

Návod na použitie

Ver. 1.2 (sk), 12/2021



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-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

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 Rapid kit je kvalitatívny *in vitro* test určený na detekciu prítomnosti genetického materiálu koronavírusu SARS-CoV-2 vo vzorkách získaných kľotkaním bez predchádzajúcej izolácie RNA. 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 Rapid kit je diagnostický kit určený na detekciu genomickej RNA vírusu SARS-CoV-2 zo vzoriek získaných kľotkaním bez predchádzajúcej

extrakcie RNA. Kit je možné skladovať pri izbovej teplote po dobu dvoch týždňov, 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, interná pozitívna kontrola (úplná genomická RNA vírusu SARS-CoV-2 obohatená ľudskou RNA) a reagencie pre jedнокrokovú RT-qPCR od spoločnosti Solis Biotec, ktoré sú tiež stabilné pri izbovej teplote.

Diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR Rapid je vylepšená a prepracovaná verzia Charité, Berlin diagnostického protokolu, odporúčaného WHO pre detekciu vírusu SARS-CoV-2. Kit obsahuje tri sady primerov a hydrolyzačných sond (TaqMan®) pre multiplexnú detekciu SARS-CoV-2 špecifického E génu a RdRP génu, spolu s ľudskou RNázou P. TaqMan® sondy pre E gén sú konjugované s fluorescenčnou farbičkou YY, TaqMan® sondy pre RdRP gén sú konjugované s fluorescenčnou farbičkou FAM a TaqMan® sonda pre RNázu P je konjugovaná s fluorescenčnou farbičkou Cy5. Takéto značenie umožňuje multiplexnú detekciu SARS-CoV-2 a ľudskej RNázy P, ktorá slúži ako interná kontrola na overenie správneho odberu vzoriek a vykonania testu. Na detekciu SARS-CoV-2 E 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 Biomedicinským centrom Slovenskej akadémie vied je zahrnutá ako vnútorná pozitívna kontrola.

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

Jedno balenie kitu postačuje na 400 testovacích reakcií. Multiplexný mód umožňuje súčasnú detekciu SARS-CoV-2 (potvrdenie COVID-19 pozitivity) a ľudskej RNázy P, ktorá slúži na overenie kvality výteru, na stanovenie prítomnosti ľudskej RNA vo 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-E, SARS-CoV-2-RdRP a ľudskej RNázy P, označená E gene/RdRP gene/RNase P Mix (potrebné rozpustiť v 800 µl PCR vody)
- 1x lyofilizovaná PC BMC5 obohatená ľudskou RNA (potrebné rozpustiť v 320 µl PCR vody)
- 2x 800 µl 5X One-step Probe Direct Mix 3
- 1x 200 µl 40X One-step RT Direct Mix 2
- 1x lyofilizovaný 10X Rapid Lysis Buffer A

- 1x 4,4 ml 10X Rapid Lysis Buffer B
- 2x 5 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 2 týždňov. Bežne sa kit skladuje pri -20 °C. 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, odporúčame všetky zložky kitu rozalíkovat' v súlade s interne zaužívanými postupmi a štandardným počtom reakcií na jeden pracovný cyklus. Alikvotovanie zložiek kitu minimalizuje potrebu opakovaného otvárania jednotlivých skúmaviek a tým minimalizuje riziko kontaminácie zložiek kitu. Alikvotovanie zložiek kitu taktiež zabráni opakovaniu rozmrazovaniu a zmrazovaniu jednotlivých zložiek, ktoré môže viesť k zníženiu účinnosti. Pred alikvotovaním 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 alikvotovania je nevyhnutné obsah skúmaviek dôkladne ale zároveň opatrne premiešať, aby bol úplne homogénny. V prípade skúmaviek obsahujúcich enzýmy (5X One-step Probe Direct Mix 3, 40X One-step RT Direct Mix 2) 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 reagenciami si vždy dôkladne umyte ruky.

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

- Real-time PCR zariadenie: rTEST COVID-19 qPCR Rapid 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 púdry, 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
- Autoklávovatelné nastaviteľné mikropipety
- Nádoba na biologický odpad
- Autoklávovatelné 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, reagensií a tvorbe aerosólov.
- Po príprave vzorky sa odporúča spustenie termocykluára hneď ako je možné, aby sa zabránilo jej prípadnej degradácii.
- Postupujte presne podľa priloženého návodu na použitie.

7.1. Odber vzorky

rTEST COVID-19 qPCR Rapid kit je navrhnutý na použitie so vzorkami získanými kloktaním. Nedodržanie pokynov popísaných nižšie, nevhodný postup pri odbere, preprave a skladovaní vzoriek môže viesť k nesprávnemu výsledku testovania.

UPOZORNENIA!

- Postup kloktania popísaný nižšie je iba odporúčaním. Optimálny spôsob kloktania pre detekciu SARS-CoV-2 nebol doposiaľ stanovený.
- Neodporúča sa jesť, piť, umývať si zuby, vyplachovať ústa, kloktat, žuť žuvačky alebo fajčiť/ inhalovať najmenej jednu hodinu pred odberom vzorky.
- Odporúča sa použitie komerčných solných izotonických roztokov, avšak nekomerčné na mieste pripravené roztoky sú prijateľné, pokiaľ použitá voda je kvality Aqua pro injectione alebo ekvivalentná.

Odber vzoriek:

- Pacientovi sa podá vhodná nádoba (napríklad polypropylénová 50 ml skúmavka) obsahujúca 5 ml izotonického solného roztoku (hmotnostných 0,9 % NaCl vo vode).
- Následne je pacient požiadaný, aby 10-krát vykloktal poskytnutý solný roztok po dobu 5 sekúnd, pričom si treba dávať pozor, aby nedošlo k prehltnutiu roztoku. Celkové trvanie odberu je približne 1 minúta.
- Pacient pomaly a opatrne vypluje kloktadlo do pripravenej nádoby (napríklad do tej, v ktorej bol poskytnutý fyziologický roztok). Po vonkajšej dezinfekcii nádoby je vzorka získaná kloktaním pripravená na ďalšie spracovanie.
- Ak inaktivácia nemôže byť vykonaná okamžite, skladujte čerstvé vzorky získané kloktaním pri +4 °C počas maximálne jedného týždňa.

Príprava inaktivačného roztoku 10X Rapid Lysis Buffer A

Pridajte 4180 µl 10X Rapid Lysis Buffer B do skúmavky obsahujúcej lyofilizovaný 10X Rapid Lysis Buffer A. Obsah skúmavky dôkladne premiešajte vortexovaním. Takto pripravený 10X Rapid Lysis Buffer A odporúčame podľa potreby rozalíkvtovať a uchovávať pri -20 °C.

Spracovanie vzorky:

- Vzorku získanú kloktaním opatrne ale dobre premiešajte, aby sa resuspendoval všetok usadený materiál. Agresívne vŕhanie môže viesť k peneniu a špliechaniu, ktoré v tomto bode nesie významné biologické riziko, pretože vzorka ešte nebola inaktivovaná.
- V skúmavke s minimálnym objemom 200 µl (napríklad PCR alebo 0,5 ml skúmavka) zmiešajte vzorku (9 dielov) s pripraveným inaktivačným roztokom 10X Rapid Lysis Buffer A (1 diel), konkrétne: 90 µl vzorky získanej kloktaním + 10 µl 10X Rapid Lysis Buffer A
- Zatvorte skúmavku, obsah premiešajte a krátko scentrifugujte.
- Nechajte inkubovať pri izbovej teplote 3 minúty. Mierne dlhšie inkubačné časy (do 10 minút) nemajú negatívny efekt.
- Vzorku zahrievajte 7 minút na 95 °C. Tento krok tepelne inaktívuje vírusové častice a uvoľní vírusovú RNA do roztoku.
- Krátko (1 minúta) scentrifugujte vzorku na stolnej mini centrifúge. Vyzrážané bielkoviny a iný nerozpustný materiál vytvoria na dne peletu. Získaný supernatant sa použije ako vstupný materiál pre RT-qPCR reakciu.
- V ideálnom prípade by sa mali inaktívované vzorky získané kloktaním analyzovať čo najskôr; sú však stabilné po dobu jedného dňa pri -20 °C. Z dlhodobého hľadiska by sa inaktívované vzorky mali skladovať pri -70 °C alebo nižšej teplote. Zabráňte opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu vzoriek.

UPOZORNENIE!

- 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.

7.2. RT-qPCR

Pracovný postup rTEST COVID-19 qPCR Rapid kitu je založený na simultánnom skríningovom a konfirmačnom teste na detekciu prítomnosti vírusovej RNA pre E gén a RdRP gén. Navyše, test vnútornej kontroly ľudského RNázy P (v Cy5 kanáli) v multiplexnom móde s E génom a RdRP génom slúži na overenie kvality odberu vzorky, na stanovenie prítomnosti ľudskej RNA vo vzorke, ako aj na sledovanie priebehu qPCR reakcie, čím sa eliminujú falošne negatívne výsledky.

UPOZORNENIE!

- RNáza 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 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 reagensií

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 Direct Mix 3, 40X One-step RT Direct Mix 2) 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 a ľudskej RNázy P (poskytované ako E gene/RdRP gene/RNase P Mix) a pozitívna kontrola PC BMC5 obohatená ľudskou RNA, 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 výťažok.

Pridajte 800 µl PCR vody do skúmavky PCR water do skúmavky označenej E gene/RdRP gene/RNase P Mix (400 reakcií). Následne pridajte 320 µl PCR vody do skúmavky obsahujúcej pozitívnu kontrolu PC BMC5.

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 vrát'ťte 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 reagentami 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.

Príprava reakčnej zmesi

Zložka kitu	Objem zložky kitu na reakciu
PCR water	5.5 µl
5X One-step Probe Direct Mix 3	4 µl
40X One-step RT Direct Mix 2	0.5 µl
E gene/RdRP gene/RNase P Mix	2 µl
Celkový objem	12 µl

Tabuľka vypočítaných objemov na daný počet reakcií:

Zložka kitu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	96
PCR water	5.5 µl	11 µl	16.5 µl	22 µl	27.5 µl	33 µl	38.5 µl	44 µl	49.5 µl	55 µl	528 µl
5X One-step Probe Direct Mix 3	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 RT Direct Mix 2	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/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	12 µl	24 µl	36 µl	48 µl	60 µl	72 µl	84 µl	96 µl	108 µl	120 µl	1152 µl

7.6. Príprava platničky a kontroly

K pripraveným 12 µl reakčnej zmesi pridajte 8 µl inaktívanej vzorky. Výsledný celkový objem reakcie je 20 µl.

Pripravte 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 znútra viečka a všetka tekutina bola na dne skúmavky. Z pripravenej reakčnej zmesi rozpipetujte po 12 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 8 µl vzorky alebo 8 µl pozitívnej kontroly (PC BMC5) alebo 8 µl PCR vody (PCR

water) do príslušných PCR skúmaviek alebo jamiek PCR platničky. Následne dôkladne uzavrite jednotlivé PCR skúmavky vrchnákmi 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 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 minimálne 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 všetkými sadami primerov a sond (pre E gén, RdRP gén a ľudskú RNÁzu 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 kitom:

- Reverzná transkripcia: 50 °C, 15 min
- Prvotná denaturácia: 95 °C, 10 min
- Cyklovanie, 45 cyklov:
 - Denaturácia: 95 °C, 1 s
 - Anelácia/extenzia: 60 °C, 5 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 Cy5: červený kanál - excitačné maximum 650 nm, emisné maximum 670 nm

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 odberu 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 genómovej 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 všetkými sadami primerov a sond (pre gény E, RdRP 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 pre všetky tri gény by mala mať hodnoty nad 1000 RFU. 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 odlišit negatívne a falošne negatívne výsledky. Výstup takejto analýzy nie je možné vyhodnotiť.

- » Ak analýza RNÁzy P neprináša pozitívny výsledok pre ľudské klinické vzorky, 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 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 pôvodná vzorka, zopakujte celý test. Ak po opakovanom teste zostanú všetky markery negatívne, oznámte výsledky ako neplatné a ak je to možné, mali by sa odobrať nové vzorky.

• 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 RNÁzy P prekročí prahovú čiaru v rámci 35,00 cyklov (Ct < 35,00).
- » 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 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 krivka pre RNÁzu P **neprekročí** prahovú hranicu v rámci 35,00 cyklov (Ct < 35,00), výsledok sa považuje za **neplatný**. Ak je to možné, vzorka by mala byť opakovane otestovaná. Ak je opakovaná skúška negatívna pre všetky markery a RNÁzu P, 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**. Ak je to možné, vzorka by mala byť opakovane otestovaná. Ak to možné nie je, odoberte novú vzorku. Ak sa dosiahne rovnaký výsledok, nahláste nepreukazný výsledok. Poradte sa s príslušným orgánom verejného zdravotníctva ohľadom ďalšieho usmernenia a/alebo koordinácie odberu vzorky na ďalšiu analýzu.

- **Spravidca interpretáciou výsledkov diagnostického testu rTEST COVID-19 qPCR Rapid**
V nasledujúcich tabuľkách sú uvedené očakávané výsledky pre diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR Rapid. 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.

Očakávaný profil kontrol zahrnutých v teste rTEST COVID-19 qPCR Rapid

Typ kontroly	Externá kontrola	SARS-CoV-2 E	SARS-CoV-2 RdRP	RNÁza P	Očakávané Ct hodnoty	Možné príčiny neočakávaného výsledku
Pozitívna	PC BMC5	+	+	+	Ct < 35,00	zlyhanie reagencií vrátane integrity primerov a sond alebo degradácia pozitívnej kontroly
Negatívna	NTC	–	–	–	Nedetektovateľné	Kontaminácia reagencií a/alebo prostredia

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.

• RNÁza P (kontrola odberu)

- » Všetky klinické vzorky by mali vykazovať amplifikačné krivky v reakcii RNÁzy P, ktoré prekročujú prahovú hranicu v rámci 35,00 cyklov (Ct < 35,00), čo naznačuje prítomnosť RNA z génov ľudskej RNÁzy P vo vzorke. Neschopnosť detegovať RNÁzu P v akýchkoľvek klinických vzorkách môže naznačovať:
 - Nesprávny odber klinického materiálu, ktorého výsledkom je neprítomnosť 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.

Interpretácia testu na SARS-CoV-2 markery a ľudskú RNÁzu P

SARS-CoV-2 E gén	SARS-CoV-2 RdRP gén	Ľudská RNÁza P	Interpretácia výsledkova*	Správa	Postup
+	+	+/-	SARS-CoV-2 detekovaný	SARS-CoV-2 pozitívny	Oznámte výsledky žiadateľovi.
+	-	+/-	Nepreukazný výsledok	Nepreukazný	Opakujte testovanie. Ak opakovaný výsledok zostane nepreukazný, požiadajte príslušný orgán verejného zdravotníctva o ďalšie pokyny.
-	+	+/-			
-	-	+	SARS-CoV-2 Nedetekovaný	Nedetekovaný	Oznámte výsledky žiadateľovi. Zvážte testovanie na iné respiračné vírusy ^b .
-	-	-	Neplatný výsledok	Neplatný	Opakujte testovanie. Ak opakovaný výsledok zostane neplatný, zvážte odber novej vzorky od pacienta.

* Laboratóriari by mali hlásiť svoje diagnostické výsledky v súlade so svojím osobitným systémom podávania správ.

^b Optimálne načasovanie odberu vzorky s maximálnymi hladinami vírusu počas infekcii 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 zvážiť 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 zvážiť opakované testovanie .

UPOZORNENIE!

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

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. Test bol uskutočnený pomocou kontrolného materiálu "SARS Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Stock" (ZeptoMetrix, <https://www.zeptometrix.com/products/nattrol-sars-related-coronavirus-2-sars-cov-2-stock>), ktorý v neriedenom stave obsahuje 1000 kópií templátu na 1 µl. Riedením „SARS-Related Coronavirus

2 (SARS-CoV-2) Stock“ v SARS-CoV-2 negatívnej vzorke získanej kloktaním boli pripravené riedenia s koncentraciami 40 kópií/µl, 10 kópií/µl, 4 kópie/µl, 2 kópie/µl, 1 kópia/µl a 0,5 kópie/µl vzorky, ktoré boli po inaktivácii použité v teste analytickej citlivosti. Test bol uskutočnený v 8 replikátoch pre každé pripravené riedenie. Test potvrdil vysokú citlivosť diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR Rapid. Spôhlivá detekcia templátu, pre stanovenie prítomnosti E génu a RdRP génu bola preukázaná do koncentrácie 1 kópia/µl vzorky, a následne bola potvrdená rozšíreným testom detekčného limitu, kde z 24 replikátov, bolo 24 pozitívnych pre E gén a 23 pre RdRP gén.

Detekčný limit testu pre SARS-CoV-2 E gén a RdRP gén

	E gén/RdRP gén/RNÁza P gén		
	Celkový počet replikátov	Počet reakcií s pozitívnym výsledkom	Úspešnosť detekcie (%)
40 kópií/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
10 kópií/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
4 kópií/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
2 kópie/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
1 kópia/µl vzorky*	8	8/8/8	100/100/100
0,5 kópie/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
1 kópia/µl vzorky [#]	24	24/23/24	100/96/100

* po zohľadnení absencie RNA extrakcie porovnateľná s rTEST COVID-19 qPCR Allplex

[#] Rozšírené LoD

9.2. Špecifická kitu

Hodnotenie špecificity (križovej 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 špecificity kitu. Na hodnotenie križovej reaktivity na respiračné vírusy bol použitý súbor respiračných vírusov (Vircell microbiologicals), ktorý obsahuje RNA vírusov Influenza A H1N1, Novel Influenza A H1N1, InfluenzaA 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 špecifickú diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR Rapid. 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 Rapid bola navrhnutá tak, aby neamplifikovala najčastejšie používané syntetické pozitívne kontroly vôbec alebo len s nízkou účinnosťou. Kit rTEST COVID-19 qPCR Rapid 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 Rapid. V každej z analyzovaných NTC bol zaznamenaný negatívny výsledok bez náznaku zvýšenia signálu alebo prítomnosti amplifikácie.

9.3. Hodnotenie klinickej výkonnosti

Hodnotenie klinickej výkonnosti kitu rTEST COVID-19 qPCR Rapid bolo uskutočnené multiplexným testom na SARS CoV-2 E gén a RdRP gén a ľudskú RNÁzu P. Hodnotenie bolo uskutočnené na vybranom súbore 105 pozitívnych a 94 negatívnych klinických vzoriek pacientov získaných kloktaním, ktoré boli potvrdené referenčnou metódou štandardne používanou na rutinné testovanie regionálnymi úradmi verejného zdravotníctva Slovenskej republiky. Pred inaktiváciou (v prípade rTEST COVID-19 qPCR Rapid kitu) resp. izoláciu RNA (v prípade referenčnej metódy) boli vzorky získané kloktaním 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 Rapid (viď tabuľka nižšie).

V porovnaní referenčnej metódy a diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR Rapid je diagnostická citlivosť 100 % a diagnostická špecifita 100 %. Výsledky detekcie génu pre RNázu P vykazali

vysokú homogenitu vo všetkých analyzovaných vzorkách a taktiež potvrdili vhodnosť tohto testu ako internej kontroly pre overenie kvality odberu klinickej vzorky.

Hodnotenie klinickej výkonnosti pre SARS-CoV-2 E gén, RdRP gén a ľudskú RNázu P

	Referenčná metóda			rTEST COVID-19 qPCR Rapid		
	E gén	RdRP gén	RNáza P gén	E gén	RdRP gén	RNáza P gén
Počet správne identifikovaných pozitívnych vzoriek	105	105	105	105	105	105
Počet falošne pozitívnych vzoriek	0	0	0	0	0	0
Počet správne identifikovaných negatívnych vzoriek	94	94	94	94	94	94
Počet falošne negatívnych vzoriek	0	0	0	0	0	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 autoklávuajte 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 in vitro
	Dátum výroby
	Diagnostické zdravotnícke pomôcky in vitro
	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