpečena úplná funkčnost souprav. Veškeré oligonukleotidy a cíle použité v této soupravě se liší od oligonukleotidů a cílů soupravy EliGene[®] COVID19 BASIC A RT, proto tyto soupravy lze používat nezávisle na sobě pro confirmaci nebo detekci v případě kontaminace laboratoře.

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 těžký akutní respirační syndrom koronavirus 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 hemaglutinin-esteráza (HE). RNA genom koronaviřů je druhým největším ze všech RNA virů, SARS-CoV-2 má velikost 29,9 kilobází.



Odběr vzorku, zpracování a uchovávání

Klinický materiál:

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

Sérum, plasma

Doporučená izolace NK:

Manuální: **EliGene[®] Viral RNA/DNA FAST Isolation Kit (15min protokol)**

chemagic Viral DNA/RNA kit (chemagen - PerkinElmer)

QIAamp DSP Virus Spin Kit nebo kity dle doporučení Qiagen

Vacuum/centrifugace: EliGene Viral RNA/DNA FAST 96 Vacuum Isolation Kit
(<40 min/96 samples protocol)

chemagic Viral DNA/RNA kit (chemagen - PerkinElmer)

QIAamp DSP Virus Spin Kit nebo kity dle doporučení Qiagen

Automatická:

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

kity dle aktuálního doporučení

EliGene[®] COVID19 CONFIRM RT (90078-RT) a EliGene[®] COVID19 CONFIRM 500 RT (90078-RT-500) jsou určeny k primární detekci viru SARS-CoV-2 a doplňují se soupravami EliGene[®] COVID19 BASIC A RT a EliGene[®] COVID19 BASIC A500 RT. Interní kontroly všech souprav EliGene[®] pro detekci viru SARS-CoV-2 jsou identické, proto lze RNA izolovanou interní kontrolou ze soupravy BASIC analyzovat soupravou CONFIRM a naopak. Soupravy EliGene[®] CONFIRM lze použít k potvrzení pozitivních nebo dubiozních výsledků z jiných detekčních souprav SARS-CoV-2 nebo mohou pomoci identifikovat zdroj kontaminace v laboratoři.

RNA se doporučuje eluovat do vody pro molekulární biologii. V důsledku složení elučních pufrů některých výrobců může dojít k inhibici PCR reakce sloučeninami v elučním pufru. Eluční pufr izolační soupravy EliGene Viral RNA/DNA FAST Isolation lze použít bez obav z inhibice PCR, stejně jako s elučními pufrů izolačních souprav doporučených výše. Pokud zamýšlíte použít izolační soupravy od jiných výrobců, musí být k izolaci RNA přidána interní kontrolní amplifikace (RNA) obsažená v této soupravě, aby bylo jisté, že je vyloučena inhibice elučním pufrům.

Sérum:

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 po té 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 Real-Time PCR přístroj.
- Sterilní stojánek pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Zařízení pro qPCR – souprava je optimalizována pro přístroje LightCycler[®] 480 (Roche), QuantStudio 3 a 5 (ThermoFisher Scientific), Rotor-Gene Q (Qiagen) a CFX96 Touch (Bio-Rad). RT-qPCR využívá detekci pomocí TaqMan technologie (FAM a HEX značené sondy) a může být použita i na dalších termocyklérech umožňujících detekci v těchto kanálech.
- **Laboratorní ochranné rukavice a respirátory FFP3. Pracujte prosím v příslušných boxech pro biologické nebezpečí. Také odstředování 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 jsou použity 3 sondy značené FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci Interní kontroly je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm)

LightCycler[®] 480 (Roche):

Pro reakci používejte pouze bílé destičky. Použití průhledných destiček může vést k poklesu citlivosti kitu. Nepoužívejte destičky opakovaně; při manipulaci s destičkou může dojít ke kontaminaci laboratoře.

V nabídce "Detection format" zvolte možnost "2 Color Hydrolysis probe".

**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_CONFIRM_LC480_v00.ixo". Run Template může být importován do softwaru v menu "Navigator" kliknutím na ikonu "Import" z CD přiloženého v kitu.

QuantStudio 3 a 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type, "Presence/Absence", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard".

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 může být nahrán jako Run Template "EliGene COVID19 CONFIRM RT_QS3_v00.edt" nebo "EliGene COVID19 CONFIRM RT_QS5_v00.edt". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

Rotor-Gene 600 nebo 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" and "Yellow"

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 CONFIRM RT_Q-GENE_v00.ret".

Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

CFX96 Touch (Bio-Rad):

V úvodní možnosti "Startup Wizard Create" založte nový "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 a HEX. Označte pozice s umístěnými vzorky s čtením v FAM a HEX kanálech jako „Unknown“ vzorky, případně „Standard“. Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene COVID19 CONFIRM RT_CFX_v00.prcl". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

Příprava reagensí

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagensie 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 vyizolované RNA až těsně před PCR analýzou!

VAROVÁNÍ: Je také 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 zkumavku označenou Confirm Mix a zkumavku Enzyme Mix a rozmrazte při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce odstředte v centrifuze. Připravte Master Mix smícháním 14 µl SARS-CoV-2 Mixu a 1 µl Enzyme Mixu na reakci a krátce odstředte.
2. Detekce: Přidejte 15 µl Master Mixu do amplifikačních zkumavek 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 zkumavky nebo destičky. Poté přidejte 5 µl PC SARS-CoV-2. 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".

V okně Analysis zvolte v nabídce "ColorComp" možnost "In Database" a "Universal CC FAM (510)-VIC(580)" Color kompenzaci.

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.

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 3 a 5 (ThermoFisher Scientific):

V nabídce "Analysis 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 (em. 518 nm). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (em. 548 nm).

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 k amplifikaci nedojde.

V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.



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 možnost "Quantification". V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Threshold“ a vyberte „Baseline Cycles“ možnost „Auto calculated“ a „Single Threshold“ možnost "Auto calculated".

Poté v okně "Data Analysis" vyberte jednotlivé fluorofory (FAM a HEX) kliknutím na box s jejich označení pod amplifikačním grafem a odečtěte výsledky jednotlivých vzorků.

Pozitivní výsledek na SARS-CoV-2: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (em. 518 nm). V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (em. 548 nm).

Interpretace výsledků

Negativní výsledek

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM před 40. cyklem, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně negativní nebo s koncentrací RNA pod detekčním limitem soupravy (5 genomových RNA/reakci). Signál pro interní kontrolu (IC RNA) musí být pozitivní (viz kapitola Kontrola kvality).

Výsledek **nevylučuje** přítomnost infekce virem SARS-CoV-2, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku i jeho zpracování. **Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované RNA viru SARS-CoV-2. Bylo zjištěno, že virus může být vylučován 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

Amplifikační signál se objeví ve FAM kanálu před 40. cyklem. SARS-CoV-2 RNA byla detekována ve vzorku. Vzorek je pozitivní na RNA SARS-CoV-2.

Inhibovaný vzorek

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu specifického pro SARS-CoV-2 v kanálu FAM a ani k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu HEX, je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky RNA. Ujistěte se, že eluční pufr neinhibuje reakci PCR. V tomto případě se doporučuje provádět eluce do vody pro molekulární biologii.

Kontrolní postup

Souprava EliGene[®] COVID19 CONFIRM RT zahrnuje interní kontrolu (IC RNA). Interní kontrola sleduje kvalitu izolace RNA a detekuje výskyt inhibice procesu reverzní transkripce a amplifikace. Pro kontrolu výtěžku izolace a výskytu inhibice při amplifikaci musí být před izolací RNA přidána přímo do vzorku interní kontrola (IC RNA). V případě, že vzorek je SARS-CoV-2 RNA negativní, Ct interní kontroly musí být Ct < 32.

Interní kontrola musí být přidávána přímo ke vzorku s lyzačním pufrem před zahájením izolace virové RNA.



Kromě toho hodnoty **počtu cyklů u všech vzorků, u kterých je RNA izolována stejným způsobem musí mít počet cyklu interní kontroly (IC) v kanálu HEX v rozsahu 3 cyklů**. Větší odchylka v hodnotě 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 všech postupů zahrnující RNA izolaci a qPCR detekci můžete použít referenční virový materiál pozitivní na SARS-CoV-2. Komerční pozitivní materiál není k dispozici. Nepoužívejte uměle vytvořené 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 závadu 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 CONFIRM RT je 5 genomových RNA přidaných do Master mixu. Citlivost metodiky byla ověřena následovně. Byla připravena ředící řada vzorků RNA pozitivních o známých koncentracích. Celkem byla testována třikrát. Detekce SARS-CoV-2 byla úspěšná na 100% u všech vzorků s koncentrací 5 a více kopií RNA přidaných do Master mixu.

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

Analytická specifita metody je 100%. Všechny primery a sondy byly schváleny a doporučeny WHO. Navíc byla analyzována analytická specifita metody porovnáním sekvencí primerů a sond se všemi známými sekvencemi RNA a DNA v databázi GenBank a nebyla zjištěna žádná zkřížená reakce. Nebyla nalezena žádná zkřížená reakce s lidským genomem.

Klinická specifita a senzitivita byla testována na 143 klinických vzorcích. Jako referenční materiál byly použity stěry z nosohltanu a sliny. Vzorky byly nezávisle testovány pomocí soupravy EliGene[®] COVID19 CONFIRM RT a čtyřmi referenčními metodami - metodou doporučenou WHO (Charité - Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill 2020;25) a třemi soupravami označenými CE IVD.

Souprava EliGene[®] COVID19 CONFIRM RT ukázala ve srovnání se dvěma referenčními metodami 100% shodu:

Skutečně pozitivní (A) = 61 (53 stěrů z nosohltanu, 8 vzorků slin)

Falešně pozitivní (B) = 0

Falešně negativní (C) = 0

Skutečně negativní (D) = 82



Senzitivita = $A/(A+C) = 61/(61+0) = 100\%$
Specifita = $D/(D+B) = 82/(82+0) = 100\%$

Klinická specifita a senzitivita soupravy EliGene® COVID19 CONFIRM RT je 100%.

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci $5 \times 10^0 - 5 \times 10^8$ 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 infekce SARS-CoV-2. Výsledky tohoto testu závisí na správném odběru a zpracování vzorku. Výsledky jsou také závislé na dostatečném množství analyzované SARS-CoV-2 RNA. Přítomnost SARS-CoV-2 RNA 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 in vitro použití.

- SARS-CoV-2 je velmi nebezpečný patogen, dodržujte aktuální nařízení a doporučení WHO pro laboratoře BSL2+ nebo BSL3
- 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.
- 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.



- 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.
- 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.
- Pracujete 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.
- 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.
- Pracujte ve standardním režimu oddělených místností: izolace, PCR set up, amplifikace, detekce
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započatím 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 reagensy 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 SARS-CoV-2 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:

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.

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.



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