

Návod na použitie

Ver. 1.1(sk), 09/2021



UPOZORNENIE!

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

1. Vysvetlivky a skratky

Baseline: základná fluorescencia pozadia alebo tzv. "šum"

BHQ-1: nefluorescenčný zhášač pre reportérovú fluorescenčnú farbičku FAM (skratka z angl. Black Hole Quencher-1)

BHQ-2: nefluorescenčný zhášač pre reportérovú fluorescenčnú farbičku HEX (skratka z angl. Black Hole Quencher-2)

BHQ-3: nefluorescenčný zhášač pre reportérovú fluorescenčnú farbičku 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: fluorescenčná cyanínová farbička

DNA: deoxyribonukleová kyselina

FAM: fluorescenčná farbička 6-*k*-karboxyfluoresceín

gén E: gén kódujúci malý membránový obalový proteín vírusu SARS-CoV-2 (označenie E pochádza zo skratky z angl. envelope)

gén RdRP: gén kódujúci RNA dependentnú RNA polymerázu vírusu SARS-CoV-2

gén RNase P: gén kódujúci ľudskú jadrovú ribonukleázu P

HEX: fluorescenčná farbička hexachloro-fluoresceín

LoD: detekčný limit reakcie (skratka z anglického Limit of Detection)

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

RNA: ribonukleová kyselina

ROX: fluorescenčná farbička karboxy-X-rodamin určené na normalizáciu signálu pochádzajúceho z reportérovej farbičky

rTEST: room Temperature Stable (stabilný pri izbovej teplote)

RT-qPCR: kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou

SARS-CoV-2: koronavírus 2 ťažkého akútneho respiračného syndrómu (skratka z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus)

threshold: prahová hodnota fluorescencie

YY: fluorescenčná farbička Yakima Yellow®, vyvinutá firmou Epoch Biosciences

2. Účel použitia

Diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR Superplex kit je kvalitatívny *in vitro* test určený na detekciu prítomnosti genetického materiálu koronavírusu SARS-CoV-2 vo vzorkách biologického materiálu získaného primárne z horných dýchacích ciest človeka (nosa a nosohltanu). Kit je určený výhradne na použitie v diagnostickom laboratóriu so zodpovedajúcim vybavením, bezpečnostným štandardom a náležite vyškoleným personálom.

3. Princíp testu

rTEST COVID-19 qPCR Superplex kit je diagnostický kit stabilný pri izbovej teplote určený na detekciu genomickej RNA vírusu SARS-CoV-2. 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 SARS-CoV-2, ľudskú RNázu P a exogénnu kontrolu RNA Spike-In, interná pozitívna kontrola PC BMC5 (úplná genomická RNA vírusu SARS-CoV-2 obohatená ľudskou RNA), exogénna kontrola RNA Spike-In a reagensie pre jednokrokovú RT-qPCR od spoločnosti Solis Biotec, ktoré sú tiež stabilné pri izbovej teplote.

Diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR Superplex je vylepšená a prepracovaná verzia Charité, Berlín diagnostického protokolu, odporúčaného WHO pre detekciu vírusu SARS-CoV-2. Kit obsahuje štyri sady primerov a hydrolyzačných sond (TaqMan®) pre multiplexnú detekciu SARS-CoV-2 špecifického E génu a RdRP génu, spolu s ľudskou RNázou P alebo exogénnou kontrolou RNA Spike-In. TaqMan® sondy pre E gén sú konjugované s fluorescenčnou farbičkou YY, TaqMan® sondy pre RdRP gén sú konjugované s fluorescenčnou farbičkou FAM a TaqMan® sondy pre RNázu P a RNA Spike-In sú konjugované s fluorescenčnou farbičkou Cy5. Takéto značenie umožňuje multiplexnú detekciu

SARS-CoV-2 a ľudskej RNázy P (služi ako interná kontrola na overenie správneho odberu vzoriek, extrakcie RNA a vykonania testu) alebo RNA Spike-In (služia ako kontrola na overenie extrakcie RNA, reverznej transkripcie a vykonania testu primárne v SARS-CoV-2 negatívnych vzorkách). **Na detekciu SARS-CoV-2 génu a RdRP génu sme vyvinuli patentované duálne TaqMan® sondy, ktorých použitie zvyšuje citlivosť a špecifickosť našej 1-krokovej RT-qPCR.** Kompletná genomická RNA vírusov SARS-CoV-2 obohatená ľudskou RNA poskytnutá Biomedicínskym centrom Slovenskej akadémie vied je zahrnutá ako vnútorná pozitívna kontrola. Exogénna pozitívna kontrola RNA Spike-In predstavuje non-human a non-SARS-CoV-2 RNA. Služí primárne ako interná kontrola pre negatívne vzorky na vylúčenie falošnej negativity. Reagensia 5X One-Step Probe CoV Mix (ROX) obsahuje ROX pasívnu referenčnú farbičku, ktorá ako inertné aditívum poskytuje konštantný fluorescenčný signál pre normalizáciu vzorky v real-time PCR reakcii. Vďaka jedinečnej molekulárnej štruktúre použitej farbičky ROX, je tento systém kompatibilný so všetkými ROX využívajúcimi (vysoký ROX, ako aj nízky ROX) a aj ROX nevyužívajúcimi real-time PCR cyklérmi.

rTEST COVID-19 qPCR Superplex test prebieha ako jednokroková reakcia, zahŕňajúca RT a qPCR v jednej skúmavke.

Jedno balenie kitu postačuje na 1000 testovacích reakcií. Multiplexný mód umožňuje súčasnú detekciu SARS-CoV-2 (potvrdenie COVID-19 pozitivity) a ľudskej RNázy P (služi na overenie kvality odberu a extrakcie RNA, na stanovenie prítomnosti ľudskej RNA v extrahovanej vzorke a overenie vykonania testu) alebo RNA Spike-In (služi na overenie kvality extrakcie RNA, reverznej transkripcie a vykonania testu primárne v SARS-CoV-2 negatívnych vzorkách), 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_E a SARS-CoV-2_RdRP, označená E gene/RdRP gene Mix (potrebne rozpustiť v 1000 µl PCR vody)

- 1x zmes lyofilizovaných primerov a sond na detekciu ľudskej RNázy P, označená RNase P Mix (potrebne rozpustiť v 1000 µl PCR vody)
- 1x zmes lyofilizovaných primerov a sond na detekciu RNA Spike-In, označená RNA Spike-In Mix (potrebne rozpustiť v 1000 µl PCR vody)
- 1x lyofilizovaná PC BMC5 obohatená ľudskou RNA (potrebne rozpustiť v 200 µl PCR vody)
- 1x lyofilizovaná RNA Spike-In (potrebne rozpustiť v 1800 µl PCR vody)
- 1x 4 ml 5x One-step Probe CoV Mix (ROX)
- 1x 500 µl 40x One-step SOLIScript® CoV Mix
- 1x 20 ml PCR water
- 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. Po rozpustení PC BMC5 a RNA Spike-In v potrebnom množstve PCR vody, je potrebné tieto RNA skladovať pri -20 °C. Bežne sa kit skladuje pri -20 °C. 5x One-step Probe CoV Mix (ROX) obsahuje referenčnú farbičku, ktorá je svetlicotlivá a mala by byť chránená 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 1000 reakcií.

Užívateľom, ktorí uskutočňujú menší počet reakcií v rámci jedného pracovného cyklu, odporúčame všetky zložky kitu rozalíkvtovať v súlade s interne zaužívanými postupmi a štandardným počtom reakcií na jeden pracovný cyklus. Alíkvtovanie zložiek kitu minimalizuje potrebu opakovaného otvárania jednotlivých skúmaviek a tým minimalizuje riziko kontaminácie zložiek kitu. Alíkvtovanie zložiek kitu taktiež zabráni opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu jednotlivých zložiek, ktoré môže viesť k zníženiu účinnosti. Pred alíkvtovaním 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 alíkvtovania 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) odporúčame 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: rTEST COVID-19 qPCR Superplex kit 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 pádru, ochranné okuliare, ochranný štít, respirátor FFP3, ochranné oblečenie
- Laboratórny plast 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
- Nádobá 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 alebo 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. Vyhybajte sa priamemu kontaktu s biologickým materiálom. Zabráňte rozliatiu vzoriek, reagensii a tvorbe aerosólov.
- Po príprave vzorky sa odporúča spustenie termocykléra hneď ako je možné, aby sa zabránilo jej prípadnej degradácii.
- 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 odboru 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. **Kit obsahuje exogénnu kontrolu RNA Spike-In, ktorá môže byť pridaná**

do testovanej vzorky pred extrakciou RNA. V prípade využitia tejto možnosti, pridajte 1,8 µl exogénnej RNA Spike-In do 140 - 200 µl vzorky určenej na extrakciu RNA, do ktorej bol vopred pridaný lyzačný roztok (objem patientskej vzorky a lyzačného roztoku závisí od metódy extrakcie). Následne je RNA extrahovaná postupom zaužívaným v danom laboratóriu. V prípade nedodržania uvedeného postupu sa vystavujete riziku hydrolyzy RNA a falošnej negatívite celej vzorky.

Súbežne s extrakciou RNA z patientskej vzorky sa odporúča pripraviť aspoň jednu vzorku, v ktorej je patientska vzorka nahradená PCR vodou. Po pridaní 1,8 µl RNA Spike-In do PCR vody sa táto podrobí celému procesu extrakcie RNA súbežne s patientskými vzorkami a slúži ako pozitívna kontrola pre RNA Spike-In.

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.

Pri extrakcii RNA postupujte podľa návodu výrobcu použitého extrakčného kitu. Kit rTEST COVID-19 qPCR Superplex 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)
- RNeasy Viral Genomic Reagent (magnetické guľičky, 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.

UPOZORNENIA!

- 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 jednorazové špičky s filtrom. Používajte špičky musia byť sterilné a bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz.

7.2. RT-qPCR

Pracovný postup rTEST COVID-19 qPCR Superplex kitu je založený na simultánnom skriningovom a konfirmačnom teste na detekciu prítomnosti vírusovej RNA pre E gén a RdRP gén. Navyše, test vnútornej kontroly ľudskej RNázy P (v Cy5 kanáli) v multiplexnom móde s E génom a RdRP génom slúži na overenie kvality výteru a extrakcie RNA, na stanovenie prítomnosti ľudskej RNA v extrahovanej vzorke, ako aj na sledovanie priebehu qPCR reakcie, čím sa eliminujú falošne negatívne výsledky. Test za použitia exogénnej kontroly RNA Spike-In (v Cy5 kanáli) v multiplexnom móde s E génom a RdRP génom slúži ako kontrola extrakcie RNA, reverznej transkripcie a PCR procesu primárne v SARS-CoV-2 negatívnych vzorkách.

UPOZORNENIE!

- RNáz P je ľudský transkript, preto primery a sondy dizajnované na jej detekciu môžu detegovať RNA a aj DNA, ak je prítomná vo vzorke.

7.3. Príprava pracovného priestoru

Pred začatím práce vyčistíte 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 spustíte 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 SOLLIScript[®] 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_E, SARS-CoV-2_RdRP, ľudskej RNázy P a exogénnej RNA Spike-In (poskytované ako E gene/RdRP gene Mix, RNase P Mix a RNA Spike-In Mix), pozitívna kontrola PC BMC5 obohatená ľudskou RNA a exogénna kontrola RNA Spike-In, sú kvôli zvýšeniu stability dodávané v lyofilizovanej podobe. Pri prvom použití kitu je preto nutné zmesi primerov a sond rozpustiť vo vode určenej pre 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 výtťažok.

Pridajte 1000 µl PCR vody do skúmavky PCR water do skúmavky označenej E gene/RdRP gene P Mix (1000 reakcií), rovnako pridajte po 1000 µl PCR vody do skúmaviek označených ako RNase P Mix a RNA Spike-In Mix (1000 reakcií). Následne pridajte 200 µl PCR vody do skúmavky obsahujúcej pozitívnu kontrolu PC BMC5 a 1800 µl PCR vody do skúmavky obsahujúcej exogénnu kontrolu RNA Spike-In.

Obsah skúmaviek dôkladne homogenizujte 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.

Príprava reakčnej zmesi

Zložka kitu	Objem zložky kitu na reakciu
PCR water	8,5 µl
5X One-step Probe CoV Mix (ROX)	4 µl
40X One-step SOLIScript® CoV Mix	0,5 µl
E gene/RdRP gene Mix	1 µl
RNase P Mix alebo RNA Spike-In Mix	1 µl
Celkový objem	15 µl

Tabuľka vypočítaných objemov na daný počet reakcií:

Zložka kitu	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
E gene/RdRP gene Mix	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl	6 µl	7 µl	8 µl	9 µl	10 µl	96 µl
RNase P Mix alebo RNA Spike-In Mix	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl	6 µl	7 µl	8 µl	9 µl	10 µl	96 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

VAROVANIE!

S reagenciami manipulujte vždy v boxe s laminárnym prúdením vzduchu. Reagencie určené na amplifikáciu pripravujte vždy oddelene, naraz pripravujte reagencie výlučne pre jednu analýzu. Na prípravu reagencií 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 kite 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:

UPOZORNENIA!

- Namiešaná reakčná zmes má limitovanú stabilitu, použite ju v čo možno najkratšom čase po príprave. Ak nie je možné namiešanú reakčnú zmes použiť ihneď, skladujte 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.

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 striepok 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, 5 µl pozitívnej kontroly (PC BMC5), 5 µl PCR vody (PCR water) alebo 5 µl pozitívnej kontroly pre RNA Spike-In 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 1 negatívnu kontrolu na overenie prítomnosti kontaminácie. Ako negatívna kontrola slúži kontrola bez templátu (NTC) obsahujúca PCR vodu namiesto neznámej vzorky.

Do každej analýzy je nutné zahrnúť 1 pozitívnu kontrolu na overenie správneho priebehu analýzy a funkčnosti zložiek kitu. Ako pozitívna kontrola slúži reakcia obsahujúca kontrolný materiál PC BMC5 namiesto neznámej vzorky.

Pozitívna kontrola (PC BMC5) nachádzajúca sa v kite je kompletná jednovláknová RNA vírusu SARS-CoV-2

obohatená ľudskou RNA. Pozitívna kontrola PC BMC5 poskytuje pozitívny výsledok so sadami primerov a sond pre E gén, RdRP gén a ľudskú RNázu P.

V prípade použitia syntetickej kontroly RNA Spike-In počas extrakcie RNA, sa odporúča do analýzy zahrnúť minimálne 1 pozitívnu kontrolu pre RNA Spike-In. Na tento účel slúži PCR voda namiesto pacientskej vzorky s prídavkom 1,8 µl RNA Spike-In, ktorá sa podrobila celému procesu extrakcie RNA súbežne s pacientskými vzorkami.

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 kitom:

- 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 farbičku FAM: modrý alebo zelený kanál podľa použitého real-time PCR zariadenia - excitačné maximum 495 nm, emisné maximum 520 nm
- Optický kanál pre farbičku YY: žltý kanál (HEX, JOE, VIC) podľa použitého real-time PCR zariadenia - excitačné maximum 525 nm, emisné maximum 550 nm
- Optický kanál pre farbičku ROX: oranžový alebo červený kanál podľa použitého real-time PCR zariadenia - excitačné maximum 575 nm, emisné maximum 605 nm
- Optický kanál pre farbičku Cy5: červený kanál - excitačné maximum 650 nm, emisné maximum 670 nm

V prípade real-time PCR zariadení podporujúcich normalizáciu na základe prítomnosti pasívnej referenčnej fluorescenčnej farbičky ROX v reakčnej zmesi, odporúčame uskutočnenie analýzy so zapnutím tejto funkcie. Fluorescenčný signál farbičky ROX nezasahuje do detekčného kanálu fluorescenčných farbičiek FAM, HEX a Cy5. rTEST COVID-19 qPCR Superplex kit je plne kompatibilný aj s real-time PCR zariadeniami, ktoré funkciu normalizácie farbičkou 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 baseline 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 (PCR water) pri reakciách RT-qPCR namiesto RNA. NTC reakcie pre všetky sady primerov a sond by nemali vykazovať amplifikačné krivky, ktoré prekročia prahovú čiaru. Ak ktorákoľvek z reakcií NTC vykazuje amplifikačnú krivku, ktorá prekročí prahovú čiaru, môže ísť o prípadnú kontamináciu vzorky. Zastavte test a opätovne ho opakujte s prísnyim dodržaním pracovného postupu opísaného v manuáli.
- Pozitívna kontrola PC BMC5**
PC BMC5 pozostáva z lyofilizovanej izolovanej genomovej RNA vírusu SARS-CoV-2 obohatenej koprecipitantom (vo forme salmon sperm DNA alebo Baker's yeast tRNA na zvýšenie stability) a ľudskou RNA. PC BMC5 poskytuje pozitívny výsledok so sadami primerov a sond pre E gén, RdRP gén a ľudskú RNÁzu P. Štandardné hodnoty Ct pre pozitívnu kontrolu PC BMC5 by mali byť nižšie ako 35,00 pre všetky testované markery – E gén, RdRP gén a RNÁzu P. Úroveň signálu (t. j. relatívna fluorescencia bez normalizácie s farbíčkou ROX) pre všetky tri gény by mala mať hodnoty nad 1000 RFU. Medzi indikácie chyby alebo zlyhania v pracovnom postupe alebo analýze experimentu patri: 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.

- Pozitívna kontrola pre RNA Spike-In**
V prípade použitia exogénnej kontroly RNA Spike-In počas extrakcie RNA, sa odporúča do analýzy zahrnúť minimálne 1 pozitívnu kontrolu pre RNA Spike-In. Na tento účel slúži PCR voda namiesto patientskej vzorky s prídavkom 1,8 µl RNA Spike-In, ktorá sa podrobila celému procesu extrakcie RNA súbežne s patientskými vzorkami. Exogénna kontrola RNA Spike-In poskytuje pozitívny výsledok iba so sadou primerov RNA Spike-In Mix. Štandardné hodnoty Ct pre RNA Spike-In by mali byť nižšie ako 37,00. Pozitívny výsledok pre SARS-CoV-2 markery v pozitívnej kontrole pre RNA Spike-In naznačuje kontamináciu vzorky.
- RNÁza P (kontrola správnosti odberu, RNA extrakcie a vykonania testu)**
 - » Všetky klinické vzorky by mali vykazovať amplifikačné krivky v reakcii RNÁzu P, ktoré prekračujú prahovú hranicu v rámci 35,00 cyklov (Ct <35,00), čo naznačuje prítomnosť RNA z génov ľudskej RNÁzu P vo vzorke. 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 RNÁzu P neprináša pozitívny výsledok pre ľudskú klinickú vzorku, interpretácia je nasledovná:
 - Ak sú testy SARS-CoV-2_E a SARS-CoV-2_RdRP pozitívne, aj keď neexistuje pozitívna RNÁza P, výsledok by sa mal považovať za platný.

Niektoré vzorky nemusia vykazovať amplifikačné krivky RNÁzu P kvôli nízkemu počtu buniek v pôvodnej klinickej vzorke. Negatívny signál RNÁzu P nevyučuje 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, mali by sa odobrať nové vzorky.

- RNA Spike-In (kontrola RNA extrakcie, reverznej transkripcie a qPCR reakcie, kontrola na vylúčenie falošnej negativity patientskych vzoriek)**
 - » V prípade použitia exogénnej kontroly RNA Spike-In, sa očakáva pozitívny výsledok so sadou primerov a sond pre RNA Spike-In. Štandardné hodnoty Ct pre RNA Spike-In by mali byť nižšie ako 37,00. Negatívny výsledok exogénnej kontroly vo vzorkách charakterizovaných ako SARS-CoV negatívne, môže naznačovať:
 - nesprávnu extrakciu nukleových kyselín, ktorej výsledkom je neprítomnosť a/alebo degradácia RNA
 - nesprávnu reverznú transkripciu
 - nesprávne nastavenie a vykonanie testu
 - nefunkčnosť zložky kitu alebo porucha zariadenia
 - » Ak analýza exogénnej kontroly RNA Spike-In neprináša pozitívny výsledok, interpretácia je nasledovná:
 - Ak sú testy SARS-CoV-2_E a SARS-CoV-2_RdRP pozitívne, aj keď neexistuje pozitívny signál v RNA Spike-In, výsledok by sa mal považovať za platný. V prípade pozitívnych vzoriek nemusí dochádzať k amplifikácii exogénnej kontroly RNA Spike-In. V rámci klinickej validácie bol pozitívny signál pre RNA Spike-In detegovaný v takmer 95 % SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek s Ct nad 27 a vo všetkých SARS-CoV-2 negatívnych vzorkách. Negatívny signál RNA Spike-In nevyučuje prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v klinickej vzorke.

- Ak sú všetky markery SARS-CoV-2 a RNA Spike-In negatívne, výsledok by sa mal považovať za neplatný. V takomto prípade odporúčame vykonať test na ľudskú RNÁzu P. Ak je detekcia RNÁzu P negatívna, výsledok je neplatný. Ak je to možné, mali by sa odobrať nové vzorky. Ak je výsledok pre RNÁzu P pozitívny, vzorku môžeme považovať za negatívnu. Aj v takomto prípade sa však odporúča odber novej vzorky.

Očakávaný výsledok kontrol zahrnutých v teste rTEST COVID-19 qPCR Superplex

Typ kontroly	Externá kontrola	Gén E	Gén RdRP	Ľudská RNÁza P	Spike-In	Očakávané hodnoty Ct	Možné príčiny neočakávaného výsledku
Pozitívna	PC BMC5	+	+	+	-	Ct<35,00	Zlyhanie reagencií vrátane integrity primerov a sond
Negatívna	NTC	-	-	-	-	Nedetektovateľné	Kontaminácia reagencií a/alebo prostredia
Pozitívna kontrola pre RNA Spike-In	PCR voda + Spike-In po extrakcii RNA	-	-	-	+	Ct<35,00	Nesprávna extrakcia a reverzná transkripcia RNA, zlyhanie reagencií vrátane integrity primerov a sond

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

- SARS-CoV-2 markery (E a RdRP)**
 - » Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný profil, vzorka sa považuje za **negatívnu**, ak amplifikačné krivky pre oba SARS-CoV-2 gény (E, RdRP) **neprekročia** prahovú čiaru v rámci 40,00 cyklov (Ct > 40,00) a amplifikačná krivka RNÁzu P prekročí prahovú čiaru v rámci 35,00 cyklov (Ct <35) alebo amplifikačná krivka RNA Spike-In prekročí prahovú čiaru v rámci 37,00 cyklov (Ct <37).
 - » Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný profil, vzorka sa považuje za **pozitívnu**, ak amplifikačné krivky pre oba SARS-CoV-2 gény (E, RdRP) prekročia prahovú hranicu v rámci 40,00 cyklov (Ct <40,00). RNÁza P alebo RNA Spike-In môže alebo nemusí byť pozitívna, ako je opísané vyššie, ale výsledok SARS-CoV-2 je stále platný.

- » Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný profil a amplifikačné krivky pre oba SARS-CoV-2 gény (E, RdRP) **neprekročia** prahovú hranicu v rámci 40,00 cyklov (Ct <40,00) a ani krivky pre RNÁzu P alebo RNA Spike-In **neprekročia** prahovú hranicu v rámci 35,00 alebo 37,00 cyklov (Ct <35,00 pre RNÁzu P a Ct <37,00 pre RNA Spike-In), výsledok sa považuje za **neplatný**. Extrahovaná RNA zo vzorky by sa mala znovu testovať. Ak nie je k dispozícii zvyšková RNA, reextrahujte RNA zo zvyškovej vzorky a test zopakujte. Ak je opakovaná skúška negatívna pre všetky markery a RNÁzu P alebo RNA Spike-In, výsledok je neplatný a mal by sa zväziť odber novej vzorky od pacienta.
- » Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný profil a amplifikačná krivka pre jeden z génov SARS-CoV-2 (E alebo RdRP, ale nie oba) prekročí prahovú hranicu 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, reextrahujte RNA zo zvyškovej vzorky a test zopakujte. Ak sa dosiahne rovnaký výsledok, nahláste nepreukazný výsledok. Poradte sa s príslušným orgánom verejného zdravotníctva o ďalšom ďalšom usmerení a/alebo koordinácie odberu vzorky na ďalšiu analýzu.

- **Spravidca interpretáciou výsledkov diagnostického testu rTEST COVID-19 qPCR Superplex**

V nasledujúcich tabuľkách sú uvedené očakávané výsledky pre diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR Superplex. 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.

RdRP a ľudská RNÁza P, bola stanovená aj nezávislým laboratóriom v Holandsku (National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Ministry of Health, Welfare and Sport; Centre for Infectious Diseases Research, Diagnostics and Laboratory Surveillance), kde sériové riedenie RNA SARS-CoV-2 (RNA kmeňa hCoV-19 / Holandsko / NoordBrabant_10003/2020, koncentrácia stanovená pomocou digitálnej PCR na 1260 kópii/μl) bolo použité na stanovenie 95 % limitu detekcie (LoD95%). Test bol uskutočnený v 4 replikátoch pre každé pripravené dvojnásobné riedenie. LoD95% bolo stanovené pomocou Probit analýzy (SPSS Statistics). Na základe výsledkov experimentu bolo LoD95% pre E gén určené na 0,14 kópie na reakciu (= 0,028 kópie/μl) a pre RdRP gén na 0,12 kópie na reakciu (= 0,024 kópie/μl). Na základe vykonanej štúdie je rTest akceptovaný v Holandsku ako vhodný kit na detekciu SARS-CoV-2.

9.2. Špecifita kitu

Hodnotenie špecifity (krížovej reaktivity) na iné koronavírusy a respiračné vírusy) bolo uskutočnené pre E gén ako aj pre RdRP gén SARS CoV-2. Test bol uskutočnený pomocou kontrolného materiálu „Coronavirus RNA specificity panel“ (EVAg, European Virus Archive - Global), ktorý obsahuje RNA vírusov HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-N163, SARS-CoV HKU39849 a MERS-CoV, každú v samostatnej skúmavke. EDX SARS-CoV-2 Standard (Exact Diagnostics) slúžil ako referenčný materiál na stanovenie špecifity kitu.

Na hodnotenie krížovej reaktivity na respiračné vírusy bol použitý súbor respiračných vírusov (Viracell microbiologistics), ktorý obsahuje RNA vírusov Influenza A H1N1, Novel Influenza A H1N1, Influenza A H3N2, Influenza A H5N1, Novel Influenza B, Human parainfluenza, Human rhinovirus a Respiratory syncytial virus, každú v samostatnej skúmavke. Test bol uskutočnený v 3 replikátoch pre každý z uvedených vírusov.

Test potvrdil vysokú špecifitu diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR. Pozitívny výsledok za použitia primerov a sond na detekciu E génu a RdRP génu SARS CoV-2 bol zaznamenaný výlučne v reakciách obsahujúcich SARS-CoV-2 RNA (Exact diagnostics, PC BMC5).

Výskyt kontaminácie syntetickými pozitívnymi kontrolami v rôznych komerčne dostupných produktoch používaných na uskutočnenie RT-qPCR diagnostiky ochorenia COVID-19, ako sú napr. primery, sondy alebo RT-PCR zmesi, predstavuje globálny problém. Zmes primerov a sondy na detekciu SARS-CoV-2 E génu v kite rTEST COVID-19 qPCR Superplex bola navrhnutá tak, aby neamplifikovala najčastejšie používané syntetické pozitívne kontroly vôbec alebo len s nízkou účinnosťou. Kit rTEST COVID-19 qPCR Superplex tak môže byť účinne použitý aj na pracoviskách, ktoré majú problém s kontamináciou pri testovaní prítomnosti E génu SARS-CoV-2.

Hodnotenie chemickej stability (degradácie sond počas termálneho cyklu) bolo uskutočnené pre SARS-CoV-2 E gén a RdRP gén. Test bol uskutočnený formou mnohonásobnej analýzy kontrol bez templátu (NTC) v počte 20 replikátov pre E gén a 40 replikátov pre RdRP gén. Test potvrdil vysokú chemickú stabilitu oligonukleotidov obsiahnutých v kite rTEST COVID-19 qPCR Superplex. V každej z analyzovaných NTC bol zaznamenaný negatívny výsledok bez náznaku zvýšenia signálu alebo prítomnosti amplifikácie.

Interpretácia testu na SARS-CoV-2 markery a ľudskú RNÁzu P alebo RNA Spike-In

SARS-CoV-2 E gén	SARS-CoV-2 RdRP gén	Ľudská RNÁza P alebo RNA Spike-In	Interpretácia výsledkova ^a	Správa	Postup
+	+	+/-	SARS-CoV-2 detekovaný	SARS-CoV-2 pozitívny	Oznámte výsledky žiadateľovi.
+	-	+/-	Nepreukazný výsledok	Nepreukazný	Opakujte testovanie nukleovej kyseliny a/alebo reextrahujte a opakujte RT-qPCR. Ak opakovaný výsledok zostane nepreukazný, požiadajte príslušný orgán verejného zdravotníctva o ďalšie pokyny.
-	+	+/-			
-	-	+	SARS-CoV-2 Nedetekovaný	Nedetekovaný	Oznámte výsledky žiadateľovi. Zväzte testovanie na iné respiračné vírusy ^b .
-	-	-	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.

^b Optimálne načasovanie odberu vzorky s maximálnymi hladinami vírusu počas infekcií spôsobených SARS-CoV-2 nebolo stanovené. Na detekciu vírusu môže byť potrebné zhromaždiť viac vzoriek od toho istého pacienta. Možnosť falošne negatívnych výsledkov by sa mala zväziť najmä v prípade, že nedávne expozície alebo klinický obraz pacienta svedčia o chorobe COVID-19, zatiaľ čo diagnostické testy na iné ochorenia (napr. iné respiračné ochorenia) sú negatívne. Ak je infekcia SARS-CoV-2 stále podozrivá, malo by sa po konzultácii s príslušnými orgánmi verejného zdravotníctva zväziť opakované testovanie.

UPOZORNENIE!

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

μl (=10 kópii/reakciu), 0,8 kópii/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 75 000 kópii/ml, alebo exogénna kontrola RNA Spike-In v koncentrácii 1000 kópii na reakciu. Test bol uskutočnený v 8 replikátoch pre každé pripravené riedenie.

Test potvrdil vysokú citlivosť diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR Superplex. Spoločlivá detekcia templátu, pre stanovenie prítomnosti E génu a RdRP génu v kombinácii s ľudskou RNÁzou P bola preukázaná do koncentrácie 2 kópie na reakciu (0,4 kópii na 1 μl vzorky) a následne bola potvrdená rozšíreným testom detekčného limitu, kde z 24 replikátov, 23 bolo pozitívnych pre E gén a 22 bolo pozitívnych pre RdRP gén*. V prípade multiplexnej detekcie E génu, RdRP génu a RNA Spike-In bola rovnako stanovená citlivosť 2 kópie na reakciu (0,4 kópii na 1 μl vzorky), ktorá bola potvrdená rozšíreným testom detekčného limitu, kde z 24 replikátov bolo 23 pozitívnych pre E gén a RdRP gén. Vysoká citlivosť kitu rTEST pre kombináciu génov E,

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 E génu a RdRP génu spolu s ľudskou RNÁzou P, a pre kombináciu primerov a sond umožňujúcich multiplexnú detekciu SARS-CoV-2 E génu a RdRP génu spolu s RNA Spike-In. Test bol uskutočnený pomocou kontrolného materiálu „SARS-CoV-2 Standard“ (Exact Diagnostics, <http://www.exactdiagnostics.com/sars-cov-2-standard.html>), ktorý v neriedenom stave obsahuje 200 kópii templátu na 1 μl. Sériovým riedením boli pripravené riedenia s koncentraciami 8 kópii/μl (=40 kópii/reakciu), 2 kópie/

Detekčný limit testu pre SARS-CoV-2 E gén a RdRP gén v kombinácii s ľudskou RNázou P

	E gene/RdRP gene Mix + RNase P Mix		
	Celkový počet replikátov	Počet reakcií s pozitívnym výsledkom	Úspešnosť detekcie (%)
40 kópií/reakciu	8	8/8/8	100/100/100
10 kópií/reakciu	8	8/8/8	100/100/100
4 kópie/reakciu	8	8/8/8	100/100/100
2 kópie/reakciu	8	8/8/8	100/100/100
1 kópia/reakciu	8	0/2/8	0/25/100
2 kópie/reakciu*	24	23/22/24	96/92/100

* Rozšírené LoD pre 2 kópie/reakciu

Detekčný limit testu pre SARS-CoV-2 E gén a RdRP gén v kombinácii s RNA Spike-In

	E gene/RdRP gene Mix + RNA Spike-In Mix		
	Celkový počet replikátov	Počet reakcií s pozitívnym výsledkom	Úspešnosť detekcie (%)
40 kópií/reakciu	8	8/8/8	100/100/100
10 kópií/reakciu	8	8/8/8	100/100/100
4 kópie/reakciu	8	8/8/8	100/100/100
2 kópie/reakciu	8	8/8/8	100/100/100
1 kópia/reakciu	8	1/1/8	12,5/12,5/100
2 kópie/reakciu	24	23/23/24	96/96/100

* Rozšírené LoD pre 2 kópie/reakciu

9.3. Hodnotenie klinickej výkonnosti

Hodnotenie klinickej výkonnosti kitu rTEST COVID-19 qPCR Superplex bolo uskutočnené multiplexným testom pre kombináciu génov SARS-CoV-2 E gén, RdRP gén a ľudská RNáza P a aj pre kombináciu SARS-CoV-2 E gén, RdRP gén a RNA Spike-In. V prípade kombinácie E gén, RdRP gén a ľudská RNáza P bolo hodnotenie uskutočnené na vybranom súbore 38 pozitívnych a 54 negatívnych klinických vzoriek pacientov, a v prípade kombinácie E gén, RdRP gén a RNA Spike-In bolo hodnotenie uskutočnené na súbore 62 pozitívnych a 45 negatívnych klinických vzoriek pacientov. Výsledky pre E gén a RdRP gén boli potvrdené referenčnou metódou štandardne

používanou na rutinné testovanie regionálnymi úradmi verejného zdravotníctva Slovenskej republiky. Pred izoláciou RNA boli vzorky jedenkrát rozmrazené. Testovanie tohto vybraného súboru vzoriek bolo uskutočnené so zaslepenými vzorkami. Analýza SARS-CoV-2 vzoriek potvrdila výsledky referenčnej metódy a preukázala vysokú spoľahlivosť a reprodukovateľnosť výsledkov nadobudnutých pomocou kitu rTEST COVID-19 qPCR Superplex (viď tabuľky nižšie). V porovnaní referenčnej metódy a diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR Superplex je pre E gén a RdRP gén diagnostická citlivosť 100 % a diagnostická špecifická 100 %. Vo všetkých testovaných vzorkách bola pozitívne detegovaná

RNáza P. Falošná SARS-CoV-2 negativita bola vylúčená detekciou RNA Spike-In v 44 zo 45 SARS-CoV-2 negatívnych vzoriek. Negativita vzorky, u ktorej zlyhala detekcia RNA Spike-In, bola potvrdená pozitívnym testom na ľudská RNáza P. Navyše, RNA Spike-In bol detegovaný v takmer 95 % SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek s Ct nad 27. Výsledky detekcie génu pre RNáza P a RNA Spike-In vykazovali vysokú homogenitu v analyzovaných vzorkách a taktiež potvrdili vhodnosť detekcie RNáza P ako internej kontroly pre odber a RNA extrakciu z klinickej vzorky a RNA Spike-In ako vhodnej kontroly extrakcie RNA, jej reverznej transkripcie a vylúčenia falošnej SARS-CoV-2 negativity.

Hodnotenie klinickej výkonnosti pre SARS-CoV-2 E gén, RdRP gén a ľudská RNáza P

	Referenčná metóda		E gene/RdRP gene Mix + RNase P Mix		
	E gén	RdRP gén	E gén	RdRP gén	RNáza P gén
Počet markerov správne identifikovaných v 38 SARS-CoV-2 pozitívnych vzorkách	37	33	38	38	38
Počet falošne negatívnych markerov	1	5	0	0	0
Počet markerov správne identifikovaných v 54 SARS-CoV-2 negatívnych vzorkách	54	54	54	54	54
Počet falošne pozitívnych markerov	0	0	0	0	0

Hodnotenie klinickej výkonnosti pre SARS-CoV-2 E gén, RdRP gén a RNA Spike-In

	Referenčná metóda		E gene/RdRP gene Mix + RNA Spike-In Mix					
	E gén	RdRP gén	E gén	RdRP gén	RNA Spike-In			
					Pozitívny (celkový počet)	Negatívny - priemerné Ct pre E gén a RdRP gén <27	Negatívny - priemerné Ct pre E gén a RdRP gén >27	Negatívny - SARS-CoV-2 negatívne vzorky
Počet markerov správne identifikovaných v 62 SARS-CoV-2 pozitívnych vzorkách	62	62	62	62	32	29	1	–
Počet markerov správne identifikovaných v 45 SARS-CoV-2 negatívnych vzorkách	45	45	45	45	44	–	–	1

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 reagenty 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: rtest@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: P1430A

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