



DB-1211

COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit

Uživatelská příručka

Verze příručky: DB-1211-004-200821

Revize: 1.8 CZ

Poslední aktualizace: 17.12.2020



REF DB-1211-50rxns (testovací souprava) obsahuje reagentie pro 50 reakcí

REF DB-1211-100rxns obsahuje reagentie pro 100 reakcí

REF DB-1211-1000rxns obsahuje reagentie pro 1000 reakcí



Obsah

1 Úvod	3
1.1 Účel a použití soupravy	3
1.2 Charakteristiky testu	3
1.3 Bezpečnostní upozornění	4
2 Seznam materiálu	5
2.1 Požadované laboratorní vybavení	5
2.2 Požadovaný materiál, který není součástí soupravy	5
2.3 Materiál, který je součástí soupravy	5
2.4 Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu	6
3 Návod k použití	7
3.1 Obecné postupy	7
3.2 Jak zamezit kontaminacím (falešně pozitivním výsledkům)	7
3.3 Než začnete	8
3.4 Přidání kontroly izolace RNA (Isolation control)	8
3.5 Příprava RT-PCR master mixu	9
3.6 Přidání vzorku do RT-PCR reakce	10
3.7 Protokol RT-PCR	11
Nastavení přístroje Roche LightCycler 480 II	11
Nastavení přístroje Agilent AriaMX	11
Nastavení přístroje BioRad CFX96	12
3.8 Analýza dat	13
Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (C _t)	13
Vyhodnocení kontrol	13
Interpretace výsledků měřených vzorků	14
Typické výsledky	15
4 Právní upozornění	16
5 Seznam kompatibilních souprav	16
6 Jednostránkový souhrnný protokol	17
6.1. Složky soupravy	17
6.2 Příprava RT-PCR	17
6.3. Protokol RT-PCR	17
7 Použití grafické symboly	18



1 Úvod

1.1 Účel a použití soupravy

COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit (Kat.č. DB-1211) slouží k jednokrokové RT-PCR detekci viru SARS-CoV-2 (Wuhan coronavirus 2019, COVID-19) z izolované RNA. Souprava v jedné multiplexní RT-PCR reakci specificky detekuje dva virové geny, **Spike** a **EndoRNase** a syntetickou **RNA kontrolu**. Tato kontrola se přidává do vzorku ještě před izolací RNA a slouží jak pro ověření účinnosti RT-PCR reakce, tak sledování výtěžku izolace RNA.

RNA použitá pro detekci COVID-19 touto soupravou, by měla být izolována z biologických vzorků (např. z nosohltanového stěru v univerzálním transportním mediu (UTM) či v PBS nebo ze slin) s využitím souprav k tomu určených. Mohou být použity jak kolonkové izolační soupravy, tak soupravy založené na magnetických částicích. Izolovaná RNA musí být eluována ve vodě nebo v pufru, který neinhibuje RT-PCR reakci. Pro dosažení optimálních výsledků detekce COVID-19 z nosohltanových stěrů v UTM nebo PBS doporučujeme použití DIANA RNA izolačních souprav (Kat. č. DB-1205 nebo DB-1206).

Souprava obsahuje kontrolu izolace RNA a primery a sondu pro její detekci. Doporučujeme přidat kontrolu do každého vzorku ještě před izolací RNA, aby bylo možné ověřit výtěžek izolace. Kontrolu přidejte do lyzačního/vazebného pufru ze soupravy pro izolaci RNA, který bude následně smíchán se vzorkem, ze kterého je RNA izolována. Tímto postupem se ověří jak účinnost samotné RT-PCR reakce (odhalí se případná inhibice), tak i dostatečný výtěžek izolace RNA, což je klíčový předpoklad pro správnou diagnostiku. Méně preferovanou možností je přidání kontrolní RNA přímo do RT-PCR mixu – tímto způsobem se kontroluje pouze účinnost RT-PCR reakce.

1.2 Charakteristiky testu

Sensitivita a specifita

Primery a sondy použité v této soupravě byly vyvinuty společností DIANA Biotechnologies a byly optimalizovány pro multiplexní detekci. Cíli sekvence v genomu COVID-19, které nebyly mutovány v žádné z evropských sekvencí dostupných v databázi NCBI (238 sekvencí k 17. květnu 2020). Primery byly navrženy tak, aby byly specifické pro COVID-19, jejich sekvence není konzervována v SARS, MERS ani v žádném jiném lidském koronaviru. Primery nevykazují nespecifickou amplifikaci lidské mRNA nebo lidského genomu v *in silico* PCR analýze.

Souprava byla validována na RNA izolované z lidských vzorků. Bylo analyzováno 18 pozitivních a 59 negativních vzorků, a výsledky byly porovnány se čtyřmi dalšími CE IVD COVID-19 soupravami od tří různých dodavatelů. Souprava DB-1211 dosáhla 100% citlivosti a 100% selektivity. Souprava detekuje méně než 10 kopií RNA genomu COVID-19, s lineárním rozsahem alespoň do 100 milionů kopií, což bylo stanoveno na základě ředící řady virové RNA o známé koncentraci.



Přesnost

Variabilita mezi geny byla stanovena jako průměrná standardní odchylka mezi C_t naměřenými pro FAM a HEX kanály, přičemž byla $< 0,2$ cyklu pro vzorky s C_t menším než 35 cyklem (17 klinických vzorků z 18 celkem), zatímco R^2 pro lineární regresi mezi C_t obou genů bylo pro tyto vzorky 0,998.

Naměřené průměrné hodnoty C_t pro oba geny pro všech 18 pozitivních vzorků byly porovnány s hodnotami C_t z referenční CE IVD soupravy stanovující E-gen, přičemž R^2 lineární regrese mezi oběma soupravami byla 0.984 bez jediné odlehle hodnoty.

Reprodukovatelnost

Intra a interassay variabilita byla změřena pro koncentrace virové RNA 100 000, 1 000 a 100 kopií (vždy celkem ze 40 replikátů). Naměřené hodnoty intraassay variability (průměrných standardních odchylek C_t replikátů na jedné destičce) pro oba kanály byly pro tyto koncentrace postupně < 0.1 , < 0.2 a < 0.5 , zatímco interassay variabilita (průměrná standardní odchylka C_t replikátů na různých destičkách) byla pro oba kanály pro tyto koncentrace postupně < 0.1 , < 0.3 a < 0.6 .

Vhodné přístroje

Souprava byla ověřena na několika RT-PCR cyklerech: Roche LightCycler 480 II, Agilent AriaMX 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 reagensů 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 jednakanálové / 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 vialky pro míchání jednotlivých složek
- PCR destička a adhezivní optická fólie pro zalepení destičky pro PCR
- Soupravy nebo reagentie pro izolaci RNA (např. DB-1205 nebo DB-1206)

2.3 Materiál, který je součástí soupravy

Složky soupravy	Objem (μL) ^[6]			Podmínky skladování	Číslo a barva víčka
	50rxns	100rxns	1000rxns		
Enhancer mix (4x)	250	500	5000	-20 °C ^[2,3]	1 ^[5]
Primer mix (4x)	250	500	5000	-20 °C ^[1,2,3]	2 ^[5]
Enzyme mix (4x)	250	500	5000	-20 °C ^[2,3]	3 ^[5]
Positive control	25	100	2x 500	-20 °C ^[2,3]	4
Isolation control ^[4]	75	150	2x 750	-20 °C ^[2,3]	5

Tabulka 1: Složky soupravy

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

[2] – **Skladujte při teplotě -20 °C nebo nižší**; může být skladováno také při -40 °C nebo -80 °C. Nepoužívejte soupravu, pokud složky byly v okamžiku dodání rozmrazené.

[3] – Minimalizujte počet zmrazení/rozmrazení, kontroly rozalikvotujte po prvním rozmrazení.

[4] – Přidejte do lyzačního/vazebního puftru před extrakcí RNA nebo přímo do RT-PCR mixu.

[5] – Barevná víčka jsou použita pouze v soupravách pro 50 a 100 reakcí (některé šarže mohou mít víčka průhledná). Průhledná víčka jsou použita v soupravách pro 1000 reakcí.

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

Enhancer Mix (4x)

Obsahuje speciální složky 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 **kontroly izolace RNA v kanálu Cy5**. Dodáván jako 4x koncentrát.

Enzyme Mix (4x)

Obsahuje termostabilní reverzní transkriptázu, hot-start Taq DNA polymerázu, MgCl₂, dNTPs, pufr a speciální přísady. 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!

Isolation control

Obsahuje syntetickou RNA, která se přidává do každého vzorku před izolací RNA za účelem kontroly její účinnosti a odhalení případné inhibice RT-PCR reakce.

2.4. Stabilita jednotlivých složek soupravy a master mixu

Složky 1, 2 a 3 dlouhodobě skladujte při teplotě -20 °C nebo nižší (doba použitelnosti je uvedena na obalu). Vyhněte se opakovanému zmrazení/rozmrazení složek, nikdy nepřekračujte čtyři cykly zmrazení/rozmrazení. Pokud budete tyto složky používat vícekrát, rozalíkujte je po prvním rozmrazení.

Složky soupravy jsou stabilní až 8 hodin při 25 °C, pokud nejsou smíchané dohromady. Avšak doporučujeme složky používat co nejdříve po rozmrazení nebo je uchovávat na ledu (maximálně 8 hodin). Uchovávejte složky soupravy mimo přímé sluneční světlo, působení běžného denního světla po dobu až 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 8 hodin, pokud je uchováván na ledu. Při laboratorní teplotě by master mix neměl být déle než 30 minut. Master mix uchovávejte mimo přímé sluneční světlo, běžnému dennímu světlu může být vystaven maximálně po dobu 8 hodin. Master mix může být jednou zamražen. Lze si tedy předem připravit master mix pro několik PCR destiček nebo si rovnou připravit hotové PCR destičky, nicméně vše musí být rozalíkotoováno a zamrazeno co nejdříve po přípravě master mixu. Je nutné buď rychlé zamrazení pomocí tekutého dusíku nebo uložit přímo do -80°C, při skladování v -80°C lze uchovat po dobu jednoho měsíce.

Složky 4 a 5 (pozitivní a izolační kontrola) obsahují RNA, rozmrazujte je na dobu nezbytně nutnou a uchovávejte je na ledu, avšak jednorázově jsou stabilní až 8 hodin na pokojové teplotě. Pokud je plánujete použít vícekrát, připravte alikvoty během jejich prvního rozmrazení. Optimální teplota pro dlouhodobé skladování je -80 °C, ale mohou být skladovány při -20 °C se zbytkem soupravy.



3 Návod k použití

3.1 Obecné postupy

- Nepoužívejte součásti soupravy, které jsou při přijetí poškozené nebo rozmrazené. 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 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 reagensii a před otevřením vždy vialku s pozitivní kontrolou řádně stočte.
- Nádoby s reagensii nechávejte otevřené pouze po dobu nezbytně nutnou.
- K ředění vzorku použijte ultračistou nebo PCR-grade vodu (nebo z ní připravené pufr).

Pro kontrolu falešně pozitivních a falešně negativních výsledků důrazně doporučujeme přidat pozitivní a negativní kontroly na každou RT-PCR destičku. Negativní kontrolu lze provést dvěma způsoby. Nejlepší je provést izolaci RNA se známým negativním vzorkem nebo s prázdným médiem a přidat stejné množství eluátu do RT-PCR mixu jako by se jednalo o skutečný vzorek. Taková negativní kontrola odhalí kontaminaci v kterémkoliv kroku procesu. Druhý způsob negativní kontroly je méně robustní a spočívá v přímém přidání čistého elučního roztoku do RT-PCR mixu, jako by se jednalo o vzorek. Tento postup ale odhalí pouze kontaminaci elučního pufru nebo RT-PCR mixu. Jako pozitivní kontrola se používá COVID-19 templátová RNA, která je součástí soupravy (vialka č. 4).



3.3 Než začnete

Složky soupravy jsou skladovány zmrazené, před každým použitím proto:

- Rozmrazte složky na ledu nebo při pokojové teplotě. Pokud je nepoužíváte ihned po rozmrazení, umístěte je na led.
- 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 před otevřením krátce stočte.

3.4 Přidání kontroly izolace RNA (Isolation control)



Kontrola izolace RNA by měla být přidána do lyzačního/vazebného pufru před přidáním vzorku a následnou RNA izolací. Do lyzačního/vazebného pufru přidejte **1 µL RNA z vialky Isolation control (vialka č. 5, červené víčko ●) pro každý izolovaný vzorek** (například do objemu lyzačního/vazebného pufru pro 10 izolací použijte celkem 10 µL). Tento postup důrazně doporučujeme, protože pro každý vzorek odhalí nejen případnou inhibici RT-PCR reakce, ale také případnou sníženou účinnost izolace RNA.

Pokud není možné přidat kontrolu izolace RNA do vzorku před samotnou izolací RNA, přidejte **0.1 µL z vialky Isolation control (vialka č. 5, červené víčko ●) pro každou reakci** přímo do RT-PCR master mixu (například do mastermixu pro deset reakcí přidejte 1 µL, viz 5. krok v kapitole 3.5).



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 2.

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. **Volitelné:** pokud nepřidáváte kontrolu izolace RNA do vzorku před RNA izolací, **přidejte 0.1 µL z vialky Isolation control, v soupravě vialka č. 5 (červené víčko ●),** a promíchejte opakovaným pipetováním (pipeta by měla být pro míchání nastavena minimálně na ½ objemu míchaného roztoku) nebo s použitím vortexu.
6. Přeneste **15 µL směsi (RT-PCR master mix)** do 96-jamkové destičky nebo do mikrozkušavek (dle typu použitého PCR cykleru). Pokud nemůžete hned pokračovat s přidáním vzorků a následným RT-PCR, tak destičky/mikrozkušavky přikryjte víčkem a umístěte na led (bližší informace ohledně stability jednotlivých složek soupravy a RT-PCR master 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
Isolation control (volitelné*)	5	0.1	10
Celkový objem RT-PCR master mix		15	1500

Tabulka 2: Příprava RT-PCR master mixu

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

* objem Isolation control je zanedbán; do RT-PCR master mixu se přidává pouze v případě, že nebyla přidána při izolaci RNA (bližší informace viz kapitola 3.4).

3.5.1 Příprava RT-PCR master mixu ze soupravy DB-1211-1000rxns pro použití s pipetovací stanicí Agilent Bravo

Při využití robotické pipetovací stanice Agilent Bravo pro izolaci RNA (např. při použití *Automated RNA Isolation Kit for Agilent Bravo*, kat. č. DB-1206) je izolováno najednou 96 vzorků. Pokud pro následnou RT-PCR analýzu použijete soupravu DB-1211-100rxns, spotřebujete jedno celé balení a není nutná alikvotace roztoků. Avšak pokud chcete použít soupravu DB-1211-1000rxns, je nutné před prvním použitím roztoky v této soupravě rozaliquotovat.



Alikvotování roztoků pro přípravu RT-PCR master mixu

Počty alikvotů jednotlivých složek soupravy DB-1211 a jejich objemy jsou shrnuty v tabulce 1. Jsou dva možné způsoby přípravy alikvotů RT-PCR master mixu:

1. **V případě možnosti uchování alikvotů v -80°C:** smíchejte veškerý obsah Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x). Dodržte toto pořadí a vždy promíchejte před přidáním Enzyme mixu. Poté znovu důkladně promíchejte a poté rozdělte do 10 alikvotů po 1,6 mL. Výsledkem bude 10 vialek s ready-to-use RT-PCR mixem. Takto připravený RT-PCR mix musí být co nejdříve zamražen a uchováván při -80°C. Po rozmražení je nutné RT-PCR mix uchovávat na ledu. Na pokojové teplotě je stabilní po dobu 30 minut, podrobnosti ke stabilitě a skladování jsou uvedeny v odstavci 2.4.
2. V případě, že nemáte možnost uchovávat alikvoty v -80°C, připravte od každého z roztoků Enhancer mix (4x), Primer mix (4x) a Enzyme mix (4x) 10 alikvotů po 533 µL. Tyto alikvoty uchovejte při -20°C. Pro přípravu RT-PCR master mixu pro analýzu 96 izolací poté smíchejte vždy po jednom alikvotu od každé komponenty a vzniklý mix použijte celý. Po rozmražení a před smíchaním jsou jednotlivé komponenty RT-PCR master mixu stabilní při pokojové teplotě po dobu 8 hodin, podrobnosti ke stabilitě a skladování jsou uvedeny v odstavci 2.4.

Alikvotování pozitivní kontroly

Z dodaných vialek si připravte deset jednorázových alikvotů pozitivní kontroly, každý s objemem 100 µL. Tyto alikvoty mohou být uchovány podle potřeby jak při -80 °C tak při -20 °C.

Alikvotování izolační kontroly

Z dodaných vialek si připravte deset jednorázových alikvotů izolační kontroly, každý s objemem 150 µL. Tyto alikvoty mohou být uchovány podle potřeby jak při -80 °C tak při -20 °C.

3.6 Přidání vzorku do RT-PCR reakce

Přidejte 5 µL vzorku do jamek/mikrozkušavek, které obsahují 15 µL RT-PCR master mixu.

Na každé destičce musí být alespoň jedna pozitivní a jedna negativní kontrola. V případě pozitivní kontroly přidejte místo vzorku **5 µL Positive control z vialky č. 4 (žluté víčko)**. V případě negativní kontroly, přidejte místo vzorku buď **5 µL RNA izolované ze známého negativního vzorku** nebo **5 µL ultračisté vody nebo elučního pufu** ze soupravy pro izolaci RNA. Celkový objem reakce po přidání vzorku nebo kontroly je vždy 20 µL.

Po přidání vzorků do 96-jamkové destičky ji zalepte adhezivní optickou fólií a co nejdříve spusťte RT-PCR reakci (do 15 minut od přidání RNA), jak je popsáno v kapitole 3.7.



3.7 Protokol RT-PCR

Souprava byla ověřena na přístrojích: **Roche LightCycler 480 II**, **Agilent AriaMX Real-Time PCR System** 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 LightCycler 480 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 3: Nastavení filtrů pro RT-PCR detekci na přístroji Roche LightCycler 480 II

Program se skládá ze 4 kroků:

1. Reverzní transkripce virové RNA (RT krok)
2. Denaturace: aktivace Taq polymerázy
3. Cyklování teploty: PCR amplifikace (45 cyklů)
4. Ochlazení destičky

Nastavení cílové teploty a načasování každého kroku viz tabulka 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 4: Protokol pro RT-PCR detekci na přístroji Roche LightCycler 480 II. Přibližná délka tohoto protokolu na přístroji Roche LightCycler 480 II je 70 minut.

Nastavení přístroje Agilent AriaMX

Identický protokol, jako je popsán výše pro **Roche LightCycler 480 II**, byl validován také pro **Agilent AriaMX Real-Time PCR System**. Použijte výchozí nastavení ramp rate a kanálů FAM, HEX a Cy5. Přibližná délka tohoto protokolu na přístroji AriaMX je 75 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.

3.7.1 Zkrácená verze RT-PCR protokolu

V případě potřeby zkrátit RT-PCR protokol můžete využít jeho zkrácenou verzi. Ta vykazuje stejnou citlivost jako standardní RT-PCR protokol s jediným rozdílem: je negativně ovlivněna kvalita křivky izolační kontroly v kanálu Cy5 při současné amplifikaci ve virových kanálech FAM a HEX. Délka zkráceného RT-PCR protokolu je přibližně 50 minut na přístroji Roche LightCycler 480 II a 55 minut na přístrojích AriaMX a BioRad CFX96. Nastavení cílových teplot a časů pro zkrácený protokol je uvedeno v tabulce 5.

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	00:00:01	00:00:05	00:00:01	00:00:05
Acquisition mode	None	None	None	Single	None	None

Tabulka 5: Nastavení cílových teplot a časů pro zkrácený protokol pro RT-PCR detekci.



3.8 Analýza dat

Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu (C_t)

Provedte analýzu dat dle popisu v návodu k obsluze vašeho RT-PCR přístroje. Pro LightCycler 480 II doporučujeme použít výchozí korekci barev pro kanály FAM a HEX*, která je uložena v databázi, a pro získání C_t použít analýzu metodou maxima druhé derivace. Je možné použít i jiné metody a PCR přístroje, avšak získané hodnoty C_t se mohou v závislosti na zvolené metodě a přístroji výrazně odlišovat. Pokud použijete metodu Fit Points** a nastavíte práh fluorescence blízko fluorescence pozadí, můžete s přístrojem Roche LC480 II získat C_t až o 3 cykly nižší než při použití metody druhé derivace. Takto získané C_t na přístrojích Biorad CFX96 a Agilent AriaMX mohou být také až o 3 až 4 cykly nižší. Pokud však nastavíte prahovou hodnotu vysoko, můžete naopak získat hodnoty C_t vyšší než u metody maxima druhé derivace.

Zároveň každá metoda vyhodnocení fluorescence může naměřené křivky nesprávně vyhodnotit, proto v každém případě doporučujeme vizuální kontrolu naměřených dat fluorescence. Všechny křivky se strmým a trvajícím nárůstem fluorescence musí být vyhodnoceny jako pozitivní (vzhled křivek je v odstavci Typické výsledky na straně 14), zatímco ostatní křivky musí být vyhodnoceny jako negativní. Metoda druhé derivace může někdy v důsledku neobvyklého tvaru vyhodnotit pozitivní vzorek jako negativní, zatímco metoda Fit Points naopak negativní vzorek jako pozitivní – například při skokovém nárůstu fluorescence v důsledku bubliny v reakční směsi atp.

Veškeré hodnoty C_t uvedené níže textu u vyhodnocení kontrol a v tabulce 6 odpovídají přístroji LightCycler 480 II a metodě maxima druhé derivace. V případě použití jiné metody je pro přesnou interpretaci podle tabulky 6 nutné naměřené hodnoty C_t posunout o rozdíl mezi vámi naměřenou hodnotou C_t pro pozitivní kontrolu provedenou dle instrukcí v kapitole 3.6 (Positive control z vialky č. 4) a referenční hodnotou $C_t = 29$ (pro FAM i HEX kanál), která vychází při použití přístroje Roche LC480 II a metody druhé derivace. Například, pokud vámi naměřená hodnota C_t pro pozitivní kontrolu bude 26, tak pro aplikaci tabulky 6 buď přičtete 3 cykly k hodnotám C_t klinických vzorků, anebo 3 cykly odečtete od prahových C_t v tabulce 6.

** 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.*

*** 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.*

Vyhodnocení kontrol

U pozitivní kontroly musí k amplifikaci dojít ve všech třech kanálech: FAM (cyklus 27-31), HEX (cyklus 27-31) a Cy5 (<35 cyklů, pokud jste přidali Izolační kontrolu). Pokud nedojde k amplifikaci v některém z těchto kanálů, PCR reakce neproběhla správně a výsledky z takové analýzy nejsou platné a musí být zopakovány. Zde uvedené hodnoty C_t jsou pro metodu druhé derivace, kdy referenční hodnota pro FAM i HEX kanál je $C_t = 29$. Při použití metody Fit Points mohou být naměřené hodnoty C_t v závislosti na použitém přístroji až o 3 až 4 cykly nižší.

U negativní kontroly musí k amplifikaci dojít v kanálu Cy5 (<35 cyklů, pokud jste přidali Izolační kontrolu), zatímco v kanálech FAM nebo HEX nesmí být žádná amplifikace. Měřitelná amplifikace ve FAM nebo HEX kanálech ukazuje na kontaminaci reagentů templátovou sekvencí, což může způsobit falešně pozitivní výsledky.



Interpretace výsledků měřených vzorků

Stanovte hodnoty prahového detekčního cyklu (C_t) v každém kanálu a výsledky interpretujte dle tabulky 6 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 6 přepočítat, jak je uvedeno v oddíle Stanovení hodnoty prahového detekčního cyklu výše.

FAM	HEX	Cy5	Interpretace
+ ^[3]	+ ^[3]	+ ^[1] / - ^[2]	COVID-19 pozitivní
-	-	+ ^[1]	Nedetekovatelné (COVID-19 negativní)
-	-	-	Nespolehlivý výsledek: nízký výtěžek izolace RNA nebo inhibice RT-PCR, doporučeno zopakovat izolaci RNA.
$C_t > 30$ ^[3]	-	+ ^[1]	Slabě COVID-19 pozitivní: doporučeno zopakovat RT-PCR (opakovaně pozitivní signál alespoň v jednom kanálu je považován za pozitivní výsledek).
-	$C_t > 30$ ^[3]	+ ^[1]	
$C_t > 30$ ^[3]	-	-	Slabě COVID-19 pozitivní: nízký výtěžek izolace RNA nebo inhibice RT-PCR, doporučeno zopakovat izolaci RNA (opakovaně pozitivní signál alespoň v jednom kanálu je považován za pozitivní výsledek).
-	$C_t > 30$ ^[3]	-	
$C_t < 30$ ^[3]	-	+ ^[1] / - ^[2]	Nespolehlivý výsledek: může ukazovat kontaminaci produktem amplifikace nebo mutaci v jednom z genů, doporučeno zopakovat izolaci RNA, doporučeno zopakovat analýzu s RT-PCR soupravou, která detekuje jiné geny
-	$C_t < 30$ ^[3]	+ ^[1] / - ^[2]	

Tabulka 6: Interpretace výsledků.

+ znamená $C_t < 40$ cyklů^[3] / - znamená $C_t > 40$ cyklů^[3] nebo nedetekovatelný signál

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

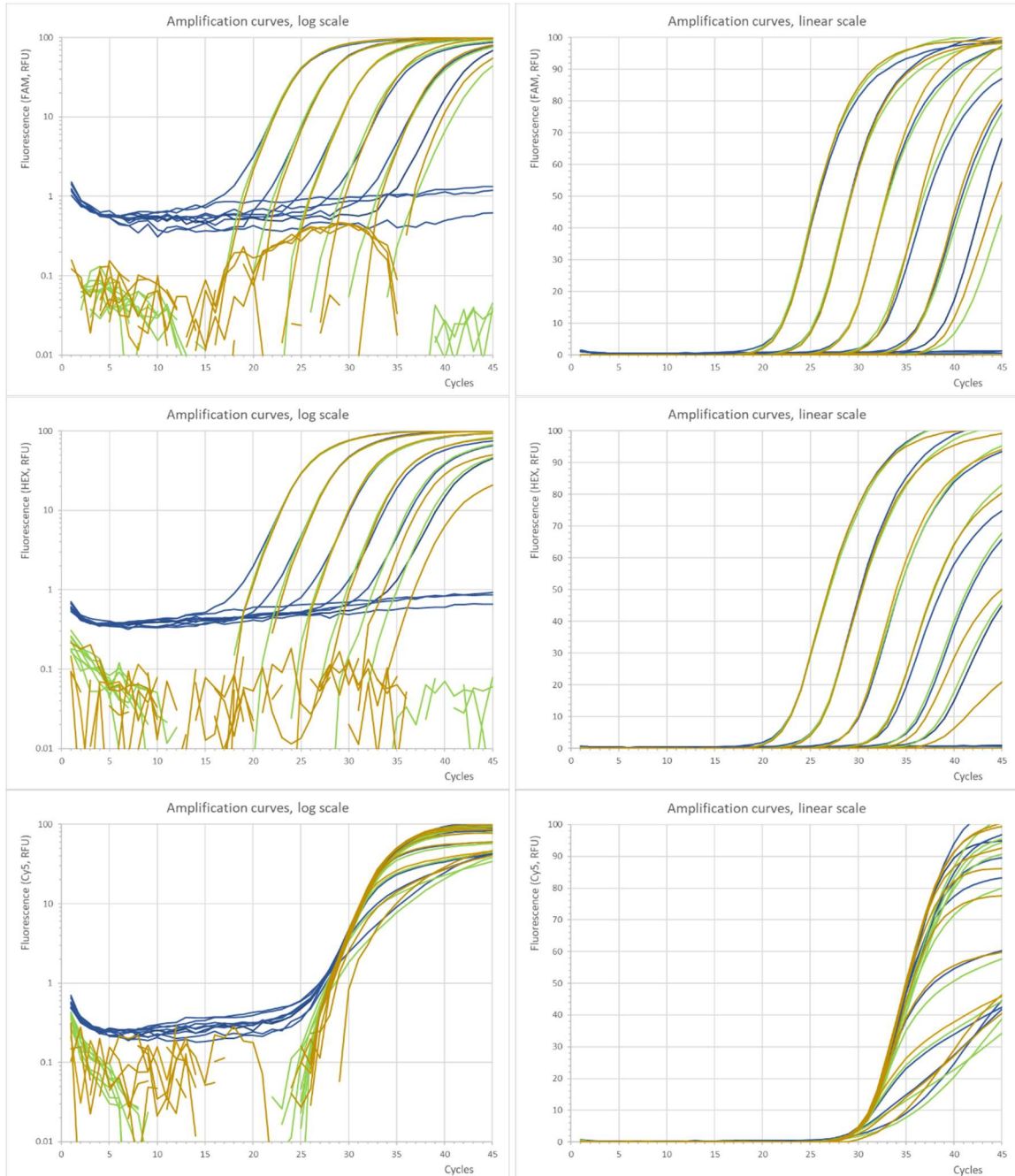
[1] Pokud byla do vzorku přidána kontrola izolace RNA před izolací RNA v množství podle pokynů a byl dodržen standardní protokol izolace (tj. pro RT-PCR bylo použito přibližně 1/10 eluce, např. 5 z 50 μ L), hodnota C_t pro Cy5 by měla být kolem 35. cyklu nebo nižší.

[2] Velmi vysoké koncentrace viru mohou způsobit zhoršení amplifikace kontroly izolace, což se projeví snížením signálu v kanálu Cy5 či jeho úplnou absencí (podrobnosti viz Obrázek 1). Absence signálu Cy5 nemění interpretaci pozitivních signálů v kanálech FAM a HEX.

[3] Hodnoty prahového detekčního cyklu (C_t), které jsou uvedené v této tabulce, jsou založeny na metodě maxima druhé derivace s přístrojem Roche LC 480 II. Naměřené hodnoty se mohou lišit s použitím různých přístrojů a/nebo metod (viz výše).



Typické výsledky



Obrázek 1: 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 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-1205 DIANA Manual RNA Isolation Kit

REF DB-1206 DIANA Automated RNA Isolation Kit



6 Jednostránkový souhrnný protokol

6.1. Složky soupravy

Složky soupravy	Objem (μL)			Skladovací teplota	Popis vialek
	50rxns	100rxns	1000rxns		
Enhancer mix (4x)	250	500	5000	-20 °C	1
Primer mix (4x)	250	500	5000	-20 °C	2
Enzyme mix (4x)	250	500	5000	-20 °C	3
Positive control	25	100	2x 500	-20 °C	4
Isolation control	75	150	2x 750	-20 °C	5

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 5 μL vzorku (izolované RNA), zalepte destičku optickou fólií a co nejdříve spusťte RT-PCR reakci. Pro pozitivní kontrolu přidejte místo vzorku 5 μL Positive control (vialka č. 4).

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
Isolation control (Volitelné*)	5	0.1	10
Celkový objem RT-PCR master mixu		15	1500

* Isolation control (vialka č. 5) přidejte přímo do PCR master mixu pouze pokud nebyla předtím přidána do vzorků před izolací RNA (podrobnosti viz kapitola 3.4).

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 trojité 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

