

Návod na použitie

Ver. 1.0 (sk), 01/2021

UPOZORNENIE!

Tento kit je určený
len na *in vitro* diagnostické účely

1. Vysvetlivky a skratky

B.1.1.7: nová línia vírusu SARS-CoV-2, charakterizovaná špecifickými mutáciami a zvýšenou prenosnosťou

Baseline: základná fluorescencia pozadia alebo tzv. "šum"

BHQ-1: nefluorescenčný zhášač pre reportérový

fluorofor FAM (skratka z angl. Black Hole Quencher-1)

BHQ-3: nefluorescenčný zhášač pre reportérový

fluorofor Cy5 (skratka z angl. Black Hole Quencher-3)

BSL: úroveň biologickej bezpečnosti (skratka z angl. biosafety level)

COVID-19: ochorenie spôsobené vírusom SARS-CoV-2 (skratka z angl. COronaVirus Disease 2019)

Ct: prahový cyklus, cyklus v ktorom fluorescenčný signál reakcie prekročí nastavenú prahovú hodnotu fluorescencie

Cy5: cyaninový fluorofor

DNA: deoxyribonukleová kyselina

FAM: fluorofor 6-karboxyfluoresceín

gén RNase P: gén kódujúci ľudskú jadrovú ribonukleázu P

gén S: gén kódujúci výbežkový proteín (Spike proteín)

LoD: detekčný limit (skratka z angl. Limit of Detection)

ND: nedetekovaný (skratka z angl. Not Detected)

NTC: kontrola bez templátu (skratka z angl. No Template Control)

PC: pozitívna kontrola (skratka z angl. Positive Control)

qPCR: kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (skratka z angl. Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RFU: jednotka relatívnej fluorescencie (skratka z angl. Relative Fluorescence Unit)

RNA: ribonukleová kyselina

ROX: fluorofor karboxy-X-rodamin určený

na normalizáciu signálu pochádzajúceho z reportérového fluoroforu

RT-qPCR: kvantitatívna PCR s reverznou

transkripciou

rTEST: room Temperature STabuľka (stabilný

pri izbovej teplote)

SARS-CoV-2: koronavírus 2 ťažkého akútneho

respiračného syndrómu (skratka z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome COronaVirus 2)

Threshold: prahová hodnota fluorescencie

2. Účel použitia

Kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 je kvalitatívny *in vitro* diagnostický test určený na špecifickú detekciu prítomnosti genetického materiálu špecifického pre novú líniu koronavírusu SARS-CoV-2 - B.1.1.7 vo vzorkách biologického materiálu získaného primárne z horných dýchacích ciest človeka (nosa a nosohltanu). Tento variant SARS-CoV-2 bol prvýkrát opísaný v Spojenom kráľovstve a je charakterizovaný vyššou vírusovou náložou a zvýšenou kontagiozitou (účinnnejším a rýchlejšim prenosom). Kit je určený výhradne na použitie v diagnostickom laboratóriu so zodpovedajúcim vybavením, bezpečnostným štandardom a náležite vyškoleným personálom.

3. Princíp testu

Kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 je prvý kit stabilný pri izbovej teplote určený na detekciu genomickej RNA

vírusu SARS-CoV-2 línie B.1.1.7. Kit je možné skladovať pri izbovej teplote po dobu najmenej jedného mesiaca, čo umožňuje prepravu kitu bez nutnosti použitia suchého ľadu a ľahšiu manipuláciu po jeho príchode. Stabilitu pri izbovej teplote umožňujú lyofilizované zmesi primerov/sond špecifických pre gén S SARS-CoV-2 a SARS-CoV-2 línie B.1.1.7, internej pozitívnej kontroly (úplná genomická RNA vírusu SARS-CoV-2 línie B.1.1.7 obohatená ľudskou RNA) a reakcií pre jedнокrokovú RT-qPCR od spoločnosti Solis Biotec, ktoré sú tiež stabilné pri izbovej teplote.

Kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 predstavuje novodizajnovaný diferenciálny test rozlišujúci medzi konsenzus SARS-CoV-2 a novým B.1.1.7 variantom. Kit obsahuje dve sady primerov a hydrolyzačných sond (TaqMan®) detegujúcich buď konsenzus (C95) sekvenciu génu S SARS-CoV-2, alebo delécie HV69-70 a Y144 variantu B.1.1.7 odlišujúce tieto dve línie SARS-CoV-2. Obe sady primerov a sond umožňujú detekciu génu pre ľudskú RNázu P. TaqMan® sondy pre gén S oboch variantov - konsenzus SARS-CoV-2 a B.1.1.7 sú konjugované s fluoroforom FAM a TaqMan® sonda pre RNázu P je konjugovaná s fluoroforom Cy5. Takéto značenie umožňuje multiplexnú detekciu buď konsenzus SARS-CoV-2, alebo B.1.1.7 variantu a ľudskej RNázy P, ktorá slúži ako interná kontrola na overenie správneho odberu vzoriek, extrakcie RNA a vykonania testu. **Na detekciu oboch variantov génu S SARS-CoV-2 sme vyvinuli patentované duálne TaqMan® sondy, ktorých použitie zvyšuje citlivosť a špecifickosť našej 1-krokovej RT-qPCR.**

Kompletná genomická RNA vírusu SARS-CoV-2 línie B.1.1.7 obohatená ľudskou RNA poskytnutá Biomedicínskym centrom Slovenskej akadémie vied je zahrnutá ako vnútorná pozitívna kontrola. Reagencia 5X One-Step Probe CoV Mix (ROX) obsahuje ROX pasívny referenčný fluorofor, ktorý ako inertné aditívum poskytuje konštantný fluorescenčný signál pre normalizáciu vzorky v real-time PCR reakcii. Vďaka jedinečnej molekulárnej štruktúre fluoroforu ROX, je tento systém kompatibilný so všetkými cyklérmi využívajúcimi ROX (high-ROX aj low-ROX) ako aj s real-time PCR cyklérmi, ktoré nevyužívajú ROX.

Test prebieha ako jedнокroková reakcia, zahŕňajúca RT a qPCR v jednej skúmavke. Kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 je doplnkový konfirmačný kit určený na bližšiu charakterizáciu SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek, s cieľom potvrdiť alebo vylúčiť variant B.1.1.7. Pacientske vzorky označené v primárnom testovaní ako SARS-CoV-2 pozitívne, sú následne testované na prítomnosť konsenzus alebo B.1.1.7 variantu génu S. Multiplexovanie umožňuje spoločnú detekciu buď konsenzus génu S, alebo variantu B.1.1.7 s detekciou ľudskej RNázy P, ktorá slúži na sekundárne potvrdenie negatívnych vzoriek, ako aj na validáciu odberu vzoriek, extrakcie RNA a priebehu qPCR reakcie.

Jedno balenie kitu postačuje na 400 testovacích reakcií a je určené na detekciu variantu B.1.1.7 v patientských vzorkách, ktoré boli v primárnom testovaní označené ako SARS-CoV-2 pozitívne. Test sa odporúča vykonať v dvoch paralelných reakciách zameraných na zistenie prítomnosti konsenzuálneho SARS-CoV-2 génu S v jednej reakcii a variantu B.1.1.7 v druhej reakcii. Test vnútornej pozitívnej kontroly ľudskej RNázy P v multiplexnom móde s génom S a variantom B.1.1.7 slúži na overenie kvality výteru a extrakcie RNA, na stanovenie prítomnosti ľudskej RNA v extrahovanej vzorke, čím sa eliminujú falošne negatívne výsledky.

UPOZORNENIE!

- Pred začiatkom práce si prečítajte všetky inštrukcie, ktoré sa nachádzajú v tomto návode na použitie, vonkajšom obale a štítkoch komponentov.

VAROVANIE!

SARS-CoV-2 je nebezpečný patogén, dodržujte preto všetky platné nariadenia a odporúčania pre laboratória triedy BSL2+ alebo BSL3.

4. Zloženie kitu

- 1x zmes lyofilizovaných primerov a sond na detekciu SARS-CoV-2 génu S a ľudskej RNázy P, označená S gene/RNase P Mix (potrebne rozpustiť v 400 µl PCR vody)
- 1x zmes lyofilizovaných primerov a sond na detekciu SARS-CoV-2 génu S variantu B.1.1.7 a ľudskej RNázy P, označená B.1.1.7/RNase P Mix (potrebne rozpustiť v 400 µl PCR vody)
- 1x lyofilizovaná PC B.1.1.7 (potrebne rozpustiť v 100 µl PCR vody)
- 2x 800 µl 5X One-step Probe CoV Mix (ROX)
- 1x 200 µl 40X One-step SOLIScript® CoV Mix
- 2x 5 ml Water, nuclease free
- 1x Návod na použitie

5. Skladovanie a doba použiteľnosti

Všetky zložky kitu sa môžu prepravovať a skladovať pri izbovej teplote (15-25°C) po dobu 1 mesiaca. Bežne sa kit skladuje pri -20 °C. 5X One-step Probe CoV Mix (ROX) obsahuje referenčný fluorofor, ktorý je svetloutlivý a mal by byť chránený pred svetlom vždy, keď je to možné. Doba použiteľnosti kitu je maximálne 12 mesiacov od dátumu výroby. Presná doba expirácie kitu je uvedená na vonkajšom obale. Presná doba expirácie jednotlivých zložiek kitu je uvedená na vnútorných obaloch.

VAROVANIE!

Kit nepoužívajte po uplynutí doby expirácie, ktorá je uvedená na vonkajšom aj vnútornom obale.

Kit a jeho jednotlivé zložky sú určené na uskutočnenie 400 reakcií.

Užívateľom, ktorí uskutočňujú menší počet reakcií v rámci jedného pracovného cyklu, doporučame všetky zložky kitu rozalikvotovať v súlade s interne zaužívanými postupmi a štandardným počtom reakcií na jeden pracovný cyklus. Alíkvotovanie zložiek kitu minimalizuje potrebu opakovaného otvárania jednotlivých skúmaviek, a tým minimalizuje riziko kontaminácie zložiek kitu. Alíkvotovanie zložiek kitu taktiež zabráni opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu jednotlivých zložiek, ktoré môže viesť k zníženiu účinnosti. Pred alíkvotovaním je nevyhnutné jednotlivé zložky kitu úplne rozmraziť. Rozmrazenie je optimálne uskutočniť šetrne, inkubáciou v chladničke (pri teplote +4 °C) po dobu približne 2 hodín. Tesne pred uskutočnením alíkvotovania je nevyhnutné obsah skúmaviek dôkladne, ale zároveň opatrne premiešať, aby bol úplne homogénny. V prípade skúmaviek obsahujúcich enzýmy (5X One-step Probe CoV Mix (ROX), 40X One-step SOLIScript® CoV Mix) doporučame miešanie uskutočniť mnohonásobným otočením skúmavky, pulzným vortexovaním, prípadne krátkym vortexovaním nie dlhším ako 5 sekúnd. Enzýmy napipetujte opatrne a pomaly, inak môže viskozita tlmivého roztoku viesť k chybe v pipetovaní.

UPOZORNENIA!

- Používajte vhodné ochranné oblečenie, rukavice a ochranu očí a tváre.
- Nikdy nepipetujte ústami.
- V laboratóriu nikdy nekonzumujte potraviny ani nepite, nefajčite a nepoužívajte žiadnu kozmetiku.
- Po manipulácii so vzorkami a reagensiami si vždy dôkladne umyte ruky.

6. Spotrebný materiál a zariadenia, ktoré nie sú súčasťou kitu

- Real-time PCR zariadenie: kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 bol validovaný a testovaný na zariadeniach Agilent - Mx3005P® a AriaMx®, Thermo Fisher Scientific - QuantStudio™5, Bio-Rad - CFX96™, Analytik Jena - qTOWER3
- Box s laminárnym prúdením vzduchu
- Vortex
- Mini centrifúga
- Centrifúga s rotorom na platničky
- Ochranné pracovné pomôcky: jednorazové laboratórne rukavice bez púdry, ochranné okuliare, ochranný štít, respirátor FFP3, ochranné oblečenie
- Laboratórny plást bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz: reagenčné skúmavky, PCR skúmavky, PCR stripy, PCR platničky, PCR fólie, sterilné pipetové špičky s filtrom
- Autoklávovateľné nastaviteľné mikropipety
- Nádobna na biologický odpad
- Autoklávovateľné stojany na skúmavky
- PCR chladiaci stojan

7. Pracovný postup

VAROVANIE!

Prácu s kitom musí vykonávať kvalifikovaný personál.

UPOZORNENIA!

- Pracovné priestory musia byť usporiadané tak, aby pre každý krok v pracovnom postupe (izolácia nukleových kyselín, príprava amplifikačných reakcií, amplifikácia a detekcia produktov amplifikácie) existovali samostatne vyhradené miestnosti (zóny). Produkty amplifikácie sa nikdy nesmú dostať do miestnosti (zóny) určenej na izoláciu nukleových kyselín alebo na prípravu amplifikačných zmesí.
- V každej miestnosti (zóne) zabezpečte pre každý krok pracovného postupu oddelené špeciálne laboratórne vybavenie, spotrebný materiál a osobné ochranné prostriedky (laboratórne plášte, rukavice atď.). Nikdy nepoužívajte rovnaké laboratórne vybavenie, spotrebný materiál a osobné ochranné prostriedky v rôznych miestnostiach (zónach).
- So všetkými biologickými vzorkami manipulujte vždy ako s potenciálne infekčným materiálom. Vyhnite sa priamemu kontaktu s biologickým materiálom. Zabráňte rozliatiu vzoriek, reagensii a tvorbe aerosólov.
- Po príprave vzorky sa odporúča spustenie termocyklera hneď ako je to možné, aby sa zabránilo prípadnej degradácii vzorky.
- Postupujte presne podľa priloženého návodu na použitie.

7.1. Odber vzorky a extrakcia RNA

Nevhodný postup pri odbere, preprave a skladovaní vzoriek a tiež pri extrakcii RNA môže viesť k nesprávnemu výsledku testovania. Používatelia by sa mali riadiť zavedenými usmerneniami pre odber, prepravu a uchovávanie vzoriek a mali by dodržiavať pokyny výrobcu týkajúce sa odberu vzoriek. Pri odbere vzorky je nutné použiť sterilné výterové tyčinky s plastovou alebo hliníkovou tyčinkou a syntetickým tampónom. Nesmú byť použité výterové tyčinky s drevenou tyčinkou

a/alebo bavlneným tampónom. Po odbere sa tampóny ihneď ponoria do sterilných skúmaviek obsahujúcich 2 - 3 ml vírusového transportného média.

Extrakcia RNA z odobratých vzoriek by sa mala uskutočniť v čo najkratšom čase po odbere. V prípade potreby krátkodobého uskladnenia vzoriek, s trvaním do 12 h po odbere, uskladnite vzorky pri teplote +4 °C. V prípade potreby dlhodobého uskladnenia vzoriek, uskladnite vzorky pri teplote -70 °C. Vyhnite sa opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu vzoriek.

rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 kit bol validovaný a testovaný na vzorkách RNA získaných použitím extrakčných kitov:

- Zymo Research, Quick-RNA Viral 96 Kit (katalógové číslo R1040, R1041)
- Cytiva (predtým GE Healthcare Life Sciences), RNAspin 96 Kit (katalógové číslo 25050075)
- RNAdvance Viral Genomic Reagent (magnetické guľôčky, katalógové číslo C59543, C63510)

VAROVANIE!

Pri práci používajte vždy ochranné pracovné pomôcky a ochranné oblečenie; pracujte vždy v boxoch s laminárnym prúdením vzduchu. Aj vírusová RNA môže spôsobiť infekciu, preto dbajte na bezpečnosť a vždy s ňou manipulujte ako s potenciálne infekčným materiálom.

UPOZORNENIE!

- Analyzované vzorky musia byť určené na tento typ analýzy.
- Prísne dodržiavajte pokyny na spracovanie vzoriek, aby nedošlo k degradácii nukleových kyselín.
- Neotvárajte rôzne vzorky v tom istom čase, od začiatku s nimi manipulujte tak, aby ste predišli novej kontaminácii.
- Všetky centrifúgy, mini centrifúgy a vortexy používajte výlučne v boxoch s laminárnym prúdením vzduchu, zabránite tak kontaminácii prostredníctvom aerosólov.
- Na manipuláciu so vzorkami používajte pipety určené výlučne na tento účel. Používajte jednorázové špičky s filtrom. Používané špičky musia byť sterilné a bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz.

7.2. RT-qPCR

Pracovný postup kitu rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 sa skladá z testovania vzoriek, ktoré boli primárnym skríningovým testom identifikované ako SARS-CoV-2 pozitívne, aby sa potvrdila prítomnosť konsenzus SARS-CoV-2 génu S a/alebo variantu B.1.1.7. Je nevyhnutné uskutočniť dva paralelné multiplexné konfirmačné testy na dokázanie prítomnosti konsenzus SARS-CoV-2 génu S a/alebo variantu B.1.1.7. Okrem toho, uskutočnenie internej kontroly testom na ľudský gén RNázy P je ukazovateľom správne vykonaného steru a extrakcie RNA, prítomnosti ľudskej RNA vo vzorke a zároveň faktorom eliminujúcim falošnú negatívitu.

7.3. Príprava pracovného priestoru

Pred začatím práce vyčistite pracovný priestor laminárneho boxu a príslušné povrchy najprv 10 % roztokom chlórnanu sodného (bielidlo), následne použite 70% roztok etanolu na odstránenie zvyškov chlórnanu sodného. Pred prácou aj po práci v laminárnom boxe spustite UV dekontaminačný cyklus.

7.4. Príprava reagensii

Vyberte potrebné zložky kitu z mrazničky, vložte ich do vychladeného chladiaceho stojana na skúmavky a nechajte ich úplne rozmraziť, prípadne zložky kitu nechajte rozmraziť v chladničke (pri teplote +4 °C). Akonáhle sú zložky úplne rozmrazené, ich obsah dôkladne, ale zároveň jemne premiešajte, kým nebude úplne homogénny. V prípade skúmaviek obsahujúcich

enzýmy (5X One-step Probe CoV Mix (ROX), 40X One-step SOLIScript® CoV Mix) odporúčame miešanie uskutočniť mnohonásobným otočením skúmavky, pulzným vortexovaním, prípadne krátkym vortexovaním nie dlhším ako 5 sekúnd. Následne skúmavky krátko scentrifugujte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka a všetka tekutina bola na dne skúmaviek. Reakčnú zmes pipetujte opatrne a pomaly, pretože viskozita tlmivého roztoku môže viesť k chybám pri pipetovaní.

Zmesi primerov a TaqMan® sond určené na detekciu SARS-CoV-2_S, SARS-CoV-2_B.1.1.7 a ľudskej RNázy P (poskytované ako S gene/RNase P Mix alebo B.1.1.7/RNase P Mix) ako aj pozitívna kontrola PC B.1.1.7 obohatená o ľudskú RNA sú kvôli zvýšenej stability dodávané v lyofilizovanej podobe. Pri prvom použití kitu je preto nutné zmesi primerov a sond rozpustiť vo vode určenej na PCR.

VAROVANIE!

Pelety lyofilizovaných primerov a sond sa môžu počas prepravy uvoľniť, preto je nevyhnutné každú skúmavku pred otvorením krátko scentrifugovať. Vynechanie tohto kroku môže viesť k strate oligonukleotidov zo skúmavky, čo môže mať za následok nižší výťažok.

Pridajte 400 µl PCR vody zo skúmavky PCR Water do skúmavky označenej S gene/RNase P Mix (200 reakcií) a 400 µl PCR vody zo skúmavky PCR Water do skúmavky označenej B.1.1.7/RNase P Mix (200 reakcií). Následne pridajte 100 µl PCR vody do skúmavky obsahujúcej pozitívnu kontrolu PC B.1.1.7.

Obsah skúmaviek dôkladne zhomogenizujte vortexovaním. Následne skúmavky krátko scentrifugujte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka a všetka tekutina bola na dne skúmaviek. Reakčnú zmes pripravte v čo možno najkratšom čase po premiešaní obsahu jednotlivých zložiek kitu. V prípade potreby, obsah skúmaviek premiešajte ešte raz tesne pred prípravou reakčnej zmesi. Po použití vráťte všetky zložky kitu do mrazničky (na teplotu -20 °C). Vyhnite sa opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu zložiek kitu. V prípade plánovaného opätovného použitia v priebehu časového rozpätia kratšieho ako 2 hodiny, uskladnite zložky kitu pri teplote +4 °C.

VAROVANIE!

S reagensiami manipulujte vždy v boxe s laminárnym prúdením vzduchu. Reagencie určené na amplifikáciu pripravujte vždy oddelene, naraz pripravujte reagencie výlučne pre jednu analýzu. Na prípravu reagensii používajte pipety určené výlučne na tento účel. Používajte jednorázové špičky s filtrom. Používané špičky musia byť sterilné a bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz.

UPOZORNENIA!

- Používajte iba reagencie nachádzajúce sa v tomto kíte a reagencie odporúčané výrobcom.
- Nekombinujte reagencie z kitov od rôznych výrobcov.
- Nekombinujte a nezmiešavajte reagencie z rôznych šarží.

7.5. Príprava reakčnej zmesi

Odporúčaný celkový objem jednej reakcie je 20 µl. Pre prípravu reakčnej zmesi treba jednotlivé zložky kitu zmiešať v nasledujúcej postupnosti a pomere:

Tabuľka 1. Príprava reakčnej zmesi

Zložka kítu	Objem zložky na reakciu	
	S gén/RNáza P	B.1.1.7/RNáza P
PCR water	8.5 µl	8.5 µl
5X One-step Probe CoV Mix (ROX)	4 µl	4 µl
40X One-step SOLIScript® CoV Mix	0.5 µl	0.5 µl
S gene/RNase P Mix alebo B.1.1.7/RNase P Mix	2 µl	2 µl
Celkový objem	15 µl	15 µl

Tabuľka 2.

Vypočítané objemy na daný počet reakcií

Zložka kítu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	96
PCR water	8.5 µl	17 µl	25.5 µl	34 µl	42.5 µl	51 µl	59.5 µl	68 µl	76.5 µl	85 µl	816 µl
5X One-step Probe CoV Mix (ROX)	4 µl	8 µl	12 µl	16 µl	20 µl	24 µl	28 µl	32 µl	36 µl	40 µl	384 µl
40X One-step SOLIScript® CoV Mix	0.5 µl	1 µl	1.5 µl	2 µl	2.5 µl	3 µl	3.5 µl	4 µl	4.5 µl	5 µl	48 µl
S gene/RNase P Mix alebo B.1.1.7/RNase P Mix	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl	12 µl	14 µl	16 µl	18 µl	20 µl	192 µl
Celkový objem	15 µl	30 µl	45 µl	60 µl	75 µl	90 µl	105 µl	120 µl	135 µl	150 µl	1440 µl

UPOZORNENIA!

- Namiešaná reakčná zmes má limitovanú stabilitu, použite ju v čo možno najkratšom čase po príprave. Ak nie je možné namiešať reakčnú zmes použiť ihneď, skladujete ju v chladničke pri teplote +4 °C.
- Pri príprave viacerých reakcií sa odporúča pripraviť o 5-10 % viac reakčnej zmesi, aby sa zohľadnili chyby pri pipetovaní.

UPOZORNENIE!

- Reakcie obsahujúce S gene/RNase P Mix a B.1.1.7/RNase P Mix musia prebiehať vedľa seba na tej istej PCR platničke (alebo PCR stripov v tom istom PCR behu) aby sa zabezpečila homogenita výsledkov!

7.6. Príprava platničky a kontroly

K pripraveným 15 µl reakčnej zmesi pridajte 5 µl vzorky. Výsledný celkový objem reakcie je 20 µl.

Prípravte si potrebný počet čistých PCR skúmaviek, PCR stripov alebo PCR platničiek a vložte ich do vychladeného chladiaceho stojana. Pripravenú reakčnú zmes dôkladne, ale zároveň jemne premiešajte mnohonásobným otočením skúmavky, pulzným vortexovaním, prípadne krátkym vortexovaním nie dlhším ako 5 sekúnd. Následne ju krátko scentrifugujte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka a všetka tekutina bola na dne skúmavky. Z pripravenej reakčnej zmesi rozpipetujte po 15 µl do jednotlivých PCR skúmaviek alebo jamiek PCR platničky v súlade s potrebným počtom a pozíciami uskutočnených reakcií. Reakčnú zmes pipetujte opatrne a pomaly, pretože viskozita tlmivého roztoku môže viesť k chybám pri pipetovaní. Následne premiestnite PCR skúmavky alebo PCR platničku s rozpipetovanou reakčnou zmesou z laminárneho boxu určeného na prípravu reakčnej zmesi do laminárneho boxu určeného na finalizáciu prípravy platničky. V tomto laminárnom boxe pridajte 5 µl vzorky alebo 5 µl pozitívnej kontroly (PC B.1.1.7) alebo 5 µl PCR vody (NTC) do príslušných PCR skúmaviek alebo jamiek PCR platničky. Následne dôkladne uzavrite jednotlivé PCR skúmavky vrchnáčikmi alebo jamky PCR platničky optickou fóliou. PCR skúmavky alebo PCR platničku krátko scentrifugujte, aby všetka tekutina bola na dne

skúmaviek/jamiek. Vložte PCR skúmavky alebo PCR platničku do real-time PCR zariadenia.

Do každej analýzy je nutné zahrnúť minimálne 1 pozitívnu kontrolu na overenie prítomnosti kontaminácie. Ako negatívna kontrola slúži kontrola bez templátu (NTC) obsahujúca PCR vodu namiesto neznámej vzorky. Každá testovaná kombinácia primerov a sond (S gene/RNase P, B.1.1.7/RNase P) musí mať vlastnú NTC.

Do každej analýzy je nutné zahrnúť minimálne 1 pozitívnu kontrolu na overenie správneho priebehu analýzy a funkčnosti zložiek kítu. Ako pozitívna kontrola slúži reakcia obsahujúca kontrolný materiál PC B.1.1.7 namiesto neznámej vzorky. Pozitívnu kontrolu pre každú kombináciu primerov a sond (S gene/RNase P a B.1.1.7/RNase P) je nutné zahrnúť samostatne.

Pozitívna kontrola (PC B.1.1.7) nachádzajúca sa v kíte je kompletná jednovláknová RNA vírusu SARS-CoV-2 variantu B.1.1.7 obohatená ľudskou RNA. Pozitívna kontrola PC B.1.1.7 poskytuje pozitívny výsledok so všetkými sadami primerov a sond (SARS-CoV-2 primery/sondy pre konsenzus gén S aj pre variant B.1.1.7 a primery/sondy pre ľudskú RNase P).

7.7. Nastavenia real-time PCR prístroja

Pre nastavenie podmienok analýzy, ktoré sa týkajú objemu reakcie, teplotných podmienok reakcie a použitých optických kanálov postupujte v zmysle nasledujúcich pokynov.

Objem reakcie:

- 20 µl

Teplotné podmienky pre prácu s kítom:

- Reverzná transkripcia: 55 °C, 10 min
- Prvotná denaturácia: 95 °C, 10 min
- Cyklovanie, 45 cyklov:
 - » Denaturácia: 95 °C, 15 s
 - » Anelácia/extenzia: 60 °C, 30 s

Použitie optické kanály:

- Optický kanál pre fluorofor FAM: modrý alebo zelený kanál podľa použitého real-time PCR zariadenia - excitačné maximum 495 nm, emisné maximum 520 nm
- Optický kanál pre fluorofor ROX: oranžový alebo červený kanál podľa použitého real-time PCR zariadenia - excitačné maximum 575 nm, emisné maximum 605 nm
- Optický kanál pre fluorofor Cy5: červený kanál - excitačné maximum 650 nm, emisné maximum 670 nm

V prípade real-time PCR zariadení podporujúcich normalizáciu na základe prítomnosti pasívneho referenčného fluoroforu ROX v reakčnej zmesi, odporúčame uskutočnenie analýzy so zapnutím tejto funkcie. Fluorescenčný signál fluoroforu ROX nezasahuje do detekčného kanálu fluorescenčných fabičiek FAM a Cy5. Kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 je plne kompatibilný aj s real-time PCR zariadeniami, ktoré funkciu normalizácie fluoroforom ROX nepodporujú.

Pri nastaveniach podmienok analýzy týkajúcich sa počtu a typu vzoriek, rozloženia vzoriek na platničke, typu použitého plastového materiálu (skúmavky, stripy, platničky) postupujte v zmysle manuálu výrobcu real-time PCR zariadenia a v súlade s vašimi interne zaužívanými postupmi pre tento typ testov.

VAROVANIE!

Neupravujte a nemeňte odporúčané protokoly pre PCR analýzy.

VAROVANIE!

S produktami amplifikácie manipulujte mimoriadne opatrne, tak aby nedochádzalo k ich rozptýleniu do priestoru laboratória a k prípadnej kontaminácii nových testovaných vzoriek. Pri manipulácii s produktami amplifikácie používajte pipety určené výlučne na tento účel. Používajte jednorázové špičky s filtrom. Používané špičky musia byť sterilné a bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz.

7.8. Analýza získaných údajov

Pri nastavení baseliny a thresholdu pre jednotlivé reakcie postupujte v zmysle manuálu výrobcu real-time PCR zariadenia a v súlade s vašimi interne zaužívanými postupmi pre tento typ testov.

8. Interpretácia výsledkov

8.1. Interpretácia výsledkov a ich nahlasovanie (klinické vzorky)

• Výsledky a interpretácia výsledkov extrakcie a pozitívnej kontroly

• Kontrola bez templátu (NTC)

NTC pozostáva z použitia PCR vody pri reakciách RT-qPCR namiesto RNA. NTC reakcie pre všetky sady primerov a sond by nemali vykazovať amplifikačné krivky, ktoré prekročia prahovú hodnotu fluorescence. Ak ktorákoľvek z reakcií NTC vykazuje amplifikačnú krivku, ktorá prekročí prahovú hodnotu, môže ísť o prípadnú kontamináciu vzorky. Zastavte test a opätovne ho opakujte s prísnyim dodržaním pracovného postupu opísaného v manuáli.

• Pozitívna kontrola PC B.1.1.7

PC B.1.1.7 pozostáva z lyofilizovanej izolovanej genómovej RNA vírusu SARS-CoV-2 línie B.1.1.7 obohatenej koprecipitantom (vo forme salmon sperm DNA alebo baker's yeast tRNA) a ľudskou RNA. PC B.1.1.7 poskytuje pozitívny výsledok so všetkými sadami primerov a sond (gén S SARS-CoV-2, variant B.1.1.7 a gén pre RNázu P). Štandardné hodnoty Ct pre pozitívnu kontrolu PC B.1.1.7 by mali byť nižšie ako 35,00 pre všetky testované markery. Úroveň signálu (t. j. relatívna fluorescence bez normalizácie s fluoroforom ROX) by mala mať hodnoty nad 1000 RFU, aby mohla byť považovaná za platnú. Medzi indikácie chyby alebo zlyhania v pracovnom postupe alebo analýze experimentu patrí: úplná neprítomnosť signálu, prítomnosť amplifikovaného signálu ale s vyššími hodnotami Ct, ako je obvyklé pre daný kontrolný materiál, alebo prítomnosť nízkeho signálu. V prípade negatívneho výsledku v pozitívnej kontrole nie je možné jednoznačne určiť správnosť iných pozitívnych/negatívnych výsledkov získaných v danej analýze a odlišiť negatívne a falošne negatívne výsledky. Výstup takejto analýzy nie je možné vyhodnotiť.

Tabuľka 3.

Očakávaný výsledok kontrol zahrnutých v teste rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7

Typ kontroly	Externá kontrola	gén S SARS-CoV-2	B.1.1.7	Ľudská RNáza P	Očakávané hodnoty Ct	Možné príčiny neočakávaného výsledku
Pozitívna	PC B.1.1.7	+	+	+	Ct<35,00	Zlyhanie reagencií vrátane integrity primerov a sond
Negatívna	NTC	-	-	-	Nedetegovateľné	Kontaminácia reagencií a/alebo prostredia

Odchýlka od očakávaného výsledku kontrol naznačuje, že mohlo dôjsť k nesprávnemu nastaveniu a/alebo vykonaniu testu alebo k zlyhaniu/nesprávnej činnosti reagencií a/alebo vybavenia. Zastavte pokus a opätovne ho zopakujte.

• RNáza P (kontrola extrakcie)

» Všetky klinické vzorky by mali vykazovať amplifikačné krivky v reakcii RNázy P, ktoré prekročujú prahovú hodnotu fluorescence v rámci 35,00 cyklov (Ct <35,00), čo naznačuje prítomnosť ľudského génu RNázy P vo vzorke RNA. Neschopnosť detegovať RNázu P v akýchkoľvek klinických vzorkách môže naznačovať:

- Nesprávnu extrakciu nukleových kyselín z klinických materiálov, ktorej výsledkom je neprítomnosť RNA a/alebo degradácia RNA.
- Absenciu dostatočného množstva ľudského bunkového materiálu v dôsledku zlého odberu alebo straty integrity vzorky.
- Nesprávne nastavenie a vykonanie testu.
- Nefunkčnosť zložky kitu alebo porucha zariadenia.

» Ak analýza RNázy P neprináša pozitívny výsledok pre ľudské klinické vzorky, interpretácia je nasledovná:

- Ak sú testy B.1.1.7 a/alebo SARS-CoV-2 S pozitívne, aj v prípade absencie pozitívneho výsledku pre RNázu P, výsledok by sa mal považovať za **platný**. Niektoré vzorky nemusia vykazovať amplifikačné krivky RNázy P kvôli nízkemu počtu buniek v pôvodnej klinickej vzorke. Negatívny signál RNázy P nevylučuje prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v klinickej vzorke.
- Ak sú všetky markery SARS-CoV-2 a RNáza P negatívne, výsledok by sa mal považovať za **neplatný**. Ak je k dispozícii zvyšková vzorka, opakujte postup extrakcie RNA a opakujte test. Ak po opakovanom teste zostanú všetky markery negatívne, oznámte výsledky ako neplatné a ak je to možné, mala by sa odobrať nová vzorka.

• SARS-CoV-2 markery (konsenzus gén S a variant B.1.1.7)

» Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný výsledok, vzorka sa považuje za **B.1.1.7 negatívnu**,

ak amplifikačná krivka pre sadu B.1.1.7 primerov a sond neprekročí prahovú hodnotu fluorescence v rámci 40,00 cyklov (Ct > 40,00) alebo ak prekročí prahovú hodnotu **o dvadsať a viac** cyklov neskôr ako amplifikačná krivka pre konsenzus gén S SARS-CoV-2. Amplifikačná krivka RNázy P môže, ale nemusí, prekročiť prahovú hodnotu v rámci 35,00 cyklov (Ct <35,00).

» Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný výsledok, vzorka sa považuje za **B.1.1.7 negatívnu**, ak amplifikačná krivka pre sadu B.1.1.7 primerov a sond prekročí prahovú hranicu o **osem** cyklov neskôr ako amplifikačná krivka pre konsenzus gén S SARS-CoV-2. Tento profil indikuje **prítomnosť variantu SARS-CoV-2, ktorý obsahuje deleciu HV 69-70**. RNáza P môže alebo nemusí byť pozitívna, ako je opísané vyššie, ale výsledok je stále platný.

» Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný výsledok, vzorka sa považuje za **B.1.1.7 pozitívnu** ak amplifikačná krivka pre B.1.1.7 sadu primerov a sond prekročí prahovú hranicu v rámci 40,00 cyklov (Ct <40,00) a nie neskôr ako **o päť** cyklov neskôr ako amplifikačná krivka pre konsenzus gén S SARS-CoV-2. RNáza P môže alebo nemusí byť pozitívna, ako je opísané vyššie, ale výsledok je stále platný.

» Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný výsledok a amplifikačné krivky pre oba gény S SARS-CoV-2 (konsenzus a variant B.1.1.7) neprekročia prahovú hodnotu amplifikácie v rámci 40,00 cyklov (Ct <40,00) **a ani** krivka pre RNázu P **neprekročí** prahovú hranicu v rámci 35,00 cyklov (Ct <35,00), výsledok sa považuje za **neplatný**. Extrahovaná RNA zo vzorky by sa mala znovu testovať. Ak nie je k dispozícii zvyšková RNA, opätovne izolujte RNA zo zvyškovej vzorky a test zopakujte. Ak je opakovaná skúška negatívna pre všetky markery a RNázu P, výsledok je neplatný a mal by sa zvážiť odber novej vzorky od pacienta.

» Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný výsledok a iba amplifikačná krivka pre SARS-CoV-2 B.1.1.7 (ale nie krivka pre konsenzus gén S SARS-CoV-2) prekročí prahovú hodnotu v rámci 40,00 cyklov (Ct <40,00), výsledok sa považuje za **nepreukazný**. Extrahovaná RNA by sa mala znovu testovať. Ak nie je k dispozícii zvyšková RNA, opätovne izolujte RNA zo zvyškovej vzorky a test zopakujte. Ak sa dosiahne rovnaký výsledok, nahláste nepreukazný výsledok. Poradte sa s príslušným orgánom verejného zdravotníctva o ďalšom usmernení a/alebo koordinácii odberu vzorky na ďalšiu analýzu.

• **Sprievodca interpretáciou výsledkov diagnostického testu rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7**
V nasledujúcich tabuľkách sú uvedené očakávané výsledky pre diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7. Ak laboratórium získa neočakávané výsledky testovaných kontrol alebo ak sa získajú nepreukazné alebo neplatné výsledky, ktoré sa nedajú vyriešiť odporúčaným opakovaným testovaním, obráťte sa na príslušný orgán verejného zdravotníctva.

POZNÁMKA: Pre nastavenie prahovej hodnoty fluorescence (threshold) odporúčame postupovať podľa manuálu priloženého k použitému termocykléru alebo podľa odporúčani CDC.

UPOZORNENIA!

• Pred začiatkom používania diagnostického testu rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7, odporúčame vykonať kalibráciu real-time PCR prístroja. Postupujte podľa návodu na použitie vášho real-time PCR prístroja.

- Diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 je určený pre kvalifikovaný a vyškolovaný laboratórny personál s dostatočnými skúsenosťami v technikách real-time RT-qPCR testovania.

Tabuľka 4. Interpretácia výsledkov testovania SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 S gén	Rozdiel v Ct hodnotách medzi SARS-CoV-2 B.1.1.7 a S génom ^b	Ľudská RNáza P	Interpretácia výsledkov ^a	Správa	Postup
+	Max 5 Ct	+/ND	SARS-CoV-2 B.1.1.7 detegovaný	SARS-CoV-2 B.1.1.7 pozitívny	Oznámte výsledky žiadateľovi.
+	Min 8 Ct	+/ND	SARS-CoV-2 delécia HV 69-70 detegovaná	SARS-CoV-2 B.1.1.7 negatívny	Oznámte výsledky žiadateľovi.
+	Min 20 Ct	+/ND	iná línia SARS-CoV-2 detegovaná	SARS-CoV-2 B.1.1.7 negatívny	Oznámte výsledky žiadateľovi.
+	ND	+/ND	Konsenzus SARS-CoV-2 detegovaný	SARS-CoV-2 B.1.1.7 negatívny	Oznámte výsledky žiadateľovi.
ND	+	+/ND	Nepreukazný výsledok	Nepreukazný	Opakujte extrakciu a RT-qPCR. Ak opakovaný výsledok zostane nepreukázateľný, zväzte odber novej vzorky od pacienta.
ND	ND	ND	Neplatný výsledok	Neplatný	Opakujte extrakciu a RT-qPCR. Ak opakovaný výsledok zostane neplatný, zväzte odber novej vzorky od pacienta.

^a Laboratóriá by mali hlásiť svoje diagnostické výsledky v súlade so svojim osobitným systémom podávania správ. ND - Nedetekovaný

^b Rozdiel v hodnotách Ct treba počítať ako Ct B.1.1.7 - Ct SARS-CoV-2 S gén

9.2. Hodnotenie klinickej výkonnosti

Hodnotenie klinickej výkonnosti kitu rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 bolo uskutočnené pre test na konsenzus gén S SARS-CoV-2, ako aj pre variantu SARS-CoV-2 B.1.1.7. Hodnotenie klinickej výkonnosti pre SARS-CoV-2 bolo uskutočnené na vybranom súbore 65 pozitívnych klinických vzoriek pacientov, medzi ktorými sekvenovanie potvrdilo 37 variant B.1.1.7. Kit rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7 správne identifikoval 36 vzoriek s B.1.1.7 variantom, pričom jedna vzorka bola vyhodnotená ako nepreukazná.

Testovanie tohto vybraného súboru vzoriek bolo uskutočnené so zaslepenými vzorkami, v externom laboratóriu zapojenom do medzinárodných kruhových testov kontroly kvality (External Quality Assessment (EQA) organizovaných inštitúciami ako European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Institute of Virology, Charité, Berlin, Germany a National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands).

Klinická analýza SARS-CoV-2 vzoriek potvrdila výsledky prvého testovania a sekvenovania pre všetky vzorky. Analýza preukázala vysokú spoľahlivosť a reprodukovateľnosť výsledkov nadobudnutých pomocou kitu rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7.

Detekcia génu pre RNázu P preukázala vysokú homogenitu vo všetkých analyzovaných vzorkách, čím sa potvrdilo, že tento test je vhodný ako interná kontrola odberu a extrakcie RNA z klinických vzoriek.

9. Funkčné charakteristiky kitu

9.1. Detekčný limit kitu

Hodnotenie analytickej citlivosti (detekčného limitu) bolo uskutočnené pre kombináciu primerov a sond umožňujúcich multiplexnú detekciu SARS-CoV-2_S/RNase P a SARS-CoV-2_B.1.1.7/RNase P. Test bol uskutočnený pomocou RNA izolovanej zo vzorky pacienta infikovaného s B.1.1.7 variantou SARS-CoV-2, potvrdeného sekvenovaním. Táto RNA bola nariadená na 200 kópií templátu na 1 µl.

Sériovým riedením boli pripravené riedenia s koncentraciami 8 kópií/µl (= 40 kópií/reakciu), 2 kópie/µl (= 10 kópií/reakciu), 0,8 kópie/µl (= 4 kópie/reakciu), 0,4 kópie/µl (= 2 kópie/reakciu) a 0,2 kópie/µl

(=1 kópia/reakciu), ktoré boli použité v teste analytickej citlivosti. Na riedenie kontrolného materiálu sa použila negatívna syntetická matrix „SARS-CoV-2 Negative“ (Exact Diagnostics) obsahujúca genomickú DNA v koncentrácii 75000 kópií/ml. Test bol uskutočnený v 8 replikátoch pre každé pripravené riedenie. Test potvrdil vysokú citlivosť diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7. Spolahlivá detekcia templátu SARS-CoV-2 variantu B.1.1.7 bola preukázaná až do riedenia obsahujúceho 10 kópií na reakciu (2 kópie na 1 µl vzorky) a 2 kópie na reakciu (0,4 kópie na 1 µl vzorky) pre konsenzus gén S SARS-CoV-2.

Tabuľka 5. Detekčný limit testu pre SARS-CoV-2 variant B.1.1.7

	gén S/gén pre RNázu P			B.1.1.7/gén pre RNázu P		
	Celkový počet replikátov	Počet replikátov s pozitívnym výsledkom	Úspešnosť detekcie (%)	Celkový počet replikátov	Počet replikátov s pozitívnym výsledkom	Úspešnosť detekcie (%)
40 kópií/reakciu	8	8/8	100/100	8	8/8	100/100
10 kópií/reakciu	8	8/8	100/100	8	8/8	100/100
4 kópie/reakciu	8	8/8	100/100	8	5/8	62.5/100
2 kópie/reakciu	8	8/8	100/100	8	3/8	37.5/100
1 kópia/reakciu	8	2/8	25/100	8	0/8	0/100

Tabuľka 6.

Hodnotenie klinickej výkonnosti kitu rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7

	rTEST COVID-19 qPCR B.1.1.7					
	Sekvenovanie	Konsenzus S gén	Delécia HV 69/70 + Y144 (B.1.1.7)	Delécia HV 69/70	Iný variant SARS-CoV-2	Nepreukazné
Delécia HV 69/70 + Y144 (B.1.1.7)	37	37	36	0	0	1
Delécia HV 69/70	16	16	0	14	1	1
Iný variant SARS-CoV-2	12	12	0	0	12	0

10. Nakladanie s odpadom

UPOZORNENIA!

- Všetok materiál, ktorý sa dostal do kontaktu s biologickými vzorkami dekontaminujte pred likvidáciou 3 % chlórnanom sodným minimálne 30 minút alebo autoklávujte pri 121 °C minimálne 60 minút.
- Všetky použité pomôcky, špičky, skúmavky, pracovný materiál a ochranné odevy považujte za potencionálne kontaminované a zlikvidujte ich podľa platných predpisov pre likvidáciu infekčného odpadu.
- Zvyšné reagencie a materiál zlikvidujte v súlade s platnými bezpečnostnými predpismi.

11. Riešenie problémov

V prípade akýchkoľvek problémov kontaktujte:


MultiplexDX, s. r. o.
výrobca

Adresa: Ilkovičova 8
841 04 Bratislava

Tel.: +421 2 902 68 310
Email: vigilance@multiplexdx.com

12. Použité symboly a označenia

	Výrobca
	Číslo šarže
	Odporúčaná teplota skladovania
	Veľkosť balenia
	Tento výrobok spĺňa požiadavky európskej smernice 98/79/ES o diagnostických zdravotníckych pomôckach <i>in vitro</i>
	Dátum výroby
	Diagnostické zdravotnícke pomôcky <i>in vitro</i>
	Pozor, rešpektujte bezpečnostné pokyny v návode na použitie, ktoré ste dostali s týmto výrobkom

  Registračný kód: P2058A

 **MultiplexDX, s. r. o.**
IČO: 50 111 965
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
Slovenská republika
+421 2 902 68 310
vigilance@multiplexdx.com