



EliGene® COVID19 TRIPLE RIC RT

REF

90079-RT (pro 100 stanovení)

90079-RT-500 (pro 500 stanovení)

Složení soupravy:

90079-RT (pro 100 stanovení):	90079-RT-500 (for 500 stanovení):
5 × 300 µl CoVIR Mix	5 × 1450 µl CoVIR Mix
2 × 55 µl Enzyme Mix	2 × 280 µl Enzyme Mix
2 × 260 µl IC RNA	2 × 1300 µl IC RNA
1 × 150 µl PC CoVIR	1 × 150 µl PC CoVIR
1 × Návod na použití	1 × 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

Sada EliGene® COVID19 Triple RIC RT je určena pro kvalitativní detekci RNA sedmi typů a podtypů virů. V jedné reakci je detekován virus SARS-CoV-2, chřipkový virus typu A (H1N1, H3N2, H5N1), chřipkový virus typu B, respirační syncytiální virus A a respirační syncytiální virus B.

Princip metody

Tato souprava je založena na reverzní transkripci virové RNA viru SARS-CoV-2, chřipkových virů typu A a typu B a respiračního syncytiálního viru A / B a následně jednorukové analýze qPCR. Je použita inovativní směs 10 sad primerů a 4 sond TaqMan smíchaných v CoVIR Mixu připraveném k použití. Detekce SARS-CoV-2 se provádí amplifikací částí dvou nezávislých míst v genu RdRp a genu E (kanál FAM). Chřipkové viry typu A a B jsou detekovány v kanálu Cy5 a cílí na geny pro proteiny M1 a NS1. Respirační syncytiální viry A a B jsou detekovány v kanálu TexasRed a cílí na fragment genu pro nukleoprotein. Jediněčně navržená a vysoce specifická interní kontrola využívá sondu značenou HEX. Zvýšená citlivost a specifita této soupravy je založena na amplifikaci více nezávislých cílů pro každý virus v jedné reakci qPCR. Amplifikace ve čtyřech oddělených kanálech rozlišuje mezi **koronavirem SARS-CoV-2** (jeden kanál), **chřipkovým virem** (chřipkový virus A - H1N1, H3N2, H5N1 a chřipkový virus B ve společném kanálu), **RS virem** (respirační syncytiální virus A a B ve společném kanálu) a obsahuje interní amplifikační kontrolu (samostatný kanál).

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). 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 koronaviřů je druhým



největším ze všech RNA virů, SARS-CoV-2 má velikost 29,9 kilobází.

Chřipka je infekční onemocnění ptáků a savců způsobené RNA virem z čeledi *Orthomyxoviridae*, chřipkovými viry. Chřipkový virus je obalený virus, který obsahuje segmentovaný genom složený z negativních RNA řetězců. Osmý RNA segment genomu viru chřipky kóduje 11 různých proteinů, z nichž 8 je zabaleno do infekčního obaleného virionu. Na virovém povrchu jsou dvě hlavní antigenní determinanty viru - spike glykoproteiny: hemagglutinin a neuraminidáza. Třetí integrální membránový protein M2 hraje roli při vstupu viru do buňky, stejně jako při jeho sestavování a uvolňování z buňky. Uvnitř virového obalu poskytuje matrix protein (M1) virionu strukturu k interakci mezi virovou lipidovou membránou a ribonukleoproteinem (RNP). Ribonukleoprotein se skládá z komplexu proteinů RNA polymerázy, PB1, PB2 a PA, a proteinu nukleokapsidu (NP), který zprostředkovává vazbu a zabalení virového genomu. Během replikace viru jsou exprimovány další tři proteiny, které nejsou začleněny do konečného virionu. Nestrukturální protein 1 (NS1) je multifunkční protein s hlavní rolí při vyhýbání se imunitnímu systému hostitele. NS2 (NEP) hraje klíčovou roli při zprostředkování exportu virových RNP z buněčného jádra během replikace. Viry chřipky A se dělí na podtypy založené na hemagglutininu (H) a neuraminidáze (N). Existuje 18 různých podtypů hemagglutininu a 11 různých podtypů neuraminidázy (H1 až H18, respektive N1 až N11). Současné podtypy chřipkových virů typu A, které běžně cirkulují mezi lidmi, zahrnují: typ A (H1N1) a typ A (H3N2). V současné době cirkulující chřipkové viry A (H1N1) souvisejí s pandemickým virem H1N1 2009, který se objevil na jaře 2009 a způsobil chřipkovou pandemii.

Respirační syncytiální virus (RSV) je obalený, nesegmentovaný RNA virus s negativním řetězcem patřící do rodiny *Paramyxoviridae*. Je běžnou příčinou infekcí dolních dýchacích cest s přibližně 33 miliony případů a přibližně 160 - 190 tisíci úmrtími ročně. RSV genom obsahuje více než 15 000 nukleotidů kódujících 11 známých proteinů. Attachment protein (G) pomáhá připojit virus k hostitelským buňkám, fúzní protein (F) je zodpovědný za virovou fúzi a tvorbu syncytia. Malý hydrofobní (SH) protein ovlivňuje infekčnost viru. Matricový (M) protein slouží jako protein vnitřního obalu. Čtyři proteiny spojené s nukleokapsidem zahrnují proteiny nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), velký protein (L) a protein M2-1. Regulační protein M2-2 je zodpovědný za syntézu RNA během sestavování virionů. Proteiny NS1 a NS2 jsou nestrukturální proteiny.

Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:

Doporučená izolace NK:

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

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)

Sérum, plasma

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 Triple RIC RT (90079-RT a 90079-RT-500) je určen k primární detekci viru SARS-CoV-2 se současnou detekcí dvou nejčastějších patogenů odpovědných za respirační infekce: Influenza A/B a RSV. 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) a EliGene® COVID19 CONFIRM 500 RT (90078-RT-500). Interní kontroly všech souprav EliGene® pro detekci viru SARS-CoV-2 jsou identické, proto lze RNA izolovanou interní kontrolou ze soupravy BASIC nebo CONFIRM analyzovat pomocí EliGene® COVID19 Triple RIC 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:

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 prosté 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 RNA SARS-CoV-2, Influenza A/B a RSV 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 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 se používají dvě sondy značené FAM (exc. 494 nm - em. 518 nm)
- Pro detekci respiračního syncytiálního viru se používá sonda označená TexasRed (exc. 589 nm - em. 615 nm)
- Pro detekci chřipky A/B se používá sonda označená Cy5 (exc. 650 nm - em. 670 nm)
- Pro detekci Interní kontroly je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 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

45°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_Triple_RIC_RT_LC480_v00.ixo". 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-Cov2), VIC (IC RNA), ROX (RSV) a Cy5 (Inf A a B). **Nepoužívejte žádné pasivní referenční barvivo!**

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

45°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 spuštění „EliGene COVID19 Triple RIC RT_QS3.edt“ nebo „EliGene COVID19 Triple RIC RT_QS5.edt“. Šablonu pro spuštění lze zkopírovat z disku CD, který je součástí sady.

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)

45°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 Triple RIC RT_Q-GENE_v00.ret".
Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

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	45°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 anebo může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

V případě použití jiných než validovaných přístrojů, které jsou uvedeny v tomto návodu, je nutno nastavit parametry pro čtení a analýzu výsledků pro takový přístroj. Toto nastavení musí být verifikováno srovnáním s výsledky dosaženými na jednom z validovaných přístrojů. Pro potřeby srovnání lze použít např. referenční vzorky nebo vzorky z externího hodnocení kvality. Pokud nejsou parametry čtení a analýzy výsledků verifikovány, není možné použít kritéria interpretace výsledků uvedená v návodu na nevalidované přístroje, protože může dojít k vydávání chybných výsledků. V těchto případech nenese výrobce zodpovědnost za případné problémy spojené s chybnou interpretací výsledků.

Příprava reagentů

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky 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 vyzolované 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 CoVIR Mix a zkumavku Enzyme Mix a rozmrazte při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce odstředte v centrifuze. Připravte Master Mix smícháním 14 µl CoVIR Mixu a



- 1 µl Enzyme Mixu na reakci a krátce odstředíte.
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 CoVIR. Při pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. **K pipetování pozitivních kontrol použijte mikropipetu určenou pouze pro pipetování pozitivních kontrol.**

Vložte mikrozukmavky 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 RSV: 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 chřipku A/B: 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 Treshold" 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 RSV: 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 chřipku A/B: 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 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 Treshold



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 RSV: 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 chřipku A/B: 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 RSV: 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 chřipku A/B: 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 kanálech FAM, TexasRed a Cy5 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).

Výsledek **nevylučuje** přítomnost infekce virem SARS-CoV-2, Influenza A/B a RSV 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

Amplifikační signál se objeví ve FAM, TexasRed a Cy5 kanálu před 40. Cyklem na příslušné základní hodnotě Baseline, je ve vzorku detekována RNA příslušného viru.



Inhibovaný vzorek

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v žádném kanálu včetně 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 Triple RIC 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).

Za předpokladu, že ve vzorku nedochází k amplifikaci v kanálech FAM, TexasRed a Cy5, v takovém případě musí dojít v HEX kanálu (interní amplifikační kontrola) k amplifikaci s hodnotou čísla cyklu nižší než 32. Kromě toho hodnoty **počtu cyklů u všech vzorků, u kterých je RNA izolována stejným způsobem, musí mít počet cyklů interní kontroly (IC) v kanálu HEX v rozsahu nejvýše 3 cykly**. 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, chřipku A/B nebo RSV. 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 zredit 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 Triple RIC 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 a Influenza A/B a 50 genomových RNA u RSV přidávaných 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 a Influenza A/B a 50 kopií RSV virových RNA 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 838, 118 a 113 klinických vzorcích SARS-CoV-2, Influenzy A/B a RSV. Jako vzorky referenčního materiálu byla použita kombinace orofaryngeálních a nasofaryngeálních výtěrů. Vzorky byly nezávisle testovány soupravou EliGene® COVID19 Triple RIC RT a referenčními metodami – CE IVD EliGene® COVID19 CONFIRM RT, EliGene Influenza A/B/Pandemic LC a publikovaným ověřeným testem mOTNRT-PCR podle Feng, Z., Zhao, L., Wang, J. et al. A multiplex one-tube nested real time RT-PCR assay for simultaneous detection of respiratory syncytial virus, human rhinovirus and human metapneumovirus. *Virol J* 15, 167 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1061-0>.

Senzitivita a specifita detekce SARS-CoV-2

A = 320 Skutečně pozitivní	B = 0 Falešně pozitivní
C = 0 Falešně negativní	D = 518 Skutečně negativní

$$\text{Senzitivita} = A/(A+C) = 320/(320+0) = 100\%$$

$$\text{Specifita} = D/(D+B) = 518/(518+0) = 100\%$$

Senzitivita a specifita detekce chřipkových virů typu A a B

A = 18 Skutečně pozitivní	B = 0 Falešně negativní
C = 0 Falešně negativní	D = 100 Skutečně negativní

$$\text{Senzitivita} = A/(A+C) = 18/(18+0) = 100\%$$

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

Senzitivita a specifita detekce RSV

A = 13 Skutečně pozitivní	B = 0 Falešně negativní
C = 0 Falešně negativní	D = 100 Skutečně negativní

$$\text{Senzitivita} = A/(A+C) = 13/(13+0) = 100\%$$

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

Klinická specifita a senzitivita soupravy EliGene® COVID19 Triple RIC RT je pro všechny tři cíle 100%.

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci 5×10^1 – 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 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 započítím 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, Elkhatib 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