



**DB-1219**

**DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit**

**Uživatelská příručka**

Verze příručky: DB-1219-001-201124

Revize: 1.4 CZ

Poslední aktualizace: 18.1.2021



**REF** DB-1219-100rxns obsahuje reagentie pro 100 reakcí

**REF** DB-1219-1000rxns obsahuje reagentie pro 1000 reakcí



## Obsah

1 Úvod .....	3
1.1 Účel a použití soupravy .....	3
1.2 Charakteristiky testu .....	4
1.3 Bezpečnostní upozornění .....	9
2 Seznam materiálů .....	10
2.1 Požadované laboratorní vybavení .....	10
2.2 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy .....	10
2.3 Materiál, který je součástí soupravy .....	10
2.4 Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu .....	11
3 Návod k použití .....	13
3.1 Obecné postupy .....	13
3.2 Jak zamezit kontaminacím (falešně pozitivním výsledkům) .....	13
3.3 Než začnete .....	13
3.4 Skladování a příprava vzorků .....	14
3.5 Příprava RT-PCR master mixu .....	15
3.6 Přidání vzorku a externí kontroly do RT-PCR reakce .....	16
3.7 Protokol RT-PCR .....	18
Nastavení přístroje Roche LC480 II .....	18
Nastavení přístroje BioRad CFX96 .....	18
3.8 Analýza dat .....	19
Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (C <sub>t</sub> ) .....	19
Vyhodnocení kontrol .....	20
Interpretace výsledků měřených vzorků .....	20
Typické výsledky .....	22
4 Právní upozornění .....	24
5 Seznam kompatibilních souprav .....	24
6 Jednostránkový souhrnný protokol .....	25
6.1. Složky soupravy .....	25
6.2 Příprava RT-PCR .....	25
6.3. Protokol RT-PCR .....	25
7 Použité grafické symboly .....	26



# 1 Úvod

## 1.1 Účel a použití soupravy

*DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit* (Kat.č. DB-1219) slouží k jednokrokové RT-PCR detekci viru SARS-CoV-2 (Wuhan coronavirus 2019, COVID-19) bez nutnosti předchozí izolace RNA, tedy přímo ze vzorku. Vhodné vzorky jsou popsány níže. Souprava v jedné multiplexní RT-PCR reakci specificky detekuje dva virové geny, **EndoRNase** (kanál FAM) a **Spike** (kanál HEX) a externí syntetickou **RNA kontrolu** (kanál Cy5). Tato kontrola se přidává do RT-PCR mixu jako poslední (po přidání vzorku) a slouží zejména pro ověření účinnosti RT-PCR reakce v přítomnosti vzorku.

### Vhodné vzorky a kompatibilní odběrové sady

Souprava byla validována pro dva základní typy vzorků: nosohltanové stěry v transportním mediu a sliny. Sliny je nutné před RT-PCR analýzou tepelně inaktivovat a pro jejich odběr doporučujeme odběrové sady DB-1221 nebo DB-1225. Stěry v transportním mediu není nutné inaktivovat (avšak je to možné). Pro použití s touto soupravou byly validovány následující vzorky a média:

- **Sliny** poté, co jsou tepelně inaktivovány dle návodu:
  - Inaktivace zlepšuje pipetovatelnost vzorků a zvýší citlivost stanovení.
- **Nosohltanové stěry** v různých transportních médiích:
  - Vhodná jsou různá virová transportní média, fenolová červeň neinterferuje
    - Copan Universal transport medium for viruses (UTM)
    - IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM)
    - Biocomma® Transport and Preservation Medium (Classic)
    - Obdobná virová transportní media
    - Vhodné jsou i slabší pufrы, například fosfátový pufr PBS (testované složení 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4; vždy je nutné otestovat pro konkrétní složení; silné pufrы jsou nevhodné)
    - Nevhodná jsou inaktivační média, např. na bázi guanidinium isothiokyanátu
  - Vzorky stěrů mohou být tepelně inaktivovány dle návodu, ale nemusí:
    - Inaktivace ve viral preservative mediu (VPM) nemá vliv na citlivost stanovení.

Souprava obsahuje externí RNA kontrolu a primery se sondou pro její detekci. **Tuto externí RNA kontrolu je nutné přidat do každé RT-PCR reakce, a to až po přidání vzorku.** Tímto postupem se ověří účinnost RT-PCR reakce v každém vzorku (případná inhibice v důsledku použití nevhodného média nebo vzorku se projeví na pozdější amplifikaci této kontroly). **Pro ověření správné funkce soupravy je nutné do každé analýzy přidat jednu negativní a jednu pozitivní kontrolu (dodávané v této soupravě) a doporučujeme také jeden známý klinický pozitivní vzorek** stejného typu jako je analyzován v daném testu: například ve slinách či v používaném stěrovém transportním mediu.

Souprava byla klinicky validována pro použití v diagnostice pouze pro nosohltanové stěry ve VPM či obdobných transportních médiích nebo pro sliny odebrané do odběrových sad kat. č. DB-1221 nebo DB-1225 podle návodu k těmto odběrovým sadám. Při použití jiného typu vzorků a/nebo



odlišného způsobu sběru slin je nutné postup validovat s konkrétním zvoleným médiem či typem vzorku přeměření setu vzorků se známou koncentrací viru.

## Kompatibilní automatizace

Tento kit je možné používat manuálně, avšak lze i automatizovat na automatických laboratorních pipetovacích strojích. Výrobce je optimalizováno pro pipetovací stanici Agilent Bravo, pro kterou jsou dodávány a podporovány soupravy obsahující předpřipravený protokol a potřebný plastik (zejména špičky). Souprava DB-1224 *Bravo Installation Package for DBdirect™* obsahuje potřebné protokoly pro přípravu RT-PCR reakcí ze slin i ze stěrů. Souprava DB-1222 *DBdirect™ Bravo Extension Kit for Swab* obsahuje potřebný plastik pro přípravu RT-PCR reakcí ze stěrů. Soupravy DB-1221 *DBdirect™ Saliva collection tubes 1.1IM* a DB-1225 *DBdirect™ Saliva collection tubes 1.4IM* obsahují odběrové sady pro sliny vhodné pro automatizaci. Soupravy DB-1223 *DBdirect™ Bravo Extension Kit for Saliva 1.1IM* a DB-1226 *DBdirect™ Bravo Extension Kit for Saliva 1.4IM* pak obsahují plastik pro automatizaci přípravy RT-PCR reakcí ze slin s použitím těchto odběrových sad.

## 1.2 Charakteristiky testu

### Design testu

Primery a sondy použité v této soupravě byly vyvinuty společností DIANA Biotechnologies a byly optimalizovány pro multiplexní detekci. Primery byly navrženy tak, aby byly specifické pro COVID-19, jejich sekvence není shodná v SARS, MERS ani v žádném jiném lidském koronaviru. Primery nevykazují nespecifickou amplifikaci lidské mRNA nebo lidského genomu v *in silico* PCR analýze.

Primery cílí sekvence v genomu COVID-19, které nebyly mutovány v žádné z evropských sekvencí v databázi NCBI (238 sekvencí k 17. květnu 2020). Cílové sekvence jsou pravidelně kontrolovány výrobcem pro výskyt mutací v *in silico* analýze dat dostupných ve veřejných databázích (například NCBI či COG konsorcium). Ke konci roku 2020 se v nich nevyskytovaly žádné významné mutace s výjimkou mutace Spike A570D, která se vyskytuje téměř exkluzivně v tzv. Britské variantě B.1.1.7 – Spike je i tak detekován, avšak díky posunu v Ct v HEX kanále je možné touto soupravou tuto variantu odlišit od původní varianty. Detekce ve FAM kanálu je nezměněna a citlivost tak zůstává stejná. Více podrobností v sekci 3.8 Analýza dat.

### Analytická citlivost

Citlivost testu byla určena na virové RNA izolované z virové kultury kvantifikované na mezinárodní standard EVA (<https://www.european-virus-archive.com/>) a na virové kultuře otitrované na tento standard. Za limit detekce byla považována taková koncentrace viru, při které byl virus detekován reprodukovatelně ve většině replikátů. Citlivost tak byla stanovena na:

- 500 kopií standardu virové RNA na mililitr pufu,
- 1250 kopií viru na mililitr Copan UTM,
- 2500 kopií viru na mililitr lidských slin,

za předpokladu dodržení postupu zpracování vzorků uvedeném v kapitolách 3.4 až 3.6.

### Klinická validace – sensitivita a specificita



Klinická detekce COVID-19 ze stěrů z nosohltanu byla validována ve dvou klinických studiích na dvou nezávisle na sobě nasbíraných setech vzorků ze dvou různých odběrových míst. Výsledky této soupravy na 488 a 537 vzorcích stěrů byly porovnány se standardní detekcí COVID-19 jinou CE IVD soupravou zahrnující izolaci RNA a RT-PCR.

Klinická detekce COVID-19 ze slin byla validována ve třetí studii na 494 vzorcích slin odebraných párově se vzorky nosohltanových stěrů. Ve slinách byl COVID-19 detekován touto soupravou, zatímco ve stěrech byl COVID-19 detekován referenčním způsobem izolací RNA a RT-PCR jinými CE IVD soupravami a výsledky párových vzorků byly porovnány.

V první klinické studii bylo analyzováno **488 vzorků nosohltanových stěrů** uchovávaných v transportním médiu, a alespoň v jedné z metod bylo **pozitivních 179 vzorků**, zatímco 309 vzorků bylo vždy negativních. 171 vzorků bylo pozitivních v obou metodách, touto soupravou byly odhaleny při otestování 5  $\mu$ L vzorků navíc 3 pozitivní vzorky oproti referenci (celkem 174), zatímco referenční metodou s izolací RNA navíc 5 pozitivních vzorků (celkem 176). Při předpokladu **100% selektivity** RT-PCR byla u této soupravy pro tento set vzorků nosohltanových stěrů určena **97.2% sensitivita**, zatímco pro referenční metodu s izolací RNA 98.3% sensitivita a 100% selektivita. V přímém porovnání metod odhalila tato souprava o dva vzorky méně než referenční metoda, vykazala tak **98.9% záchyt pozitivních vzorků oproti referenční izolaci RNA s RT-PCR**. Graf na **obr. 1A** ukazuje, že rozdíl byl pouze ve slabých vzorcích. Ze 167 vzorků s průměrným Ct do 37 cyklů v referenční metodě detekovala tato souprava 165 vzorků (tj. s 98.8% sensitivitou), zatímco referenční metoda detekovala všech 164 vzorků, které měly Ct 37 nebo menší v analýze touto soupravou (tj. se 100% sensitivitou).

V druhé klinické studii bylo analyzováno **537 vzorků nosohltanových stěrů** uchovávaných ve VPM médiu a alespoň v jedné z metod bylo **pozitivních 157 vzorků**, zatímco 380 vzorků bylo vždy negativních. Vzorky byly testovány postupně referenční metodou izolace RNA s RT-PCR, touto soupravou při analýze 2  $\mu$ L vzorku a opakovaně touto soupravou, avšak při analýze 4  $\mu$ L vzorku. Referenční metoda odhalila 7 vzorků pozitivních pouze v této metodě (celkem 142), avšak neodhalila 15 vzorků pozitivních v jiných metodách. Tato souprava s 2  $\mu$ L vzorku odhalila 1 vzorek pozitivní pouze v tomto měření (celkem 144), zatímco neodhalila 13 vzorků pozitivních v jiných měřeních. Nakonec tato souprava se 4  $\mu$ L vzorku odhalila 4 vzorky pozitivní pouze v tomto měření (celkem 148), avšak neodhalila 9 vzorků pozitivních v jiných měřeních. Při předpokladu **100% selektivity** RT-PCR byla pro tuto soupravu s **2  $\mu$ L vzorku určena sensitivita 91.7 %**, zatímco pro **4  $\mu$ L vzorku sensitivita 94.3 %**. **Pro referenční metodu s izolací RNA byla určena sensitivita 90.4 %**. V přímém porovnání této soupravy se 4  $\mu$ L vzorku a referenční metody dosáhla tato souprava **104.2% záchyt pozitivních vzorků oproti referenční izolaci RNA s RT-PCR**. Graf na **obr. 1B** ukazuje, že rozdíly mezi metodami byly téměř výhradně ve slabých vzorcích s Ct nad 35, které jsou blízko limitu detekce a lze tak čekat rozdíly i při opakování stejnou metodou. Ze 123 vzorků s průměrným Ct do 37 cyklů v referenční metodě detekovala tato souprava (při analýze jak 4  $\mu$ L vzorku, tak jen 2  $\mu$ L) všech 123 vzorků (tj. s 100.0 % sensitivitou), zatímco referenční metoda detekovala 126 ze 130 vzorků, které měly Ct 37 nebo menší v analýze touto soupravou (tj. s 96.9% sensitivitou) respektive 127 ze 133, (tj. s 95.5% sensitivitou).



Ve třetí klinické studii bylo **494 vzorků stěrů testováno referenční metodou** izolace RNA s RT-PCR, zatímco **494 párových vzorků slin testováno touto soupravou**, ve dvou opakováních, vždy s použitím 2 µL slin. Celkem bylo odhaleno 123 pozitivních vzorků, zatímco 371 vzorků bylo vždy negativních. Referenční metodou ve stěrech bylo odhaleno 105 pozitivních vzorků, z toho bylo ve slinách 10 negativních, a naopak zde negativních 18 vzorků bylo ve slinách pozitivních. Při prvním měření ve slinách bylo odhaleno 108 pozitivních vzorků, žádný vzorek nebyl pozitivní pouze v tomto měření a 15 vzorků zde negativních bylo pozitivní v jiném měření. Při druhém měření bylo odhaleno 112 pozitivních vzorků, z toho byly dva pozitivní pouze v tomto měření. Naproti tomu 11 negativních vzorků bylo pozitivní v alespoň jednom dalším měření. Při předpokladu 100% selektivity RT-PCR tak dosáhla tato souprava ve slinách při porovnání s referenční metodou z párových vzorků stěrů **sensitivitu 87.8 % v prvním měření a 91.1 % sensitivitu v druhém měření. Referenční metoda ze stěrů dosáhla 85.4 % sensitivity. Při přímém porovnání s referenční metodou izolace RNA s RT-PCR ze stěrů dosáhla detekce ve slinách touto soupravou v prvním měření 102.9% záchyt a ve druhém měření dokonce 106.7% záchyt pozitivních vzorků.** Větší rozdíly mezi metodami jsou pravděpodobně dány variabilitou odběrů a množství viru v nosohltanu a ve slinách, jak je ale ukázáno na **obr. 2**, tak rozdíly byly téměř výhradně ve slabých vzorcích (s Ct nad 30, v drtivé většině nad 35), avšak ve slinách byly v obou měřeních odhaleny i dva vzorky s Ct mezi 25 a 30, které nebyly ve stěrech odhaleny vůbec, takže odběr slin se jeví reprodukovatelnější než odběr ze stěrů. Z 88 vzorků s průměrným Ct do 37 cyklů ve stěrech v referenční metodě detekovala tato souprava ve slinách v prvním měření 85 vzorků, zatímco v druhém 86 vzorků (tj. s 96.6% a 97.7% sensitivitou), zatímco referenční metoda detekovala ve stěrech 88 z 99 (1. měření) resp. z 101 vzorků (2. měření), které měly Ct 37 nebo menší v analýze touto soupravou ve slinách (tj. s 88.9% a 87.1% sensitivitou). Detekce ze slin se tak ukázala jako výrazně citlivější než detekce ze stěrů.



	Specifická	Sensitivita		% Záchytu pozitivních vzorků oproti referenční metodě izolace RNA <sup>1</sup>
		Všechny pozitivita	Nehraniční pozitivita <sup>1</sup>	
Studie č.1	100 %	97.2 %	98.8 %	98.9 %
Studie č.2	100 %	94.3 %	100 %	104.2 %
<b>Průměr</b>	<b>100 %</b>	<b>95.8 %</b>	<b>99.4 %</b>	<b>101.6 %</b>

**Tabulka 1: Shrnutí výsledků klinické validace detekce COVID-19 ze stěrů**

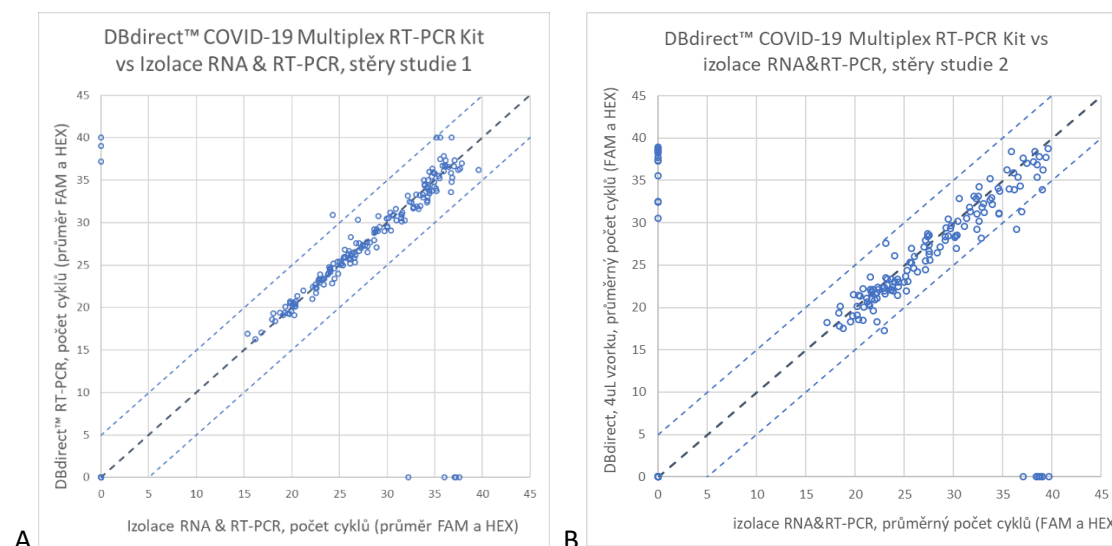
[1] Vzhledem k tomu, že studie probíhala na reálných vzorcích z odběrových míst, které obsahovaly i velice slabé vzorky z počátků i pozdních fází infekce, může být senzitivita testu (bez ohledu na metodu) zkreslena variabilitou při detekci velice slabých vzorků. Pro úplnost proto uvádíme i citlivost testu po očištění od „hraničních pozitivit“ (tj. vzorků které měly v referenční metodě průměrné Ct 37 nebo vyšší) a procento záchytu pozitivit oproti referenční metodě (% záchytu větší než 100 % indikuje větší citlivost ve srovnání s referenční metodou).

	Specifická	Sensitivita		% Záchytu pozitivních vzorků oproti referenční metodě odběru ze stěrů <sup>1</sup>
		Všechny pozitivita	Nehraniční pozitivita <sup>1</sup>	
Měření č.1	100 %	87.6 %	96.6 %	102.9 %
Měření č.2	100 %	91.1 %	97.7 %	106.7 %
<b>Průměr</b>	<b>100 %</b>	<b>89.4 %</b>	<b>97.2 %</b>	<b>104.8 %</b>

**Tabulka 2: Shrnutí výsledků klinické validace detekce COVID-19 ze slin**

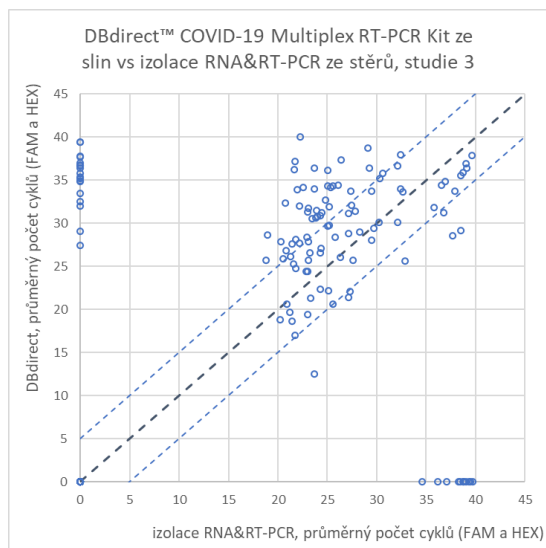
[1] Vzhledem k tomu, že studie probíhala na reálných vzorcích z odběrových míst, které obsahovaly i velice slabé vzorky z počátků i pozdních fází infekce, může být senzitivita testu (bez ohledu na metodu) zkreslena variabilitou při detekci velice slabých vzorků. Pro úplnost proto uvádíme i citlivost testu po očištění od „hraničních pozitivit“ (tj. vzorků které měly v referenční metodě průměrné Ct 37 nebo vyšší) a procento záchytu pozitivit oproti referenční metodě (% záchytu větší než 100 % indikuje větší citlivost ve srovnání s referenční metodou).





**Obr 1: Výsledky studií; porovnání této soupravy a referenční metody na stěrech.**

V každém grafu je znázorněna korelace průměrných Ct z FAM a HEX kanálů mezi touto soupravou a referenční metodou zahrnující izolaci RNA. Jako pozitivní byl každý vzorek vyhodnocen, pokud byl pozitivní alespoň v jednom kanálu. Body přímo na osách ukazují vzorky, které byly pozitivní pouze v dané metodě či vzorku. V panelu (A) je porovnání ze studie 1 mezi touto soupravou při analýze 5 µL vzorku (osa x) a referenční metodou zahrnující izolaci RNA (osa y), obojí ze stejných vzorků stěrů. V panelu (B) je porovnání ze studie 2 mezi touto soupravou při analýze 4 µL vzorku (osa x) a referenční metody zahrnující izolaci RNA (osa y), obojí ze stejných vzorků stěrů.



**Obr 2: Výsledky porovnání této soupravy na slinách a referenční metody na stěrech.**

V grafu je porovnání ze studie 3 mezi detekcí touto soupravou ze 2 µL slin (osa x) a referenční metodou zahrnující izolaci RNA z párových vzorků stěrů (osa y). Jako pozitivní byl každý vzorek vyhodnocen, pokud byl pozitivní alespoň v jednom kanálu. Body přímo na osách ukazují vzorky, které byly pozitivní pouze v dané metodě či vzorku.





## Přesnost

Ve třech studiích výše byla sledována korelace Ct z FAM a HEX kanálů, kdy hodnoty velmi dobře korelovaly, bez jediné odlehle hodnoty. Pro přístroje Roche LightCycler 480 II je typicky rozdíl mezi Ct pro FAM a HEX kanál do jednoho cyklu, pro BioRad CFX96 okolo jednoho cyklu. Na konci roku 2020 se objevující tzv. britský kmen obsahuje mutaci v amplikonu pro HEX a lze jej tak odlišit pomocí rozdílu Ct mezi FAM a HEX o 4 až 6 cyklů.

## Reprodukovatelnost

Intra a interassay variabilita byla změřena pro koncentrace virové RNA 100 000, 1 000 a 100 kopií. Naměřené hodnoty intraassay variability (průměrných standardních odchylek Ct replikátů na jedné destičce) pro oba kanály byly pro tyto koncentrace postupně vždy  $\leq 0.12$ ,  $\leq 0.25$  a  $\leq 0.65$ . Interassay variabilita (průměrná standardní odchylka Ct replikátů na různých destičkách) byla pro oba kanály pro tyto koncentrace postupně vždy  $\leq 0.12$ ,  $\leq 0.21$  a  $\leq 1.17$ .

## Vhodné přístroje

Souprava byla ověřena na RT-PCR cyklerech Roche LightCycler 480 II a BioRad CFX96. Lze ji použít také s jinými přístroji, které jsou schopné trojitě detekce v kanálech FAM, HEX a Cy5, je však na uživateli, aby provedl správné nastavení přístroje a ověřil fungování soupravy s využitím vhodných kontrol. Návod na nastavení RT-PCR protokolu a detekce v kanálech FAM, HEX a Cy5 naleznete v pokynech výrobce příslušného cykleru.

## 1.3 Bezpečnostní upozornění

Tato souprava je určena pouze pro profesionální použití. Dodržujte obecné zásady chemické bezpečnosti. Používejte ochranné pomůcky (rukavice, brýle), zamezte přímému kontaktu s chemikáliemi a vyvarujte se jídlu nebo pití v laboratořích.



Součástí soupravy jsou složky **obsahující 0.02% azid sodný, který je toxický** a při styku s kyselinami vytváří toxický plyn. Příslušné bezpečnostní listy (MSDS) budou poskytnuty na vyžádání.



Při práci s biologickými vzorky věnujte pozornost bezpečnostním pravidlům pro práci s infekčním biologickým materiálem, používejte vhodné ochranné vybavení (např. štít, respirátor) a pracujte se vzorky pouze ve vyhrazených biohazard boxech nebo ve vyhrazených pracovních prostorech. S infekčními vzorky pracujte pouze v laboratořích kategorie BSL2+ nebo BSL3. Potenciálně infekční odpad zlikvidujte v souladu s platnými právními předpisy.



Průběžně kontrolujte, zda v pracovním prostoru nejsou rozlité roztoky, chemikálie nebo biologické vzorky. V případě rozlití pracovní plochu okamžitě dekontaminujte. Pokud dojde ke kontaktu reagentů s pokožkou nebo k zasažení očí, okamžitě postižené místo opláchněte pod tekoucí vodou.



## 2 Seznam materiálu

### 2.1 Požadované laboratorní vybavení

- Real-time PCR cykler se softwarem schopným multiplexní detekce v kanálech FAM, HEX a Cy5 – **postupujte podle návodu poskytnutého výrobcem daného přístroje**
- Kalibrované jednorázové / multikanálové pipety
- Rukavice a jiné ochranné prostředky
- Doporučené: stolní vortex a centrifuga

### 2.2 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy

- Jednorázové pipetovací špičky (doporučujeme špičky s filtrem)
- Jednorázové zkumavky pro míchání jednotlivých složek
- PCR destička a adhezivní optická fólie pro zalepení PCR destičky
- Protokoly a plastik pro automatizaci (např. DB-1224, DB-1226 a další)

### 2.3 Materiál, který je součástí soupravy

Složky soupravy	Objem (μL)		Podmínky skladování	Číslo a barva víčka
	100rxns <sup>[6]</sup>	1000rxns <sup>[6]</sup>		
Enhancer mix (4x)	500	5000	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	1 <sup>[4]</sup>
Primer mix (4x)	500	5000	-20 °C <sup>[1,2,3]</sup>	2 <sup>[4]</sup>
Enzyme mix (4x)	500	5000	-80 °C <sup>[2,3]</sup>	3 <sup>[4]</sup>
Positive control (COVID-19 RNA)	150	2x 750	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	4
External control (synthetic RNA)	500	5000	-20 °C <sup>[2,3]</sup>	5 <sup>[4]</sup>
Negative control (PCR grade water)	500	5000	-20 °C <sup>[2]</sup>	W <sup>[5]</sup>

**Tabulka 3: Složky soupravy DB-1219**

[1] – **Uchovávejte na temném místě** (obsahuje látky, které jsou citlivé na světlo).

[2] – **Skladujte celou soupravu při teplotě -80 °C**; jednotlivé složky s výjimkou Enzyme mix (4x) lze skladovat i při -20 °C. Nepoužívejte soupravu, pokud složky byly v okamžiku dodání rozmrazené.

[3] – Minimalizujte počet zmrazení/rozmrazení, **roztoky rozalíkvotujte po prvním rozmrazení**.

[4] – Barevná víčka jsou použita pouze v soupravách pro 100 reakcí. Průhledná víčka jsou použita v soupravách pro 1000 reakcí (vyjma pozitivní kontroly, která má červené víčko vždy).

[5] – Potisk víčka v soupravách pro 1000 reakcí je "PCR water".

[6] – Do zkumavek je plněn objem o 5 až 10 % vyšší.



### Enhancer Mix (4x)

Obsahuje různé soli zvyšující účinnost RT-PCR reakce. Dodáván jako 4x koncentrát.

### Primer Mix (4x)

Obsahuje páry primerů a fluorescenčně značené sondy pro detekci genu **EndoRNase v kanálu FAM**, genu **Spike v kanálu HEX** a syntetické **externí RNA kontroly v kanálu Cy5**. Dodáván jako 4x koncentrát.

### Enzyme Mix (4x)

Obsahuje termostabilní reverzní transkriptázu, hot-start Taq DNA polymerázu, inhibitory RNáz a další látky k ochraně RNA před degradací, dNTPs, pufr, soli a speciální přísady pro extrakci virové RNA z viru. Dodáván jako 4x koncentrát.

### Positive control

Obsahuje templátovou virovou RNA v koncentraci přibližně 2000 kopií na mikrolitr. Otevření této lahvičky může způsobit kontaminaci pracovního prostoru, proto tuto **vialku před otevřením vždy stočte!**

### External control

Obsahuje syntetickou RNA, která se přidává do každé jamky RT-PCR poté, co se do ní přidal vzorek.

### Negative control

Obsahuje PCR grade water.

## 2.4. Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu

Souprava DB-1219 DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit představuje inovativní formulaci RT-PCR mixu, který dokáže extrahovat virovou RNA bez nutnosti předchozí izolace RNA. Složení navíc umožňuje provést RT-PCR analýzu v přítomnosti vzorku, aniž by došlo k inhibici nebo degradaci RNA. Z tohoto důvodu některé složky obsahují reagentie běžně v RT-PCR nepoužívané. Proto je tato souprava podrobena důkladným testům stability, a proto je prozatím nutné některé složky skladovat při nízké teplotě -80 °C tak, aby se udržela funkčnost všech složek a detekce přímo v biologických maticích byla robustní. Ze stejného důvodu je limitován počet rozmrazení některých složek. Doba použitelnosti celé soupravy je uvedena na krabici.

**Složky 1 (Enhancer Mix) a 2 (Primer Mix) dlouhodobě skladujte při teplotě -20 °C nebo -80 °C.** Vyhnete se opakovanému zamrazení / rozmrazení, nikdy nepřekračujte čtyři cykly zamrazení / rozmrazení. Pokud budete tyto složky používat vícekrát, rozalíkvotujte je po prvním rozmrazení.

**Složku 3 (Enzyme Mix) je nutné dlouhodobě skladovat při -80 °C.** Při prvním rozmrazení připravte jednorázové alikvoty. Avšak při rozmrazování při 25 °C a zamrazování v -80 °C je možné tuto složku až čtyřikrát rozmrazit/zmrazit.



**Složky 1, 2 a 3** jsou stabilní přinejmenším 4 hodiny při 25 °C, pokud nejsou smíchané dohromady. Avšak doporučujeme složky použít co nejdříve po rozmrazení. Uchovávejte složky soupravy mimo přímé sluneční světlo, působení běžného denního světla po dobu přinejmenším 8 hodin nemá vliv na jejich funkci. Primer mix by ale měl být dlouhodobě uchováván na tmavém místě.

**RT-PCR Master Mix** (směs složek 1, 2 a 3; viz kapitola 3.5) je stabilní po dobu až 4 hodin při 25 °C, avšak doporučujeme RT-PCR master mix použít do 30 minut od smíchání jednotlivých komponent. Master mix uchovávejte mimo přímé sluneční světlo, působení běžného denního světla po dobu přinejmenším 8 hodin nemá vliv na jeho funkci.

**RT-PCR Master Mix** může být jednou zamrazen. Lze si tedy předem připravit master mix pro několik PCR destiček nebo si rovnou připravit hotové PCR destičky, nicméně vše musí být rozaliquotováno a zamrazeno co nejdříve po přípravě master mixu. Je nutné zamrazení v -80°C a následně je možné skladovat až 1 měsíc v -80°C.

**Složky 4 (pozitivní kontrola) a 5 (externí kontrola)** obsahují RNA, rozmrazujte je na dobu nezbytně nutnou a uchovávejte je na ledu, avšak mohou být skladovány kumulativně přinejmenším 24 hodin na pokojové teplotě. Maximální počet cyklů zamrazení / rozmrazení je devět pro externí kontrolu a čtyři pro pozitivní kontrolu. Optimální teplota pro dlouhodobé skladování je -80 °C, ale mohou být skladovány i při -20 °C.

**Negativní kontrolu (PCR vodu)** lze dlouhodobě skladovat při -20 °C nebo nižší teplotě a opakovaně mrazit a rozmrazovat. Pro rychlejší rozmrazení doporučujeme přípravu menších alikvotů.



## 3 Návod k použití

### 3.1 Obecné postupy

- Nepoužívejte součásti soupravy, které jsou při přijetí poškozené nebo rozmražené. Uschovejte je pro případnou reklamaci a kontaktujte výrobce.
- Nesprávné zacházení se složkami soupravy a nedodržení postupů uvedených v této uživatelské příručce může nepříznivě ovlivnit výsledky.
- Používejte stejnou verzi uživatelské příručky (viz záhlaví), která je uvedena na obalu.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti, která je uvedena na obalu.
- Nemíchejte složky z různých šarží souprav (číslo šarže je uvedeno na obalu).

### 3.2 Jak zamezit kontaminacím (falešně pozitivním výsledkům)

Je třeba dodržovat správnou laboratorní praxi, aby se zabránilo křížové kontaminaci vzorků, a používat jednorázové pipetovací špičky s filtry, které se mění pro každý krok protokolu.

Manipulace s klinickými vzorky, pozitivními kontrolami (templátová RNA) nebo amplifikovanými PCR produkty (templátová DNA) by měla být prostorově oddělena od manipulace se zásobními složkami 1, 2 a 3, aby se minimalizovalo riziko náhodných kontaminací templátovou RNA/DNA. Nejlepší praxí je připravit RT-PCR master mix ze složek 1, 2 a 3 a napipetovat tuto směs do PCR destičky v prostoru, ve kterém se nepracuje s templátovou RNA/DNA (např. PCR box). Tento prostor by měl mít vyhrazené vybavení (např. pipety, laboratorní plastik), které se nepoužívá pro jiné účely a které nikdy nepřichází do styku s templátovou RNA/DNA. PCR destičky s master mixem by následně měly být přeneseny na jiné místo (např. do jiného PCR boxu), kde jsou přidány vzorky nebo pozitivní kontroly.

Další obecné pokyny, jak zabránit náhodné kontaminaci:

- Nikdy neotvírejte zkumavku/destičku s amplifikovanými PCR produkty
- Nikdy neotvírejte nebo jinak nemanipulujte se vzorky, pozitivními kontrolami nebo s amplifikovanými PCR produkty v prostorech, ve kterých je připravován RT-PCR mix.
- Před manipulací s templátovou RNA/DNA uzavřete ostatní lahvičky s reagensiemi a před otevřením vždy vialku s pozitivní kontrolou řádně stočte.
- Nádoby s reagensiemi nechávejte otevřené pouze po dobu nezbytně nutnou.
- K ředění vzorku použijte ultračistou nebo PCR-grade vodu (nebo z ní připravené pufry).

Pro kontrolu falešně pozitivních a falešně negativních výsledků je nutné přidat pozitivní a negativní kontroly na každou RT-PCR destičku. Jako negativní kontrolu použijte buď dodanou negativní kontrolu (PCR grade water) nebo čisté odběrové medium. Jako pozitivní kontrolu použijte COVID-19 templátovou RNA, která je součástí soupravy (vialka č. 4).

### 3.3 Než začnete

Složky soupravy jsou dodány a skladovány zmrazené, před každým použitím proto:



- Rozmrazte složky na pokojové teplotě (nerozmrazujte na ledu či v lednici).
- Před otevřením každou vialku stočte, abyste shromáždili veškerou tekutinu na dně.
- Před použitím reagentie promíchejte ve vialkách pomocí vortexu nebo pipetováním. Pipeta by měla být pro míchání nastavena minimálně na ½ objemu míchaného roztoku, pro správné promíchání je zapotřebí několikeré propipetování. Dostatečné promíchání je obzvláště důležité před rozdělením do alikvotů. Pokud vialku vortexujete, vždy ji před otevřením krátce stočte.

### 3.4 Skladování a příprava vzorků

#### Vzorky slin

Pro testování ze slin používejte odběrové sady DB-1221 nebo DB-1225. Vzorky slin je v těchto sadách možné skladovat přinejmenším 72 hodin při teplotách 4 °C až 25 °C. Vzorky je možné také alespoň jednou zamrazit (v -80 °C). Pokud využíváte jiné odběrové sady, jejich výběr konzultujte se zástupcem výrobce, nikdy nepoužívejte sady, které obsahují inaktivační roztoky pro stabilizaci RNA nebo DNA.

V případě slin je nutné vzorek nejprve tepelně inaktivovat, tím se jednak sníží infekčnost vzorku, jednak se zvýší citlivost detekce. Pokud máte sliny v odběrových zkumavkách ze souprav DB-1221 nebo DB-1225, tak zašroubované zkumavky naskládejte do 96-jamkového stojánu (racku, DB-1227 nebo DB-1228) tak, aby zaplnily každou druhou řádku (do každého racku se tak vejde 48 vzorků). Následně umístěte do inkubátoru s nuceným oběhem vzduchu předeřhátého na 90 °C na 30 minut (nikdy nepřekračujte 60 minut). Pro inkubátor s nuceným oběhem o vnitřním objemu 60L postupujte následovně: do inkubátoru nejprve vložte dvě litrové (případně čtyři půllitrové) lahve naplněné vodou a ponechte je vytemperovat po dobu 4 hod a až poté inkubátor použijte pro inaktivaci vzorků (takto se udrží stejné podmínky pro všechny vzorky bez ohledu na jejich počet). Do inkubátoru vkládejte najednou maximálně 8 napůl naplněných racků, tj. 384 vzorků. Pokud používáte jiné odběrové sady nebo inkubátor o jiném vnitřním objemu, pak je sliny nutné inaktivovat tak, aby vzorek byl po dobu alespoň 10 minut zahřátý na 80 °C. Toho můžete dosáhnout například přenesením 50 µL vzorku do PCR destičky či jiných mikrozkuvek a inkubaci alespoň 10 minut při 80 °C v termálním cykleru (lze použít i jiné zkumavky vložené do termobloku, nepřekračujte 30 minut při 80 °C). Po tepelné inaktivaci vzorky zchladte na pokojovou teplotu, buď ponechte dalších 30 minut při pokojové teplotě, nebo 10 minut ve 4 °C – bez zchlazení je bude velmi obtížné pipetovat. Po inaktivaci není nutné sliny ihned otestovat, virová RNA je v nich stabilní dalších až 72 hodin při 25 °C.

Před pipetováním sliny stočte na 100 g po dobu 1 minuty, to by mělo postačit na stočení slin z víčka a závitu víčka a usnadnit pipetování stočením největšího precipitátu či jiné debris ve slinách. Pokud to nestačí, můžete stočit až na 2 minuty až na 200 g. Delší stáčení či stáčení s vyšší rychlostí může vést ke ztrátě citlivosti detekce.

Pokud sliny přenášíte do RT-PCR master mixu pomocí pipetovacího robota bez detekce objemu ve špičkách, pak je nutné před samotným pipetováním vyřadit vzorky s příliš nízkou hladinou (nižší než nastavenou výškou pipetování) a ty napipetovat ručně. Výšku pipetování nastavte tak, aby



špička zůstala nad případnou peletou ve většině vzorků, ale zároveň co nejnižší. Přesné instrukce naleznete v manuálu pro DB-1223 nebo DB-1226 DBdirect™ Bravo Extension Kit for Saliva.

## Vzorky nosohltanových stěrů

Pro stěry používejte odběrové sady obsahující běžná transportní media (např. Copan Universal transport medium for viruses (UTM) či IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM)), inaktivační media nejsou vhodná. Stěry v transportním médiu doporučujeme skladovat dle instrukcí výrobce těchto medií. V IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) je možné stěry skladovat přinejmenším 48 hodin při 4 °C a zároveň je možné je alespoň jednou zamrazit (v -80 °C).

Tepelnou inaktivací stěrů se citlivost nijak nezvyšuje, takže není nutná – avšak je v principu možná pro zvýšení bezpečnosti. Například vzorky v IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) lze inaktivovat až 30 minut při 65 °C bez ztráty citlivosti. Validace přesného postup inaktivace pro kterékoliv medium je zodpovědností uživatele.

Pokud jste vzorky zahřívali, tak je před pipetováním nechte vytemperovat na pokojovou teplotu, jinak je může být obtížné pipetovat (nutné v případě, že pro přidání vzorků používáte automatický pipetor). V případě potřeby před pipetováním stěry stočte po dobu 1 až 2 minut na 100 až 200 g, ale není to nutné. Delší stáčení či stáčení s vyšší rychlostí může vést ke ztrátě citlivosti detekce.

## 3.5 Příprava RT-PCR master mixu

**Příprava RT-PCR master mixu pro jednu reakci je popsána níže.** Pokud připravujete RT-PCR master mix pro více reakcí, vynásobte objemy počtem reakcí (a připočtete pipetovací rezervu) – viz také Tabulka 4.

1. Rozmrazte a promíchejte všechny složky (viz kapitola 3.3).
2. Do čisté RNase/DNase free vialky napipetujte **5 µL Enhancer mixu (4x), v soupravě vialka č. 1 (zelené ● nebo průhledné víčko).**
3. Do stejné vialky přidejte **5 µL Primer mixu (4x), v soupravě vialka č. 2 (modré ● nebo průhledné víčko)** a promíchejte opakovaným pipetováním.
4. Do stejné vialky přidejte **5 µL Enzyme mixu (4x), v soupravě vialka č. 3 (černé ● nebo průhledné víčko)**, a promíchejte opakovaným pipetováním, dokud není směs homogenní (můžete také použít vortex a krátce stočit).
5. Přeneste **15 µL směsi (RT-PCR master mix)** do 96-jamkové destičky nebo do mikrozkušavek (dle typu použitého PCR cyklu). Pokud nemůžete hned pokračovat s přidáním vzorků a následným RT-PCR, tak destičky/mikrozkušavky přikryjte víčkem (podrobnosti ke stabilitě jednotlivých složek soupravy a RT-PCR mixu viz kapitola 2.4).

Složky soupravy	Č. a barva víčka	µL na 1 reakci	µL na 100 reakcí
Enhancer mix (4x)	1	5	500
Primer mix (4x)	2	5	500
Enzyme mix (4x)	3	5	500
Celkový objem RT-PCR master mix		15	1500



#### Tabulka 4: Příprava RT-PCR master mixu

Číslování vialek odpovídá pořadí přidávání jednotlivých složek, je důležité toto pořadí zachovat.

### Alikvotování roztoků pro přípravu RT-PCR master mixu

Počty alikvotů jednotlivých složek soupravy DB-1219-1000rxns a jejich objemy jsou shrnuty v tabulce 3. Pro přípravu jednorázových alikvotů pro analýzu 96 vzorků (např. s využitím automatické pipetovací stanice Agilent Bravo a souprav DB-1222, DB-1223 nebo DB-1226) postupujte následovně:

Od každého z roztoků Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x) připravte **10 alikvotů po 510 µL a zamrazte co nejdříve v -80 °C**. Pro přípravu RT-PCR master mixu pro analýzu 96 vzorků poté smíchejte vždy po jednom alikvotu od každé komponenty a vzniklý RT-PCR mix použijte celý. Podrobnosti ke stabilitě a skladování jsou uvedeny v kapitole 2.4.

Alternativně můžete připravit hotový RT-PCR mix smícháním těchto tří složek a po promíchání připravte **10 alikvotů po 1530 µL a zamraďte co nejdříve v -80 °C a do měsíce spotřebujte**. Tento mix už znovu nepřemrazujte, spotřebujte vždy celý alikvot.

Pro automatizovanou přípravu destičky s RT-PCR mixem a přidání vzorků je potřeba mrtvý objem. Celkový objem reakce i objem vzorků, tak jak jsou popsány v kapitolách 3.5 a 3.6, je proto možné o 10 % zmenšit bez ovlivnění citlivosti detekce.

## 3.6 Přidání vzorku a externí kontroly do RT-PCR reakce

### Vzorky slin

**Přidejte 2 µL vzorku tepelně inaktivovaných a stočených slin do jamek/mikrozkumavek**, které obsahují 15 µL RT-PCR master mixu a vypláchněte špičku opakovaným nasátím a vypuštěním kapaliny. Pokud se ve slinách při inaktivaci vytvořil precipitát, tak se snažte nabrat kapalinu nad tímto precipitátem. Vizually zkontrolujte, že sliny byly nejprve do špičky nabrány a následně vypuštěny. Další míchání reakční směsi není nutné.

Následně přidejte **3 µL RNA z vialky External control (vialka č. 5, fialové víčko ●)** a vypláchněte špičku opakovaným nasátím a vypuštěním kapaliny. Externí kontrolu vždy přidejte až po vzorku. Další míchání reakční směsi není nutné.


Tyto objemy jsou vhodné pro manuální i automatizované pipetování. Pokud přidáváte vzorky a kontrolu automatizovaně, nastavte pipetovací program tak, aby vzorek i kontrolu s RT-PCR mixem hned po jejich přidání promíchal.

### Vzorky nosohltanových stěrů

**Přidejte 2 µL vzorku stěru do jamek/mikrozkumavek**, které obsahují 15 µL RT-PCR master mixu a vypláchněte špičku opakovaným nasátím a vypuštěním kapaliny. Zkontrolujte, že vzorek byl nejprve do špičky nabrán a následně vypuštěn. Další míchání reakční směsi není nutné.





Následně přidejte **3 µL RNA z vialky External control (vialka č. 5, fialové víčko **) a vypláchněte špičku opakovaným nasátím a vypuštěním kapaliny. Externí kontrolu vždy přidejte až po vzorku. Další míchání reakční směsi není nutné.

Tyto objemy jsou vhodné pro manuální pipetování, pokud testujete vzorky stěrů automatizovaně, přidejte větší objem stěru a menší objem kontroly: **4 µL vzorku a 1 µL externí kontroly**, nastavte pipetovací program tak, aby vzorek i kontrolu s RT-PCR mixem hned po přidání promíchal.

## Obecné postupy





Externí kontrola musí být vždy přidána do každé jamky s každým vzorkem, protože pokud by došlo k inhibici RT-PCR reakce vzorkem, tak tato kontrola tuto inhibici odhalí. Vždy musí být přidána až po přidání vzorku, nikoliv naopak.

Po přidání vzorků a externí kontroly do 96-jamkové destičky ji zalepte adhezivní optickou fólií a co nejdříve spusťte RT-PCR reakci (do 30 minut od přidání vzorků), jak je popsáno v kapitole 3.7.



**Na každé destičce musí být alespoň jedna pozitivní a jedna negativní kontrola.**

V případě pozitivní kontroly přidejte místo vzorku **2 nebo 4 µL Positive control z vialky č. 4 (červené víčko **). V případě negativní kontroly přidejte místo vzorku buď **2 nebo 4 µL Negative control z vialky PCR grade water**.

Následně přidejte do jamek s pozitivní i negativní kontrolou **1 nebo 3 µL RNA z vialky External control (vialka č. 5, fialové víčko **). Objemy pozitivní, negativní a externí kontroly zvolte stejné, jako jste zvolili u ostatních vzorků. Celkový objem reakce po přidání vzorku a kontroly či obou kontrol je vždy 20 µL.



Na každé destičce doporučujeme také kontrolu známého pozitivního klinického vzorku ve stejném mediu jako ostatní vzorky, či stejný biologický typ (např. sliny). Doporučujeme takovou kontrolu rozalíkvotovat a používat opakovaně (kontrola není součástí soupravy).



### 3.7 Protokol RT-PCR

Souprava byla ověřena na přístrojích: **Roche LightCycler 480 II** (LC480 II) a **BioRad CFX96** real-time PCR. Lze jej použít také s jinými přístroji, které jsou schopné trojitě detekce v kanálech FAM, HEX a Cy5, je však na uživateli, aby provedl správné nastavení přístroje a ověřil fungování soupravy s využitím vhodných kontrol. Návod na nastavení RT-PCR protokolu a detekce v kanálech FAM, HEX a Cy5 naleznete v uživatelské příručce příslušného přístroje.

#### Nastavení přístroje Roche LC480 II

Pro detekci ve třech kanálech použijte následující nastavení:

Channel	Excitation filter (nm)	Emmision filter (nm)	Quant factor	Max intergration time (sec)
FAM	465	510	10	1
HEX	533	580	10	1
Cy5	618	660	10	3

**Tabulka 5: Nastavení filtrů pro RT-PCR detekci na přístroji Roche LC480 II**

Program se skládá ze 4 kroků:

1. Reverzní transkripce virové RNA (RT step)
2. Aktivace Taq polymerázy (Denature)
3. PCR amplifikace (45 cyklů; Cycling)
4. Ochlazení destičky (Cooling)

Nastavení cílové teploty a načasování každého kroku je uvedeno v tabulce níže.

Proměnná	RT step	Denature	Cycling			Cooling
Analysis mode	None	None	Quantification			None
Cycles	1	1	45			1
Target (°C)	50	95	95	60	72	40
Hold (hh:mm:ss)	00:10:00	00:02:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp rate (°C/s; 96)	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	2.2
Acquisition mode	None	None	None	Single	None	None

**Tabulka 6: Protokol pro RT-PCR detekci na přístroji Roche LC480 II.** Přibližná délka tohoto protokolu na přístroji Roche LC480 II je 70 minut.

#### Nastavení přístroje BioRad CFX96

Identický protokol, jako je popsán výše pro **Roche LightCycler 480 II**, byl validován také pro **BioRad CFX96**. Použijte výchozí nastavení ramp rate a kanálů FAM, HEX a Cy5. Přibližná délka tohoto protokolu na přístroji BioRad CFX96 je 80 minut.



## 3.8 Analýza dat

### Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu ( $C_t$ )

Provedte analýzu dat dle návodu k obsluze vašeho RT-PCR přístroje. Pro zobrazení fluorescence doporučujeme používat logaritmické zobrazení a doporučujeme používat barevnou kompenzaci mezi kanály FAM a HEX, pokud ji váš stroj nabízí. Níže uvádíme doporučené hodnoty thresholdů pro vybrané přístroje, avšak v případě potřeby jejich hodnotu upravte tak, aby křivky protínaly v jejich lineární části (v logaritmickém zobrazení, neplatí pro lineárně zobrazené křivky) a zároveň aby byl threshold vždy nad pozadím u všech negativních vzorků. Úprava thresholdů může být vyžadována buď vyšší autofluorescencí vzorků (zejména slin), a tím pádem vyšším pozadím, nebo rozdíly mezi jednotlivými přístroji (byť od stejného výrobce).

Pro BioRad CFX96 doporučujeme použít výchozí nastavení pro FAM, HEX a Cy5 kanály a pro určení hodnot  $C_t$  použijte výchozí metodu Fit Points\* s thresholdy: 100 až 200 RFU pro FAM, 100 až 200 RFU pro HEX a 50 až 100 RFU pro Cy5. Pro Roche LC480 II doporučujeme použít výchozí korekci barev pro kanály FAM a HEX\*\*, která je uložena v databázi a nastavení thresholdů: 1.0 RFU pro FAM; 0.5 RFU pro HEX a 0.1 RFU pro Cy5 (pro vyhodnocení v Cy5 je nutné vypnout korekci barev). Alternativně je pro získání  $C_t$  na přístroji Roche LC480 II možné využít analýzu metodou maxima druhé derivace.

Obě metody výpočtu hodnot  $C_t$  (*fit points* i *druhá derivace*) mohou naměřené křivky nesprávně vyhodnotit, proto v každém případě doporučujeme vizuální kontrolu naměřených dat. Všechny křivky se strmým a trvajícím nárůstem fluorescence musí být vyhodnoceny jako pozitivní (vzhled křivek je popsán v další kapitole *Typické výsledky*), zatímco ostatní křivky musí být vyhodnoceny jako negativní. Metoda *druhá derivace* může někdy v důsledku neobvyklého tvaru vyhodnotit pozitivní vzorek jako negativní, zatímco metoda *Fit Points* naopak negativní vzorek jako pozitivní – např. při skokovém nárůstu fluorescence v důsledku bubliny v reakční směsi atp.

Získané hodnoty  $C_t$  se budou v závislosti na zvolené metodě a nastavení thresholdů lišit. Pokud použijete metodu Fit Points a nastavíte threshold (práh fluorescence) blízko fluorescence pozadí, můžete na přístroji Roche LC480 II získat  $C_t$  až o 3 cykly nižší než při použití metody druhé derivace. Stejným způsobem získané  $C_t$  na přístrojích Biorad CFX96 budou také až o 3 až 4 cykly nižší. Pokud však nastavíte prahovou hodnotu vysoko, můžete naopak získat hodnoty  $C_t$  výrazně vyšší než u metody maxima druhé derivace. Níže uvádíme předpokládané hodnoty  $C_t$  pro pozitivní i externí kontrolu, za předpokladu dodržení návodu (přidaných objemů kontrol a nastavených thresholdů).

Veškeré hodnoty  $C_t$  uvedené níže v textu u vyhodnocení kontrol a v tabulce 7 odpovídají výše popsanému nastavení obou přístrojů v metodě *fit points*. V případě použití jiného nastavení či jiné metody je pro přesnou interpretaci podle tabulky 7 nutné naměřené hodnoty  $C_t$  posunout o rozdíl mezi vámi určenou hodnotou  $C_t$  pozitivní kontroly a referenční hodnotou  $C_t = 28$  (pro FAM i HEX kanál)\*\*\*. Například, pokud vámi určená hodnota  $C_t$  pro pozitivní kontrolu bude 26, tak pro aplikaci tabulky 7 buď přičtete 2 cykly k hodnotám  $C_t$  klinických vzorků, anebo 2 cykly odečtete od prahových  $C_t$  v tabulce 7.

\* Metoda je také nazývána *Threshold Crossing* nebo *Cycle Threshold*, kde hodnota  $C_t$  odpovídá cyklu, kde fluorescence vzroste nad úroveň pozadí a překračuje předem stanovenou prahovou hodnotu.

\*\* Využití korekce barev není nutné, avšak bez jeho použití může být pozorován slabý signál v HEX kanálu i při absenci amplifikace v tomto kanálu, a to pokud dojde současně k amplifikaci ve FAM kanálu, což znesnadní interpretaci dat. Pro vyhodnocení Cy5 musí být korekce barev vypnutá.



*\*\*\*Přesné hodnoty pro BioRad CFX96 jsou 28. cyklus (FAM) a 29. cyklus (HEX), zatímco pro Roche LC480II jsou 28. (FAM) a 27. cyklus (HEX) při metodě fit points, zatímco 28. (FAM) a 29. cyklus (HEX) při metodě maxima druhé derivace. Vše je uvedeno pro případ přidání 4 µL pozitivní kontroly do reakce, v případě přidání 2 µL budou referenční cykly o jedna vyšší.*

## Vyhodnocení kontrol

U **pozitivní kontroly** musí k amplifikaci dojít ve všech třech kanálech: virových genů ve FAM (cyklus 27-31), HEX (cyklus 27-31) i externí kontroly v Cy5 (<32 cyklů). Pokud nedojde k amplifikaci v některém z těchto kanálů, PCR reakce neproběhla správně a výsledky z takové analýzy nejsou platné a musí být zopakovány. Pro určení hodnot  $C_t$  použijte výše popsané nastavení přístrojů v metodě *fit points*.

U **negativní kontroly** musí dojít k amplifikaci externí kontroly v kanálu Cy5 (<32 cyklů), zatímco v kanálech FAM nebo HEX nesmí být žádná amplifikace. Měřitelná amplifikace ve FAM nebo HEX kanálech ukazuje na kontaminaci reagensií templátovou sekvencí, což může způsobit falešně pozitivní výsledky. V takovém případě doporučujeme otestovat větší počet negativních kontrol.



**Externí kontrola** musí být vyhodnocena u každého vzorku: porovnejte průměrnou hodnotu  $C_t$  v Cy5 kanálu u pozitivní a negativní kontroly s  $C_t$  každého vzorku. Pokud test vyhodnocujete pouze kvalitativně, pak není potřeba kontrolu vyhodnocovat u vzorků které mají pozitivní signál v obou virových kanálech (FAM a HEX), u nich totiž může být amplifikace externí kontroly negativně ovlivněna amplifikací virových genů a v každém případě se jedná o COVID-19 pozitivní vzorky. U vzorků negativních ve FAM a HEX, či pozitivních pouze v jednom z těchto dvou kanálů je nutné porovnat hodnoty  $C_t$  u vzorku a kontrol. V případě, že je  $C_t$  v Cy5 u vzorku oproti kontrolám nižší nebo stejná, pak nedochází k žádné inhibici RT-PCR a citlivost detekce COVID-19 není vzorkem negativně ovlivněna. V případě, že je  $C_t$  v Cy5 u vzorku oproti kontrolám vyšší, tak úměrně rozdílu lze kvantifikovat rozsah inhibice RT-PCR (externí kontrola je výrazně náchylnější na inhibici či degradaci než virová RNA, takže posun v  $C_t$  u virových kanálů bude vždy menší nebo maximálně stejný): pokud je  $C_t$  v Cy5 u vzorku o jeden cyklus vyšší, pak je inhibice až 50%, tzn. zvýšení limitu detekce až dvojnásobně. Pokud je  $C_t$  v Cy5 u vzorku vyšší o cca 3.3 cykly, pak může být citlivost detekce COVID-19 v takovém vzorku až desetkrát nižší (nejnižší detekované množství viru může být až desetkrát vyšší, při této a vyšší inhibici může dojít k falešně negativnímu výsledku v tomto vzorku, pokud by  $C_t$  pro virové kanály v neinhibované reakci bylo vyšší než cca 35). U vzorků, které mají  $C_t$  v Cy5 kanálu vyšší o cca 6.6 cyklů, tak citlivost stanovení může být až 100x nižší.

Při testování 4 µL stěrů v mediu bylo ve skupině 537 lidí pozorováno ~0.5 % vzorků (3 vzorky), u kterých došlo k posunu  $C_t$  v Cy5 o více jak 3 cykly, zatímco při otestování 2 µL media to byl pouze jeden vzorek. Při testování 2 µL slin byl ve skupině 494 lidí pozorován pouze jeden vzorek se zvýšeným  $C_t$  v Cy5 o více jak 3 cykly. Doporučujeme vyloučit vzorky s  $C_t$  v Cy5 o více jak 4 cykly vyšší oproti kontrolám a přeměření těchto vzorků buď v menším objemu (např. namísto 4 µL stěrů pouze 2 µL) anebo přeměření alternativním způsobem s izolací RNA před RT-PCR.

## Interpretace výsledků měřených vzorků

Stanovte hodnoty prahového detekčního cyklu ( $C_t$ ) v každém kanálu a výsledky interpretujte dle tabulky 7 níže a dle výsledků vyhodnocení pozitivní kontroly. V případě, že vámi získané hodnoty  $C_t$  pro pozitivní kontrolu odpovídají mezím uvedeným v předchozím oddíle (tj.  $C_t$  pro FAM i HEX kanál mezi 27. a 31. cyklem), můžete interpretovat naměřená  $C_t$  dle této tabulky bez dalších přepočtů. V opačném případě je nutno  $C_t$  stanovené vaší metodou před interpretací dle tabulky 7 přepočítat, jak je uvedeno v oddíle Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu výše.



FAM	HEX	Cy5	Interpretace
+ <sup>[3]</sup>	+ <sup>[3]</sup>	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	<b>COVID-19 pozitivní</b>
-	-	+ <sup>[1]</sup>	<b>Nedetekovatelné (COVID-19 negativní)</b>
-	-	-	<b>Nespolehlivý výsledek: inhibice RT-PCR, doporučeno zopakovat nebo provést standardní test s izolací RNA.</b>
C <sub>t</sub> > 30 <sup>[3]</sup>	-	+ <sup>[1]</sup>	<b>Slabě COVID-19 pozitivní<sup>[4,5]</sup></b>
-	C <sub>t</sub> > 30 <sup>[3]</sup>	+ <sup>[1]</sup>	
C <sub>t</sub> > 30 <sup>[3]</sup>	-	-	<b>Slabě COVID-19 pozitivní, inhibice RT-PCR<sup>[6]</sup></b>
-	C <sub>t</sub> > 30 <sup>[3]</sup>	-	
C <sub>t</sub> < 30 <sup>[3]</sup>	-	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	<b>Nespolehlivý výsledek: může ukazovat kontaminaci produktem amplifikace nebo mutaci v jednom z genů, doporučeno zopakovat s RT-PCR soupravou, která detekuje jiné geny než tato souprava.</b>
-	C <sub>t</sub> < 30 <sup>[3]</sup>	+ <sup>[1]</sup> / - <sup>[2]</sup>	

**Tabulka 7: Interpretace výsledků.**

**+ znamená C<sub>t</sub> < 40 cyklů<sup>[3]</sup> / - znamená C<sub>t</sub> > 40 cyklů<sup>[3]</sup> nebo nedetekovatelný signál**

Ve FAM je detekován virový gen EndoRNase, v HEX virový gen Spike a v Cy5 Externí kontrola.

[1] Při přidání 1 µL externí kontroly je hodnota C<sub>t</sub> v Cy5 kanálu okolo 30. cyklu, v případě přidání 3 µL je hodnota C<sub>t</sub> v Cy5 kanálu okolo 29. cyklu. + značí C<sub>t</sub> v Cy5 ve vzorku maximálně o 4 cykly vyšší než průměr pozitivní a negativní kontroly, - značí C<sub>t</sub> v Cy5 ve vzorku o více než 4 cykly vyšší.

[2] Velmi vysoké koncentrace viru mohou způsobit zhoršení amplifikace externí kontroly, což se projeví snížením signálu v kanálu Cy5 či jeho úplnou absencí (podrobnosti viz Obrázek 3). Absence signálu Cy5 nemění interpretaci pozitivních signálů v kanálech FAM a HEX.

[3] Hodnoty prahového detekčního cyklu (C<sub>t</sub>), které jsou uvedené v této tabulce, jsou založeny na výše popsaném nastavení přístrojů. Naměřené hodnoty se mohou lišit s použitím různých přístrojů a/nebo metod (viz výše).

[4] Pozitivní signál i pouze v jednom kanálu je nutné považovat za pozitivní vzorek. Avšak pro vyloučení možnosti náhodné slabé kontaminace je možné vzorek zopakovat (opakovaně pozitivní signál alespoň v jednom kanálu je považován za pozitivní výsledek).

[5] Pozitivita pouze v jednom kanálu nastane typicky pouze u slabých vzorků s C<sub>t</sub> nad 35, s jednou výjimkou: tzv. britská varianta vede k posunu signálu v HEX kanálu do vyšších cyklů (posun okolo pěti cyklů oproti FAM) a pouze v jednom kanálu (FAM) tak mohou být pozitivní i vzorky s C<sub>t</sub> > 30.

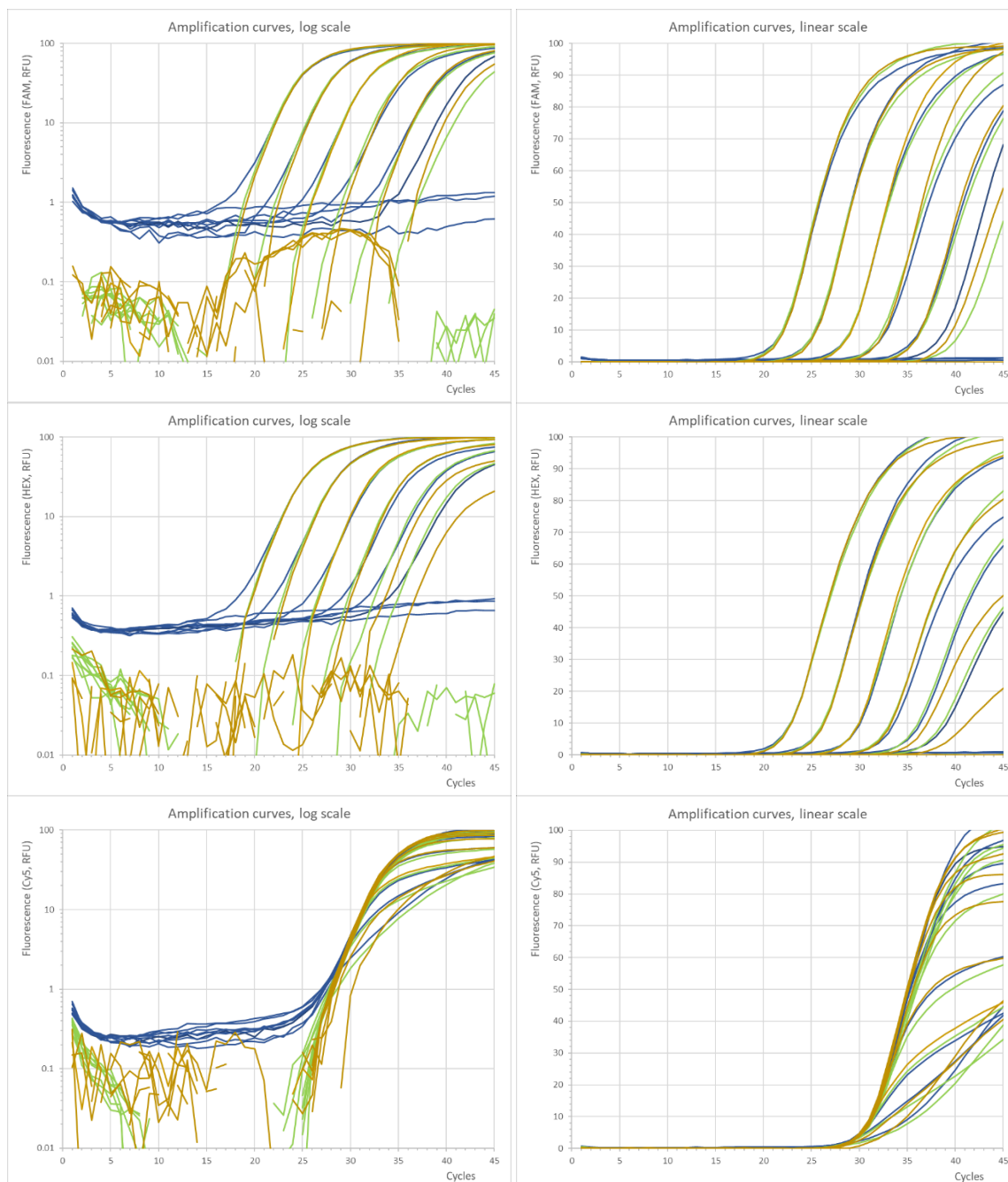
[6] Pro přesnější výsledek je možné zopakovat nebo provést standardní test s izolací RNA. (opakovaně pozitivní signál alespoň v jednom kanálu je považován za pozitivní výsledek).

Pozn.: u slin může u některých vzorků dojít ke zvýšení pozadí fluorescence a je tak nutné jak pro virové kanály (FAM a HEX), ale i pro externí kontrolu v Cy5 upravit threshold.



## Typické výsledky

Níže jsou vyobrazeny ilustrativní data naměřená s ředící řadou virové RNA se soupravou DB-1211, ve které jsou využívány shodné primery a próby jako v soupravě DB-1219. Přesné hodnoty cyklů  $C_t$  a fluorescence se mohou pro DB-1219 lišit, avšak tvary křivek (virových genů i externí kontroly) jsou pro obě soupravy shodné.



**Obrázek 3: Detekce desítkové ředící řady COVID-19 RNA v množství od 1 000 000 do 10 kopií v jamce (a třech negativních kontrol) na přístrojích Roche LC480 II (modré křivky), Agilent AriaMX (zelené křivky) a BioRad CFX96 (hnědé křivky).**

První dvojice grafů ukazuje amplifikaci signálu v kanálu FAM (virový gen EndoRNase), druhá v HEX (virový gen Spike) a třetí v Cy5 (kontrola izolace RNA). Grafy vlevo ukazují fluorescenci v logaritmickém měřítku, zatímco grafy vpravo ukazují fluorescenci v lineárním měřítku.

Jednotky fluorescence jsou normalizovány tak, aby maximum pro každý přístroj bylo rovno 100. Skutečné naměřené hodnoty byly na Roche LC480 II ~ 30 RFU pro FAM i HEX a ~ 8 RFU pro Cy5; na BioRad CFX96 ~ 5 000 RFU pro FAM i HEX a ~1 500 RFU pro Cy5; na Agilent AriaMX ~ 10 000 RFU pro FAM i HEX a ~ 10 000 RFU pro Cy5.

Amplifikace virové RNA v kanálech FAM a HEX je lineární v celém rozsahu. Amplifikace v kanále Cy5 je snížena při velmi vysokých titrech virové RNA, nicméně i tak je kontrola vždy detekována (křivky s nižší maximální fluorescencí znázorněné v pravém dolním grafu odpovídají jamkám s nejvyšší koncentrací virové RNA).

**Použitý materiál:** FrameStar 96 Well Semi-Skirted PCR plate (4ti-0951, white wells) a LightCycler 480 Sealing Foil (04729757001) pro **LC480 II**; Hard-Shell 96 well PCR plate-low-profile-skirted-clear-well (HSP9601) a LightCycler 480 Sealing Foil (04729757001) pro **CFX96**, FrameStar 96 Fully-Skirted (F-0961, white wells) a LightCycler 480 Sealing Foil (04729757001) pro **AriaMX**.



## 4 Právní upozornění

V plném rozsahu povoleném zákony vaší jurisdikce, je DIANA Biotechnologies, s.r.o. zbavena odpovědnosti za jakékoli přímé nebo nepřímé škody spojené nebo vzniklé v souvislosti s tímto dokumentem a jeho použitím, jakož i za jakékoli přímé a nepřímé škody spojené nebo vzniklé v souvislosti s COVID-19 Multiplex RT-PCR kitem a s jeho použitím.

## 5 Seznam kompatibilních souprav

- REF** DB-1224 Bravo Installation Package for DBdirect™
- REF** DB-1222 DBdirect™ Bravo Extension Kit for Swab
- REF** DB-1221 Saliva Collection Set 1.1IM
- REF** DB-1223 DBdirect™ Bravo Extension Kit for Saliva 1.1IM
- REF** DB-1225 Saliva Collection Set 1.4IM
- REF** DB-1226 DBdirect™ Bravo Extension Kit for Saliva 1.4IM





## 6 Jednostránkový souhrnný protokol

### 6.1. Složky soupravy

Složky soupravy	Objem (μL)		Skladovací teplota	Popis vialek
	100rxns	1000rxns		
Enhancer mix (4x)	500	5000	-20 °C	1
Primer mix (4x)	500	5000	-20 °C	2
Enzyme mix (4x)	500	5000	-80 °C	3
Positive control	150	2x 750	-20 °C	4
External control	500	5000	-20 °C	5
Negative control	500	5000	-20 °C	W

### 6.2 Příprava RT-PCR

- Po rozmrazení všechny složky promíchejte, každou vialku před otevřením stočte.
- V následujícím pořadí smíchejte: 5 μL Enhancer mixu (vialka č. 1), 5 μL Primer mixu (vialka č. 2) a 5 μL Enzyme mixu (vialka č. 3). Promíchejte po přidání každé složky.
- Přeneste 15 μL tohoto RT-PCR master mixu do 96-jamkové destičky, přidejte 2 μL slin (po tepelné inaktivaci) nebo 4 μL stěru (lze i 2 μL stejně jako u slin), poté doplňte do 20 μL externí kontrolou (vialka č. 5): 3 μL u slin zatímco 1 μL u stěrů a poté zalepte destičku optickou fólií a co nejdříve spusťte RT-PCR reakci.
- Pro pozitivní a negativní kontrolu přidejte místo vzorku stejný objem pozitivní (vialka č. 4) anebo negativní kontroly (PCR voda) a doplňte externí kontrolou do 20 μL.

Tabulka shrnující objemy jednotlivých složek potřebné pro 1 a 100 reakcí:

Složky soupravy	Popis	μL na 1 reakci	μL na 100 reakcí
Enhancer mix (4x)	1	5	500
Primer mix (4x)	2	5	500
Enzyme mix (4x)	3	5	500
Celkový objem RT-PCR master mixu		15	1500

### 6.3. Protokol RT-PCR














Tabulka sumarizující nastavení přístroje Roche LightCycler 480 II:

Variable	RT step	Denature	Cycling			Cooling
Analysis mode	None	None	Quantification			None
Cycles	1	1	45			1
Target (°C)	50	95	95	60	72	40
Hold (hh:mm:ss)	00:10:00	00:02:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp rate (°C/s; 96)	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	2.2
Acquisition mode	None	None	None	Single	None	None

Snímání musí být nastaveno pro současnou detekci ve třech kanálech (FAM, HEX a Cy5). Postup pro nastavení trojitě detekce naleznete v kapitole 3.7 a v návodu příslušného přístroje.



## 7 Použité grafické symboly

	Manufacturer / Výrobce
	Date of Manufacture / Datum výroby
	Caution / Pozor
	Lot Number / Kód dávky
	Operator's manual, operating instructions / Čtěte návod k použití
	Catalogue Number / Katalogové číslo
	Lower limit of temperature / Dolní mez teploty
	Temperature limit / Limit teploty
	Upper limit of temperature / Horní mez teploty
	Do not use if package is damaged / Nepoužívat jestliže je balení poškozeno
	Use by date / Použit do data
	Do not reuse / Nepoužívat opětovně
	Keep away from sunlight / Chraňte před slunečním zářením

