

## Použití

**Souprava Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR** je určena ke kvalitativní detekci nukleové kyseliny viru SARS-CoV-2 ve vzorcích jedinců, jednak těch s klinickými podezřeními na COVID-19, ale také pro screening jedinců bez známk, příznaků nebo jiných důvodů k předpokladu infekce COVID-19. Výsledky slouží jako diagnostický test k detekci viru SARS-CoV-2 RNA v nosních výtřech, výtřech z krku a slin při podezření na infekci COVID-19.

Pozitivní výsledky svědčí o detekci RNA SARS-CoV-2, ale nemusí představovat přítomnost přenosného viru. Negativní výsledky nevylučují infekci virem SARS-CoV-2 a neměly by sloužit jako jediný podklad pro rozhodnutí o léčbě pacienta. Negativní výsledky musí být kombinovány s klinickým sledováním, anamnézou pacienta a epidemiologickými informacemi.

Souprava je také určena pro kvalitativní stanovení nukleové kyseliny SARS-CoV-2 v poolovaných vzorcích NO/OP stěrů. Tyto pooly mohou být vytvořeny v jedné poolovací nádobě až z pěti individuálních vzorků ve VTM médiu.

Negativní výsledek poolovaného vzorku musí být brán jako orientační a, pokud neodpovídá klinickým projevům a symptomům, nebo je výsledek vyžadován pro řízení léčby jednotlivého pacienta, musí být tyto vzorky změněny také individuálně. Nepřidávejte do poolů vzorky, které byly již dříve otestovány metodou PCR s pozitivním nebo pravděpodobně pozitivním výsledkem. Poolované vzorky musí být retestovány, než jsou vydány jako výsledky individuálního pacienta. Vzorky s nízkou koncentrací SARS-CoV-2 RNA nemusí být detekovány v poolovaných vzorcích kvůli snížené citlivosti měření při poolování.

**Souprava Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR** je určena pro použití pracovníky klinických laboratoří, kteří jsou speciálně proškoleni v technikách real-time PCR a *in vitro* diagnostice.

## Principy stanovení

**Souprava Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR** selektivně amplifikuje dvě genové sekvence viru SARS-CoV-2 přítomné v purifikovaném vzorku nukleové kyseliny, a to za použití primerů selektivních pro genové oblasti viru SARS-CoV-2 nukleokapsidu (N) N1 a RNA dependentní RNA polymerázy závislé na RNA (RdRp). Třetí sada primerů detekuje gen lidské RNázyP, která je přirozeně přítomna ve vzorku a slouží jako endogenní kontrola extrakce.

Během procesu amplifikace hybridizují fluorescenční sondy specifické pro N1, RdRp a lidskou RP na jejich specifické genové cílové sekvence, což má za následek, že DNA polymeráza exonukleoticky štěpí sondu ve směru 5'→3'. To má za následek oddělení fluoroforní barvy (značky) od zřeháda a generování fluorescenčního signálu. S každým PCR cyklem se kumulativní signál zvyšuje. Každá cílová sekvence používá charakteristický fluorofor detekovaný na různých vlnových délkách, který umožňuje současnou detekci a diskriminaci amplifikovaných cílových sekvencí viru SARS-CoV-2 a interní kontroly.

## Dodávaný materiál

Reagencie	Popis	Objem (μl)	Množství
SARS-CoV-2 RT-PCR Mix	Lyofilizovaný RT-PCR master mix obsahující všechny reagencie nezbytné pro amplifikaci	N/A	1 lahvička (50 reakcí)
SARS-CoV-2 Dilution Buffer (Redicí roztok)	Používá se k rekonstituci mixu RT-PCR, slouží jako negativní kontrola a k promíchání pozitivní kontroly	800 μl	1 zkumavka, označena modře
SARS-CoV-2 Positive Control (Pozitivní kontrola)	Zatavený sáček s 1 lahvičkou lyofilizované pozitivní kontroly, která je tvořena syntetickou molekulou RNA obsahující specifické cílové sekvence N1 a RdRp genu viru SARS-CoV-2	N/A (10 kontrolních reakcí)	1 zkumavka, označena červeně

Sadu skladujte při teplotě 15–25 °C na tmavém místě.

Nepoužívejte reagencie po uplynutí doby použitelnosti, nebo pokud jsou zabalené reagencie viditelně poškozené. Po rehydrataci je vhodnější soupravu ihned použít nebo skladovat při teplotě 2–8 °C po dobu nepřekračující 6 hodin. Komponenty soupravy lze alikvotovat a skladovat zamražené při teplotě -20 °C po dobu až 1 měsíce. Po rozmrazení opakovaně nezamrazujte.

## Potřebný materiál/vybavení (které není součástí balení)

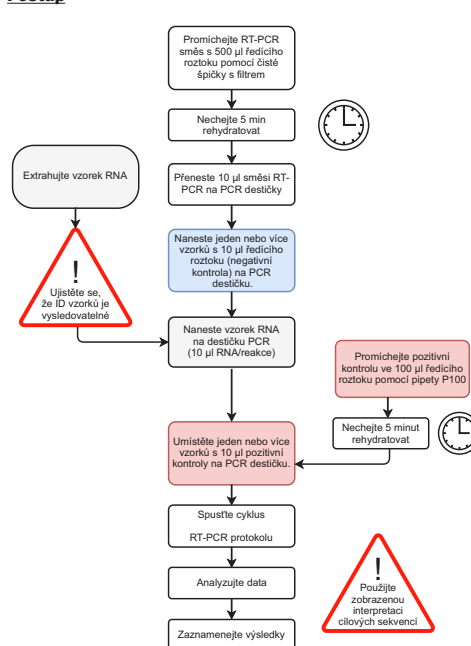
### Extrakce nukleových kyselin

Produkt	Kat. č.	Výrobce
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	52904 nebo 52906	Qiagen
NEBO		
MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit	A42352 nebo A48310	ThermoFisher Scientific
Zybio Nucleic Acid Extraction Kit	A-200 series T-200 series	Zybio Inc
Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen kit	744215.4	Macherey-Nagel
KingFisher™ Duo Prime system KingFisher™ Flex system	5400110 5400630	ThermoFisher Scientific
NEBO		
MagCore® triXact RNA Kit	MRX-01 nebo MRX-03	RBC Bioscience
MagCore® Plus II Automated Nucleic Acid Extractor	MCA1605	RBC Bioscience

## Obecné vybavení

Produkt	Kat. č.	Výrobce
Kalibrované mikropipety (P20, P200, P1000)	-	-
Špičky s filtrem odolné vůči aerosolům	-	-
Kompatibilní 0,2 ml PCR reakční destičky (nebo zkumavky)	-	-
Kompatibilní těsnící fólie na PCR destičky (nebo víčka ke zkumavkám)	-	-
Centrifuga (vzorky slin)	-	-
Jeden z následujících PCR zařízení:		
Přístroje Applied Biosystems 7500, 7500 Fast nebo 7500 Fast Dx Real Time PCR	4351104 4406984 4406985	ThermoFisher Scientific
Počítač se softwarem SDS verze 1.4 nebo novější	-	-
CFX96 / CFX96 Touch / CFX Opus	-	BioRad
Stratagene MX3000/MX3005P	-	Agilent
BMS Mic Real Time PCR cycler	-	Bio Molecular Systems
Qiagen Rotor-Gene Q 5plex / 5plex HRM	9001570 9001580	Qiagen
QuantStudio™ Real-Time PCR systems: 1, 3, 5, 6 pro, 7 pro	A40426 A28567 A28139 A44288 A43162	ThermoFisher Scientific
LightCycler® 480 Instrument 96-well LightCycler® 480 Instrument II 96-well	04 640 268 001 05 015 278 001	Roche

## Postup



## Varování a bezpečnostní opatření

Tento postup by měl provádět pouze odborný laboratorní personál, který je schopen manipulovat s infekčními materiály a je vyškolen k provádění RT-PCR.

Je nutné dbát na správné nastavení podmínek cyklování, detekčních kanálů a datové analýzy PCR přístroje. K rozlišení mezi kanály HEX (RdRp) a ROX (interní kontrola) musí být v případě potřeby PCR přístroj kalibrován (barevná kompenzace). Pokyny lze nalézt v uživatelské příručce k danému PCR přístroji. Výkonostní charakteristiky soupravy byly stanoveny pomocí vzorků RNA izolovaných z umělé obohacených vzorků slin, stěrů z nosohltanu (NP) nebo orofaryngeálních (OP) stěrů odebraných do vhodného transportního média. Vzorky byly získány od pacientů se známkami a příznaky respirační infekce. Pozitivní výsledky svědčí pouze o přítomnosti RNA viru SARS-CoV-2. Některé pozitivní vzorky NP/OP výtřeru ve VTM médiu nemusí být detekovány, pokud jsou nasedány a testovány v poolu.

Stejně jako u jiných diagnostických testovacích procedur je pro zajištění správného fungování nezbytná správná laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké citlivosti tohoto testu je třeba věnovat pozornost správnému skladování a manipulaci s reagencemi a materiály a bez zdroje kontaminace. Je třeba dodržovat následující pokyny:

- Během všech kroků procedury noste laboratorní rukavice bez pudru, ochranné laboratorní pláště a ochrannou oči.
- Se všemi vzorky pacientů je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními, a to za použití správné laboratorní praxe popsané v dokumentu CLSI M29-A4 nebo v místních směrnících o biologické bezpečnosti.
- Pokud dojde k rozliti vzorku, okamžitě místo dezinfikujte 0,5% chlornanem sodným (zředěným domácím bělilem v poměru 1:10) nebo postupujte podle příslušných místních postupů.
- Po manipulaci se vzorky a reagencemi si důkladně umyjte ruce.
- Vždy si prostudujte uživatelské příručky a návody k použití, používejte pouze spotřební materiál PCR specifikovaný výrobcem, protože odchylky mohou ovlivnit výkon testu a platnost výsledku.

## Identifikace nebezpečnosti v souladu s nařízením (ES) č. 1272/2008

Ředicí pufr:

**SARS-CoV-2 Dilution Buffer**

UFI: 6CGW-HW0N-KJ51-TGAT



### Varování

Obsahuje: 2-methyl-2H-isothiazol-3-on

H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci.

P261 Zamezte vdechování par.

P280 Noste ochranné rukavice / ochranný oděv.

P302 + P352 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla.

P333 + P313 Při podráždění kůže nebo výrazce: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření.

## Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici u místního zástupce zákaznické podpory.

### Odběr, manipulace a skladování vzorků

Vzorky by měl odebírat pouze náležitě vyškolený personál. Nevhodný odběr, počet poolovaných vzorků větší než 5, skladování a přeprava vzorků by mohly vést k získání nesprávných (falešných) výsledků.

Pro správný odběr vzorků je třeba postupovat podle pokynů výrobce zařízení pro odběr vzorků. Pro nasofaryngeální (NP) nebo orofaryngeální (OP) vzorky použijte pouze tampony se špičkou z nylonového nebo polyesterového vlákna (Dacron®) určené pro NP nebo OP stěry. Tampony s vlákny z alginátu vápenatého nejsou přijatelné. Nedoporučuje se používat bavlněné tampony. Okamžitě vložte tampony do sterilních zkumavek obsahujících 1–3 ml virového transportního média (VTM). Do sterilní nádoby odeberte přibližně 1 ml vzorku ze slin.

Vzorky mohou být skladovány při 2–8 °C a testovány do 72 hodin po odběru.

Vždy používejte nové špičky a poolovací nádoby při zacházení s individuálními vzorky nebo pooly, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi vzorky.

### Pokyny pro poolování vzorků

Při poolování vzorků VTM stěru zvažte strategii poolování založenou na procentuální míře výskytu COVID-19 pozitivních vzorků ( $P_{\text{individual}}$ ) v populaci za posledních 7–10 dní.

Souprava Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR byla validována pro testování poolů s 5 vzorky, i když je možné testovat i pooly se 4, 3 a 2 vzorky. Na základě Dorfmanovy strategie poolování byly definovány následující hodnoty pro dosažení maximální účinnosti poolování:

$P_{\text{individual}}^*$	Doporučený počet poolovaných vzorků	Účinnost poolování vzorků
5–6%	5	2,35–2,15
7–12%	4	1,99–1,54
13–25%**	3	1,48–1,10

\*Procentuální míra výskytu COVID-19 pozitivních vzorků v populaci za posledních 7–10 dní.  
\*\*Pokud je  $P_{\text{individuál}} > 25\%$ , účinnost poolování je snižena a doporučuje se zvážit testování.

Při poolování vzorků VTM výtěrů označte zkumavku unikátním štítkem tak, aby byla zajištěna dohledatelnost identifikátorů individuálních vzorků, pokud jsou dostupné. Při poolování je třeba zajistit zachování stálého poměru objemů všech vzorků a minimální celkový objem poolovaného vzorku, který je >200 µl (minimální objem 200 µl je požadován pro izolaci nukleové kyseliny). Pro názornost:

Počet vzorků v poolu	Doporučený objem individuálního vzorku (µl)	Celkový objem poolu (µl)	Minimální objem poolu požadovaný pro izolaci nukleové kyseliny
5	50	250	200
4	60	240	200
3	80	240	200
2	120	240	200

Dokud nejsou vyhodnoceny výsledky testu poolovaného vzorku, zajištěte uchování individuálních vzorků při teplotě 2–8 °C, aby bylo v případě potřeby možné provést opakované individuální testování.

#### Extrakce nukleových kyselin

Stanovení soupravy Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR bylo ověřeno pro použití s výše uvedenými soupravami/přístroji. Postupujte podle postupů výrobců s konkrétními níže uvedenými doporučeními pro použití.

Souprava pro extrakci nukleových kyselin	NP/OP výtěr		Supernatant ze slin	
	Objem vzorku (µl)	Eluční objem (µl)	Objem vzorku (µl)	Eluční objem (µl)
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	200	60	200	60
MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit	200	60	200	60
MagCore® triXact RNA Kit	200	60	200	60
Zybio Nucleic Acid Extraction Kit	200	50	200	50
Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen kit	200	100	200	100

#### Příprava reagentů

Souprava Erba MDx by měla být otevřena pouze bezprostředně před použitím. NEOTVÍREJTE ochranný obal s pozitivní kontrolou, dokud nebudou dokončeny všechny kroky pro přípravu destičky PCR.

- Krátce pokleptejte nebo odstředte modrou lahvičku s fedičím pufrém, aby kapalina stekla dolů na dno.
- Sklenuhou lahvičku se lyofilizovaným RT-PCR master mixem resuspendujte pomocí 500 µl fedičeho roztoku.
- Nechejte 5 minut rehydratovat při pokojové teplotě.
- Činidlo pečlivě promíchejte pipetováním. Zabraňte pěnění.
- Po rehydrataci je vhodnější soupravu ihned použít, nebo alikvotovat a zamrazit při teplotě -20 °C po dobu až 1 měsíce.
- Rehydratované komponenty soupravy mohou být před použitím skladovány při teplotě 2–8 °C po dobu nepokračující 6 hodin, poté musí být zamrazeny nebo vyhozeny. Při delším skladování bude citlivost testu klesat.
- Doporučené velikosti zamrazených alikvotů: ≥100 µl SARS-CoV-2 RT-PCR master mix, ≥20 µl pozitivní kontrola.
- Po rozmrazení je nutné alikvoty ihned použít a opětovně je nezamrazovat. Při opakovaném zamrazování a rozmrazení bude citlivost testu klesat.

#### Nastavení RT-PCR reakce

Rozložení destičky/zkumavky PCR se bude lišit v závislosti na počtu analyzovaných vzorků. Každá souprava má dostatečné množství master mixu až pro 50 reakcí (finální reakční objem 20 µl). V každém PCR cyklu by měla být zahrnuta alespoň 1 reakce negativní kontroly (NTC) a pozitivní kontroly (PC).

- Naneste reakční směs RT-PCR na PCR destičku (nebo do PCR 1. zkumavky), 10 µl na jamku, pro celkový počet požadovaných reakcí.
- Pro negativní kontroly přidejte 10 µl fedičeho roztoku do jakékoli vybrané jamky NTC.

#### Přidání vzorku RNA

Abyste nedošlo k přenosu kontaminace, musí se špičky mezi vzorky vyměnit. Při míchání nesmí docházet k pěnění.

- Pipetou promíchejte izolát vzorku RNA a poté přidejte 10 µl do jamky PCR.
- Celou směs promíchejte třikrát pipetováním.
- Vyměňte špičku.
- Opakujte pro všechny vzorky RNA.

#### Příprava pozitivní kontroly

- Otevřete obal s pozitivní kontrolou.
- Přidejte červenou lahvičku s pozitivní kontrolou a přidejte 100 µl fedičeho roztoku.
- Nechejte 5 minut rehydratovat.
- Pozitivní kontrolu krátce promíchejte pipetováním. Zabraňte pěnění.
- Přidejte 10 µl pozitivní kontroly do jakékoli vybrané jamky PC.

Uzavřete destičku/zkumavky PCR těsníci fólií nebo víčky a přeneste je do PCR zařízení.

#### Programování PCR přístroje

Informace o nastavení zařízení pro RT-PCR najdete v uživatelské příručce k přístroji. Poznámka: Podmínky PCR cyklu mezi jednotlivými zařízeními se mohou lišit. Před použitím pečlivě zkontrolujte model zařízení a parametry cyklu.

#### Block-based cykly (ABI7500, Bio-Rad CFX, Stratagene, QuantStudio, LightCycler480)

Plati pouze pro ABI7500: nastavte pasivní referenci na „žádný“. Pasivní reference ROX není vyžadována.

- Zadejte následující amplifikační program.

Metoda			Parametry detekce		
Kroky	Teplota (°C)*	Čas	Název cílové sekvence	Reporter	Zhášeč (Pouze ABI)
Holding RT 1 cyklus	45	10 min	SARS-CoV-2 N1 gen	FAM	NFQ-MGB
	95	3 min			
Cyklování 45 cyklů	95	15 vteřin	SARS-CoV-2 RdRp gen	HEX † (JOE / VIC / Yellow 555)	NFQ-MGB
	60	30 sec**			
			Lidská RNázaP Interní kontrola	ROX	NFQ-MGB

\*Pro všechny kroky cyklování použijte výchozí (100%) rychlost rampování.

\*\*Na konci této fáze musí být provedeno čtení fluorescence. † HEX je doporučeným detekčním kanálem pro detekci RdRp, nicméně kalibrované kanály JOE a VIC poskytují výsledky lišící se do 0,1 Ct a jsou rovněž použitelné.

† HEX je doporučeným detekčním kanálem pro detekci RdRp, nicméně kalibrované kanály VIC, JOE nebo Yellow 555 (Lightcycler) by měly poskytovat výsledky lišící se do 0,1 Ct a měly by být rovněž použitelné. U přístroje LightCycler 480 II je nutné použít soubor pro univerzální barevnou kompenzaci obsahující kalibrační data pro kanály VIC / HEX / Yellow555, nebo je nutné provést vlastní kalibraci specifickou pro kanál HEX. Pokyny lze nalézt v uživatelské příručce k přístroji Roche LightCycler 480. Bez provedení kalibrace nebude možné správně interpretovat interní kontrolu RNaseP v přítomnosti pozitivního RdRp signálu.

- Vložte destičku PCR do přístroje a vyberte **Spustit cyklus**.

#### Rotací cykly (BMS Mic, Qiagen Rotor-Gene Q)

- Zadejte následující amplifikační program.

Metoda			Parametry detekce		
Kroky	Teplota (°C)*	Čas	Název cílové sekvence	Reporter	Kanál
Holding RT 1 cyklus	45	10 min	SARS-CoV-2 N1 gen	FAM	Zelená (470/510nm)
	95	3 min			
Cyklování 45 cyklů	95	15 vteřin	SARS-CoV-2 RdRp gen	HEX	Žlutá (530/555nm)
	64	30 vteřin**			
			Lidská RNázaP Interní kontrola	ROX	Oranžová (585/610nm)

\*Pro všechny kroky cyklování použijte výchozí (100%) rychlost rampování.

\*\*Na konci této fáze musí být provedeno čtení fluorescence.

- Vložte destičku PCR do přístroje a vyberte **Spustit cyklus**.

#### Interpretace výsledků testu a generování zpráv

Pro správné přiřazení hodnot Ct postupujte podle pokynů specifických pro daný přístroj. Všechna amplifikační data by měla být manuálně zkontrolována u všech vzorků, aby se ověřila přítomnost nebo nepřítomnost SARS-CoV-2 pozitivních amplifikačních charakteristik.

Následující informace slouží jako obecné zásady pro správnou interpretaci dat soupravy Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR na přístrojích řady ABI7500.

#### Nastavení hodnot „Threshold values“ a „Baseline“ pro vyhledání amplifikace (ABI7500)

Pro snadnou ruční kontrolu dat na ABI7500 vždy porovnejte amplifikační křivku s podezřením na pozitivní výsledek na SARS-CoV-2 se známou jamkou negativní kontroly (NTC).

- Po dokončení PCR cyklu vyberte okno **Analýza („Analysis“)**.
- Chcete-li zobrazit nezpracovaná data, vyberte kartu **Zobrazení grafu amplifikace („Amplification plot“)**.
- Na kartě **Zobrazit uspořádání destičky („View plate Layout“)** zvýrazněte všechny jamky z daného cyklu. V **grafu zobrazení amplifikace („Amplification Plot graph“)** by se měla objevit data amplifikace ze všech vzorků a detekčních kanálů.
- Na panelu **Možnosti („Options“)** vyberte **Cíl („Target“)** (N1). Ujistěte se, že je zaškrtnuta možnost **Zobrazit prahovou hodnotu („Show Threshold“)** a **Automatická základní linie („Auto Baseline“)**.  
Poznámka: každý detekční kanál musí být analyzován jednotlivě, aby odrážel amplifikační profil každého genového cíle: Cíl 1 = N1 (kanál FAM), Cíl = RdRp (kanál JOE / VIC), Cíl 3 = RNázaP (kanál ROX).
- V **Nastavení vykreslení („Plot Settings“)** zvolte **Typ vykreslení („Plot Type“)** = ΔRn vs Cycle, typ grafu („graph type“) = Log, barva („colour“) = Target.
- Chcete-li nastavit prahovou hodnotu, přetáhněte prahovou lištu do exponenciální fáze a nad jakékoli signály pozadí.
- Klikněte na tlačítko **Opětovná analýza („Reanalyze“)** v pravém horním rohu okna. Křivky amplifikace a hodnoty Ct (uvedené v pravém podokně) musí být ručně zkontrolovány pro každý vzorek.
- Opakujte pro všechny cíle, nastavte prahovou hodnotu pro detekční kanály RdRp a RNázaP, jak je uvedeno výše, a zkontrolujte data pro všechny vzorky.
- U všech genových cílů je amplifikace PCR považována za pozitivní, pokud je Ct ≤40
- Z Hlavní nabídky vyberte **Uložit jako („Save as“)** a analýzu uložte.
- U ostatních PCR systémů (CFX96, MX300 atd.) použijte výchozí automatické přiřazení prahové hodnoty. Ručně zkontrolujte data pro každý vzorek, abyste potvrdili platnost grafu zobrazení amplifikace a výpočtu jakékoli hodnoty Ct.

#### Přiřazení výsledku testu k vzorkům pacientů

Jakmile je vzorek přiřazen pozitivní nebo negativní status amplifikace v každém ze 3 detekčních kanálů, měla by se pro přiřazení statusu SARS-CoV-2 použít následující interpretace výsledků kanálů:

FAM N1 gen	HEX (or JOE / VIC / Yellow555) RdRp gen	ROX IC	Výsledek testu
Pozitivní (Ct ≤40)	Pozitivní (Ct ≤40)	Jakýkoli pozitivní nebo negativní	SARS-CoV-2 POZITIVNÍ
Pozitivní (Ct ≤40)	Negativní		
Negativní	Pozitivní (Ct ≤40)	Pozitivní (Ct ≤40)	SARS-CoV-2 NEGATIVNÍ
Negativní	Negativní		
Negativní	Negativní	Negativní	NEPLATNÝ – OPAKOVAT TEST

#### Kontrola kvality

Dodržujte správnou laboratorní praxi a veškeré místní/národní klinické laboratorní požadavky / směrnice pro kontrolu kvality. Během každého PCR cyklu vždy zahrňte pozitivní a negativní kontrolní reakce.

#### Interní kontrola (IC)

DNA lidského genomu přítomná v klinickém vzorku se používá jako interní kontrola k potvrzení úspěšné extrakce nukleové kyseliny a amplifikace PCR - chrání před falešně negativními výsledky. Selhání detekce genových cílových sekvencí v jakémkoli klinickém vzorku může být způsobeno:

- Špatným odebráním nukleové kyseliny nebo degradací nukleové kyseliny.
- Nedostatečným odebráním buněk během odběru vzorku pacientů.
- Degradací klinického vzorku.
- Nekompatibilitou typů vzorků.
- Nefunkčností reagentie nebo přístroje.

#### Negativní kontrola (NTC)

Reakce NTC (s použitím 10 µl fedičeho roztoku místo vzorku RNA) by neměly generovat pozitivní amplifikační křivky ani v kanálu FAM (N1), ani v JOE/VIC (RdRp). Pokud reakce NTC vykazují pozitivní charakteristiky amplifikační křivky s Ct ≤40, mohlo dojít ke kontaminaci při přenosu. Zrušte běh a znovu otestujte všechny vzorky.

#### Pozitivní kontrola (PC)

Pozitivní kontrola obsahuje syntetickou RNA viru SARS-CoV-2, u které se očekává pozitivní detekce jak v detekčních kanálech N1 (FAM), tak v RdRp (HEX/JOE/VIC/Yellow555), ale žádná v kanálu IC (ROX).

#### Očekávaný výkon externích kontrol obsažených v soupravě

Typ kontroly	Slouží ke stanovení	SARS-CoV-2 N1 gen	SARS-CoV-2 RdRp gen	Lidský RNázaP gen (IC)
Pozitivní kontrola	Selhání reagentie nebo procesu	Pozitivní (Ct ≤40)	Pozitivní (Ct ≤40)	Negativní (Ct >40)
Negativní kontrola	Kontaminace při přenosu	Negativní (Ct >40)	Negativní (Ct >40)	Negativní (Ct >40)

Pozitivní výsledek z IC v NTC **neruší** platnost cyklu.

#### Omezení

- Používejte pouze podporované typy klinických vzorků a spotřební materiál doporučený výrobcem.
- Negativní výsledky nevylučují infekci virem SARS-CoV-2.
- Výsledky testů by neměly sloužit jako jediný podklad pro rozhodnutí o péči či léčbě pacienta.
- Nesprávné shromažďování, skladování nebo testování klinických vzorků může mít za následek

znehodnocení výsledků testu.

**Výkonnostní charakteristiky**
**Analytický LoD (pouze RT-PCR)**

Odhad analytického LoD cílových genů N1 a RdRp testu RT-PCR byl proveden prostřednictvím přístroje ABI7500 s využitím vody pro molekulárně biologické aplikace obohacené o jednotlivé ředění genomové RNA viru SARS-CoV-2<sup>1</sup>, která byla kvantifikována pomocí kapkové digitální PCR (ddPCR™). Série ředění k vyjádření LoD byla testována na soupravě šarže 2027501.

Počet kopií cps/rxn	Potvrzení LoD N1		Potvrzení LoD RdRp	
	Detekovaná opakování	(%) detekce	Detekovaná opakování	(%) detekce
40	24/24	100	24/24	100
20	44/44	100	41/44	93,2
10	44/44	100	38/44	86,4
5	43/44	97,8	19/44	43,2
2.5	19/20	95	9/20	45

Tyto LoD byly potvrzeny na třech samostatných šaržích soupravy.

Číslo šarže		2027501		2025501		2024701	
Cíl	cps/rxn	Opakování pozitivní	Průměrná Ct	Opakování pozitivní	Průměrná Ct	Opakování pozitivní	Průměrná Ct
N1	5	32/32 100%	34,4	31/32 96,9%	35,9	32/32 100%	35,3
RdRp	30	32/32 100%	36,3	32/32 100%	36,3	32/32 100%	36,4

Analytický LoD byl potvrzen také na přístrojích MX3000, CFX96, BMS Mic a Rotor-Gene Q.

**Limit detekce (LoD) (nukleová extrakce a RT-PCR)**
**Výtěr z nosohltanu (NP)**

Inaktivovaný virus SARS-CoV-2 naředěný ve VTM na LoD byl přidán do retrospektivních (zmražených) nasofaryngeálních vzorků, jejichž dřívější PCR výsledek byl negativní na COVID-19. Hodnoty LoD byly u těchto vzorků potvrzeny přidáním 200 a 450 kopií/ml. Vzorky byly extrahovány pomocí soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit. Tyto vzorky byly detekovány pomocí ABI 7500 podle výše popsané metody.

Virus cps/ml	N1			RdRp		
	Detekce	(%) pozitivita	Průměrná Ct	Detekce	(%) pozitivita	Průměrná Ct
200	20 z 20	100	33,70	N/A	N/A	N/A
450	N/A	N/A	N/A	20 z 20	100	36,30

LoD výtěrů z NP byl potvrzen pro 200 kopií viru/ml (cílová sekvence N1), 450 kopií/ml (RdRp) v nasofaryngeálních vzorcích při extrakci pomocí soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit. Výkony souprav MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, Zybko kit, RBC Bioscience MagCore® triXact RNA Kit a Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen kit byly následně validovány a poskytl ekvivalentní výsledky pro LoD.

**Orofaryngeální (OP) výtěr**

Inaktivovaný virus SARS-CoV-2 naředěný ve VTM na LoD byl přidán do retrospektivních (zmražených) orofaryngeálních vzorků, jejichž dřívější PCR výsledek byl negativní na COVID-19. Vzorky byly extrahovány pomocí soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit. Tyto vzorky byly detekovány pomocí ABI 7500 podle výše popsané metody.

Virus cps/ml	N1			RdRp		
	Detekce	(%) pozitivita	Průměrná Ct	Detekce	(%) pozitivita	Průměrná Ct
200	20 z 20	100	35,21	N/A	N/A	N/A
400	N/A	N/A	N/A	17 z 20	85	37,39
450	N/A	N/A	N/A	19 z 20	95	36,66

LoD výtěrů z OP byl potvrzen při 200 kopií viru/ml (cílová sekvence N1), 450 kopií/ml (RdRp) v orofaryngeálních vzorcích při extrakci pomocí soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit. Výkony souprav MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, Zybko kit, RBC Bioscience MagCore® triXact RNA Kit a Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen kit byly následně validovány a poskytl ekvivalentní výsledky pro LoD.

**Vzorky ze slin**

Inaktivovaný virus SARS-CoV-2 ve VTM na LoD byl přidán do vzorků slin odebraných zdravým jedincem s negativním výsledkem testu na virus SARS-CoV-2.

Vzorek byl centrifugován, do supernatantu byl přidán inaktivovaný vir a extrahován pomocí soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit. Tyto vzorky byly detekovány pomocí ABI 7500 podle výše popsané metody.

Virus cps/ml	N1			RdRp		
	Detekce	(%) pozitivita	Průměrná Ct	Detekce	(%) pozitivita	Průměrná Ct
200	20 z 20	100	36,18	N/A	N/A	N/A
400	N/A	N/A	N/A	18 z 20	90	37,46
450	N/A	N/A	N/A	18 z 20	90	37,18
500	N/A	N/A	N/A	19 z 20	95	37,78

LoD byl potvrzen při 200 kopií viru/ml (cílová sekvence N1), 500 kopií/ml (RdRp) ve vzorcích slin extrahovaných pomocí soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit. Výkony souprav MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, Zybko kit, RBC Bioscience MagCore® triXact RNA Kit a Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen kit byly následně validovány a poskytl ekvivalentní výsledky pro LoD.

**Inkluzivita**

Použité primery byly porovnány s publikovanými sekvencemi viru SARS-CoV-2 dostupnými ve veřejně dostupné databázi GenBank® ke dni 24. září 2020.

Byl proveden průzkum úplných genomů viru SARS-CoV-2 o délce 28 000 až 35 000 bází ve virové databázi NCBI<sup>2</sup>. Bylo identifikováno 16811 sekvencí. 16808 sekvencí mělo 100 (%) identitu a 100 (%) základní pokrytí ve srovnání s referenční sekvencí pro alespoň jeden cílový gen.

Tři sekvence se 100% neshodovaly ani v jednom cíli. Neshodné sekvence byly analyzovány (metoda podle Stadhouders, Ralph et al. 2010<sup>3</sup> a bylo zjištěno, že mají dostatečnou afinitu, aby byly pravdě-

podobně detekovány.

Další hledání sekvencího zarovnání oligonukleotidového primeru a sond obsažených v soupravě Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR bylo provedeno pomocí nástrojů pro vyhledávání s použitím dat GISEAD ze dne 25. dubna 2021. V daný moment žádné kmeny Covid nepředstavovaly výzvu pro cílové sekvence N1 nebo RdRp použité v soupravě Erba MDx SARS COV-2 RT-PCR.

**Exkluzivita**

Vybrané primery byly pomocí vyhledávání v BLAST<sup>4</sup> porovnány se sekvencemi vybraných organismů a dalších koronaviřů uloženými v databázi NCBI, které by mohly být přítomny v příslušných vzorcích. Lidská genomová DNA není prokazatelně detekována jako negativní výtěr s přítomnou lidskou DNA a dává negativní výsledky pro SARS-CoV-2.

Taxonomické ID pro BLAST	Detekce?
Adenoviridae (taxid:10508)	Ne
Bacillus anthracis (taxid:1392)	Ne
Bordetella pertussis (taxid:520)	Ne
Candida albicans (taxid:5476)	Ne
Chlamydia pneumoniae (taxid:83558)	Ne
Chlamydia psittaci (taxid:83554)	Ne
Corynebacterium diphtheriae (taxid:1717)	Ne
Coxiella burnetii (taxid:777)	Ne
Lidský enterovirus (taxid:1193974)	Ne
Haemophilus influenzae (taxid:727)	Ne
Lidský metapneumovirus (taxid:162145)	Ne
Chřipkový vir A (taxid:11320)	Ne
Chřipkový vir B (taxid:11520)	Ne
Legionella (taxid:445) kromě L. pneumophila (taxid:446)	Ne
Legionella pneumophila (taxid:446)	Ne
Leptospira (taxid:171)	Ne
Moraxella catarrhalis (taxid:480)	Ne
Mycobacterium tuberculosis (taxid:1773)	Ne
Mycoplasma pneumoniae (taxid:2104)	Ne
Neisseria elongata (taxid:495)	Ne
Neisseria meningitidis (taxid:487)	Ne
Parainfluenza 1–3 (taxid:186938)	Ne
Lidský rubulavirus 4 (taxid:1979161)	Ne
Parechovirus (taxid:138954)	Ne
Pneumocystis jirovecii (taxid:42068)	Ne
Pseudomonas aeruginosa (taxid:287)	Ne
Human orthopneumovirus (taxid:11250)	Ne
Rhinoviruses (taxid:12059)	Ne
Staphylococcus aureus (taxid:1280)	Ne
Staphylococcus epidermidis (taxid:1282)	Ne
Streptococcus pyogenes (taxid:1314)	Ne
Streptococcus pneumoniae (taxid:1313)	Ne
Streptococcus salivarius (taxid:1304)	Ne
Lidský koronavirus 229E	Ne
Lidský koronavirus OC43	Ne
Lidský koronavirus HKU1	Ne
Lidský koronavirus NL63	Ne
Koronavirus SARS	Ne <sup>5</sup>
Koronavirus MERS	Ne

U žádného z těchto organismů se neočekává křížová reaktivita s testem.

**Použité symboly**

Symbol	Význam	Symbol	Význam
	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Teplota skladování
	Číslo šarže		Čtěte návod k použití
	Chránit před slunečním zářením		Nepoužívat opětovně
	Výrobce		Obsah postačuje pro <n> testů
	Katalogové číslo		CE označení shody – IVD je ve shodě se směrnicí 98/79/EC
	Datum expirace		Nepoužívejte, pokud je obal poškozen



**Hodnocení klinické validity**

180 retrospektivních klinických vzorků (zmražené vzorky na -80 °C, kombinace pozitivních SARS-CoV-2 PCR a negativních UTM nebo VTM), bylo testováno pomocí CE-IVD/FDA EUA schválené RT-PCR soupravy jiného výrobce, která byla použita na Erba Molecular (Ely, Cambridge, UK) jako predikát. Všechny vzorky byly znovu extrahovány pomocí soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit podle pokynů výrobce a znovu testovány pomocí RT-PCR soupravy jiného výrobce na přístroji ABI7500 podle pokynů výrobce. U druhého testu od jiného výrobce vykázalo 31 vzorků nesouhlasné výsledky ve srovnání s původním diagnostickým výsledkem a tyto byly ze studie vyřazeny.

39 vzorků bylo potvrzeno jako pozitivních a 110 jako negativních. Tyto vzorky byly poté testovány pomocí soupravy Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR. Výsledky byly následující:

		Hodnocení vzorku	
		Pozitivní	Negativní
Výsledky soupravy Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR	Pozitivní	39	0
	Negativní	0	110
Procentuální shoda pozitivních výsledků	100% (39/39) 90,9–100% C.I. <sup>6</sup>		
Procentuální shoda negativních výsledků	100% (110/110) 96,7–100% C.I.		

**Klinická validita při použití poolu 5 vzorků nasofaryngeálního stěru ve VTM médiu**

45 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků NP stěru identifikovaných retrospektivně pomocí PCR a 35 negativních vzorků NP stěru (zamražených ve VTM při -80 °C) bylo otestováno individuálně, aby byl výsledek ověřen pomocí soupravy Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR.

Z těchto vzorků bylo vybráno 30 pozitivních a 30 negativních a ty byly zahrnuty do poolovací studie. V souladu s instrukcemi FDA pro poolování, 8 pozitivních vzorků bylo vybráno na základě hodnot Ct v rozmezí 2–4 cyklů ( $\approx 1 \log_{10}$ ) od očekávaného LoD soupravy Erba MDx a 22 vzorků poskytovalo hodnoty Ct o >4 cykly vyšší než LoD. 30 pozitivních vzorků bylo následně zaslepeno a randomizováno se 30 negativními NP vzorky a opakovaně otestováno individuálně pomocí CE-IVD/FDA EUA certifikované RT-PCR soupravy a pomocí soupravy Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR. Výsledky byly srovnány.

Zaslepené, randomizované vzorky byly následně spoolovány po 5 vzorcích a doplněny negativními klinickými NP vzorky (50 µl zaslepeného vzorku ve VTM médiu bylo přidáno k 4 x 50 µl negativního vzorku ve VTM médiu). 200 µl každého vzorku bylo izolováno pomocí izolačního kitu ThermoFisher MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit na přístroji KingFisher Duo Prime podle návodu výrobce.

Výsledné eluáty nukleových kyselin byly otestovány pomocí Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR na přístroji CFX OPUS 96 Real-Time PCR System od firmy Bio-Rad podle návodu výrobce. Klinická validity poolovaných vzorků versus individuálních vzorků byla následující:

		Očekávaný status spoolovaného vzorku	
		Pozitivní	Negativní
Výsledky soupravy Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR	Pozitivní	30	0
	Negativní	0	30
Procentuální shoda pozitivních výsledků	100% (30/30)		
Procentuální shoda negativních výsledků	100% (30/30)		

**Interferující látky**

Vzorky slin odebrané od zdravých jedinců s negativním výsledkem na SARS-CoV-2 byly centrifugovány a supernatant byl obohacen inaktivovaným virem SARS-CoV-2 na úrovni 3x LoD, spolu s reprezentativním množstvím interferujících látek očekávaných ve vzorcích slin.

Pro simulované nosní prostředí byl použit inaktivovaný virus SARS-CoV-2 obohacený VTM (spíše než slinami). Byly také testovány negativní vzorky SARS-CoV-2 s interferujícími látkami, aby se posoudila odolnost interní kontroly procesu (cílová sekvence RNázaP). Všechny vzorky byly extrahovány pomocí soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit a detekovány pomocí ABI 7500 podle metody popsané výše.

Látka	Finální koncentrace	Negativní správně	Detekce LoD 3x
Lidská plná krev	2% v/v	1/1	3/3
Albuterol sulfát	830 µg/ml	1/1	3/3
Ultra chloraseptický sprej	1% v/v	1/1	3/3
Mupirocin	10 mg/ml	1/1	3/3
NaCl (jako 0,65% nosní sprej)	0,1% w/v	1/1	3/3
Nosní sprej Vicks Sinex Soother	15% v/v	1/1	3/3
Fenylefrin	0,0075%	1/1	3/3
Zanamivir (GSK)	7,5 mg/ml	1/1	3/3
Tobramycin (Dexamethasone)	0,6 mg/ml	1/1	3/3
Fluticasone Propionate (Flovent atd.)	5 µg/ml	1/1	3/3
Nosní sprej Heel Luffeel nasal spray Bio Pathica	15% v/v	1/1	3/3
Nosní gel NeilMed Nasogel NeilMed	1% w/v	1/1	3/3
Nosní sprej Nasacort spray	10% v/v	1/1	3/3
Mucin (hovězí submaxilární žláza)*	2,5% w/v	1/1	3/3
Simulované nosní prostředí*	100%	1/1	3/3

\*Simulovaná nosní matrice a 2,5% hovězí mucin mohou mít při použití soupravy QIAamp® Viral RNA Mini Kit inhibiční účinek na odběr RNA, což může vést k vyšším hodnotám Ct v závislosti na použitém

**Likvidace**

Nepoužité reagenty ze soupravy, lidské vzorky a uzavřené destičky po amplifikaci zlikvidujte v souladu s místními způsoby likvidace klinického laboratorního odpadu.

Vyvarujte se autoklování použitých PCR destiček.

<sup>1</sup> Genomic RNA from SARS-Related Coronavirus 2, Isolate Italy-INMI1 BEI Resources NR-52498 Lot # 70035261

<sup>2</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#>

<sup>3</sup> The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. The Journal of Molecular Diagnostics: JMD vol. 12,1 (2010): 109-117.

<sup>4</sup> <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>5</sup> Corman, Victor M et al. "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR." Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin vol. 25,3 (2020): 2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

<sup>6</sup> Clopper-Pearson 5% level.