



EliGene® COVID19 Omicron Lite RT

**90088-RT (pro 100 stanovení)****90088-RT-500 (pro 500 stanovení)**

Složení soupravy:

90088-RT (pro 100 stanovení):	90088-RT-500 (pro 500 stanovení):
5 x 300 µl COMiL Mix	5 x 1450 µl COMiL Mix
2 x 55 µl Enzyme Mix	2 x 280 µl Enzyme Mix
2 x 260 µl IC RNA	2 x 1300 µl IC RNA
1 x 150 µl PC COMiL	1 x 150 µl PC COMiL
1 x Návod na použití	1 x Návod na použití

Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

Účel použití

Souprava EliGene® COVID19 Omicron Lite RT Kit je určena pro kvalitativní detekci RNA viru SARS-CoV-2. Současně EliGene® COVID19 Omicron Lite RT umožňuje identifikovat Omicron variantu viru SARS-CoV-2, také označovanou jako B.1.1.529 detekcí specifické mutace E484A.

Princip metody

Tato diagnostická souprava je založena na reverzní transkripci virové RNA SARS-CoV-2 a následné jedнокrokové analýze qPCR. Je použita inovativní směs 4 sad primerů a 4 sond TaqMan smíchaných v COMiL Mixu připraveném k použití. Detekce SARS-CoV-2 se provádí amplifikací dvou nezávislých míst v genu RdRp a genu E (kanál FAM). Jediněčně navržená a vysoce specifická vnitřní kontrola využívá sondu značenou HEX. Zvýšená citlivost a specifita této soupravy je založena na amplifikaci více nezávislých cílů v jediné qPCR reakci. Identifikace Omicron varianty viru SARS-CoV-2 je provedena amplifikací cíleného místa E484A a signál je vizualizován v Cy5 kanálu. Přítomnost varianty Omicron je proto charakterizována přítomností fluorescenčního signálu v kanálech FAM a Cy5 se srovnatelnými hodnotami Cq.

Obecný úvod

Na konci prosince 2019 se ve Wu-chanu v provincii Hubei v Číně vyskytlo ohnisko neznámé choroby zvané pneumonie z neznámé příčiny. Příčinný virus byl pojmenován jako „severe acute respiratory syndrome coronavirus 2“ (**SARS-CoV-2**) a příslušná infekční choroba byla pojmenována jako koronavirová nemoc 2019 (COVID-19). Koronaviry byly objeveny v 60. letech 20. století a byly zařazeny do čeledi Coronaviridae, což je největší rodina řádu Nidovirales. SARS-CoV-2 je obalený sférický virus s jednovláknovou RNA s pozitivní polarizací, který se vyznačuje tím, že z povrchu virionu vyčnívají „spike“ proteiny. Jedná se o obalený virus (obal je lipidová dvojvrstva odvozená od membrány hostitelské buňky) s virovou strukturou tvořenou primárně ze strukturálních proteinů jako je spike protein (S), membránový protein (M), obalový protein (E), nukleokapsidový protein (N) a hemaglutinin-esteráza (HE). Pro replikaci a transkripci se používá komplex multiproteinových replikáz-transkriptáz. Tento komplex obsahuje konzervovaný RdRp protein (RNA-dependentní RNA polymeráza) jako hlavní protein replikázy-transkriptázy pro zpětnou syntézu subgenomických vláken RNA z virové RNA a transkripci molekul subgenomové RNA z odpovídajících mRNA v pozitivním směru. RNA genom koronaviřů je druhým největším ze všech RNA virů, SARS-CoV-2 má velikost 29,9 kilobází.



Varianta Omicron, známá také jako B.1.1.529, byla poprvé hlášena Světové zdravotnické organizaci (WHO) z Jižní Afriky v listopadu 2021. Varianta má neobvykle velký počet mutací a 32 z nich ovlivňuje Spike protein, hlavní antigenní cíl protilátek generovaných infekcemi a mnoha široce podávanými vakcínami (A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, Δ211, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, K4476N, S4476N, S4476N, S4476N, S3475F, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q9694H, L). Mnoho z těchto mutací nebylo pozorováno u jiných kmenů. Varianta se vyznačuje 30 změnami aminokyselin, třemi malými delecemi a jednou malou inzercí ve Spike proteinu ve srovnání s původním virem, z nichž 15 se nachází v doméně vázající receptor (zbytky 319–541). Tato varianta je extrémně nakažlivá a v populaci se velmi rychle šíří. Je však hůře schopna proniknout hluboko do plicní tkáně a možná z tohoto důvodu dochází ke značnému snížení rizika závažných onemocnění vyžadujících hospitalizaci. Extrémně vysoká míra šíření v kombinaci s její schopností vyhnout se dvojité vakcinaci a imunitnímu systému těla však znamená, že celkový počet pacientů vyžadujících nemocniční péči v daném okamžiku stále vyvolává velké obavy.

Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:

Stěry (nosohltan, bukalní),
sliny, sputum, moč

Doporučená izolace NK:

Manuální: **EliGene Viral RNA/DNA FAST Isolation kit** (15 min protokol)
chemagic Viral DNA/RNA Kit (chemagen - PerkinElmer)
QIAamp Virus Spin Kit nebo kity dle doporučení by Qiagen
Vakuum/centrifugace: **EliGene Viral RNA/DNA FAST 96 Vacuum Isolation Kit**
(<40 min/96 vzorkový protokol)

Sérum, plasma

Chemagic Viral DNA/RNA Kit (chemagen - PerkinElmer)
QIAamp Virus Spin Kit nebo kity dle doporučení by Qiagen

Automatická izolace:

ZEPHYRUS Magneto automat (ELISABETH PHARMACON)

Kity dle aktuálního doporučení

chemagic 360 izolační automat (chemagen - PerkinElmer)

chemagic Viral DNA/RNA Kit

chemagic Viral NA/gDNA Kit

QIAcube izolační automat (Qiagen)

Kity dle aktuálního doporučení

EliGene® COVID19 Omicron Lite RT (90088-RT and 90088-RT-500) je určen k primární detekci viru SARS-CoV-2 se současnou genotypizací mutace E484A, charakteristické pro variantu Omicron viru SARS-CoV-2 (B.1.1.529). Sada je doplňkem sad **EliGene® COVID19 BASIC A RT (90077-RT)**, **EliGene® COVID19 BASIC A500 RT (90077-RT-500)**, **EliGene® COVID19 CONFIRM RT (90078-RT)**, **EliGene® COVID19 CONFIRM 500 RT (90078-RT-500)**, **EliGene® COVID19 Triple RIC RT (90079-RT a 90079-RT-500)** a **EliGene® COVID19 UKV RT (90082-RT a 90082-RT-500)**, **EliGene® COVID19 UKV/SAV RT (90083-RT a 90083-RT-500)** a **EliGene® COVID19 Delta RT (90086-RT a 90086-RT-500)**. Interní kontroly všech souprav **EliGene®** pro detekci viru SARS-CoV-2 jsou identické, proto lze RNA izolovanou interní kontrolou ze soupravy **BASIC**, **CONFIRM**, **Triple RIC**, **UKV**, **UKV/SAV** a **Delta** analyzovat pomocí **EliGene® COVID19 Omicron Lite RT** a naopak.

RNA se doporučuje eluovat do vody pro molekulární biologii. Vzhledem ke složení elučních pufrů některých výrobců může dojít k inhibici PCR reakce sloučeninami elučního pufru. Eluční pufr **EliGene virové RNA/DNA FAST izolační soupravy** lze použít bez obav z inhibice PCR, stejně jako eluční pufrы izolačních souprav doporučených výše. Pokud máte v úmyslu použít izolační soupravy od jiných výrobců, musí být k izolaci RNA přidána interní kontrola amplifikace (RNA) obsažená v této soupravě, aby byla vyloučena inhibice elučním pufrém.



Sérum nebo plazma:

Podle standardního postupu odeberte vzorek séra do sterilní zkumavky. Vzorky přepravujte při 4 °C do laboratoře. Vzorky séra jsou za těchto podmínek stabilní maximálně 4 dny. Pro delší skladování zamrazte vzorek na -70 °C.

Doporučujeme použít objem 200 µl séra a eluční objem 50 µl vody PCR. Před izolací musí být ke 200 µl vzorku přidán lyzační roztok a poté 5 µl interní kontroly RNA (IC RNA).

Stěry:

Stěry odebírejte dle standardního protokolu do odběrových zkumavek.

Doporučené odběrové tampony:

Flocked swabs (tampony vyrobené technikou semišování) po provedení stěru vkládat do transportního média pro viry.

Nepoužívejte bavlněné tampony z důvodu možné inhibice PCR reakce. Pro transport nepoužívejte suché tampony!

Vzorky by měly být přepravovány do laboratoře při 4 °C (modrý led). Stěry z oropharyngu i nasopharyngu jsou při 4 °C v transportním médiu pro viry stabilní minimálně 3 dny od odběru vzorků. Pro delší skladování zamrazte vzorek na -70 °C.

Další možností je používání inaktivačních transportních médií. **Každé inaktivační médium musí být validováno pro použitou metodu izolace RNA!**

V případě odběru vzorků do transportního média by mělo být pro izolaci RNA použito 200 µl nebo množství doporučené v návodu k použití použité izolační soupravy. Po přidání lyzačního pufru musí být do 200 µl vzorku použitého k izolaci RNA přidáno 5 µl RNA interní kontroly (IC RNA).

Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Automatické pipety 1-1000 µl a sterilní špičky s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE).
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodný pro daný qPCR přístroj. Vždy používejte pouze originální plasty nebo plasty doporučené výrobcem příslušného systému qPCR. **Použití neoriginálního plastu může vést k potížím s odečtením fluorescence a stanovením prahové hodnoty. Při použití neoriginálních nebo neschválených plastů nemůžeme zaručit správnou interpretaci výsledků.**
- Sterilní stojánek bez DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Zařízení pro qPCR – souprava je určena pro qPCR přístroje LightCycler® 480 (Roche; je nezbytná kompenzace fluorescenčních barev pomocí kitu Elisabeth Pharmacon!!!, objednejte si **EliGene® 4-channel Color Compensation Kit**, (kat. č. **90080-CC**), QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific), Rotor-Gene Q (Qiagen) a CFX96 (Bio-Rad). RT-qPCR pro detekci a genotypizaci RNA SARS-CoV-2 RNA využívá technologii TaqMan (sondy FAM, HEX, Texas Red a Cy5) a lze ji provádět na jiných přístrojích, které mohou pracovat s těmito kanály.
- **Laboratorní ochranné rukavice a respirátory FFP3. Pracujte prosím v příslušných boxech pro biologické nebezpečí. Také odstředování vzorků musí být prováděno v boxech pro biologické nebezpečí. Mějte na paměti, že i virová RNA může způsobit infekci.**
- **Protože se jedná o závažný patogen, dodržujte prosím aktuální doporučení WHO pro laboratoře BSL2+ nebo BSL3.**



Konfigurace qPCR přístroje

- Pro detekci cílových sekvencí SARS-CoV-2 se používají dvě sondy značené FAM (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci Interní kontroly je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm)
- Pro detekci mutace E484A se používá sonda označená Cy5 (exc. 650 nm - em. 670 nm)

LightCycler® 480 (Roche):

Používejte prosím bílé destičky určené pouze pro LightCycler® 480 II. Použití průhledných desek může vést ke snížení citlivosti soupravy. Nepoužívejte destičky opakovaně; během manipulace s deskami může dojít ke kontaminaci vaší laboratoře.

Vytvoření detekčního profilu:

Otevřete „Panel nástrojů“ v „Hlavní nabídce“ (ikona s klíčem) a vyberte „Formáty detekce“. Vyberte detekční formát „Nový“ a přiřadte mu název podle vašeho výběru. V matici excitačních a emisních spekter v pravém horním rohu klikněte na políčka s následujícími kombinacemi:

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time
465	510	FAM	1	10	2
533	580	HEX	1	10	2
618	660	Cy5	1	10	2

V nabídce „Detection format“ zvolte formát který jste vytvořili.

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 - Analysis mode "None", 1 Cycle

55°C 15 min Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

Step 2 - Analysis mode "None", 1 Cycle

95°C 2 min Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

Step 2 - Analysis mode "Quantification", 45 Cycles

95°C 5 s Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

55°C 15 s Ramp rate (2.2°C/s) Acquisition mode "Single"

67°C 15 s Ramp rate (4.4°C/s) Acquisition mode "None"

Step 3 - Analysis mode "None", 1 Cycle

40°C 20 s Ramp rate (2.2°C/s) Acquisition mode "None"

Kompletní teplotní profil může být také nahrán z Run Template "EliGene COVID19 Omicron Lite RT_LC480.ixo". Run Template může být importován do softwaru v menu "Navigator" kliknutím na ikonu "Import" z CD přiloženého v kitu.

QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type, "Presence/Absence", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard". Jako reportér používají barviva FAM (SARS-CoV-2), VIC (IC RNA) a Cy5 (E484A). **Nepoužívejte žádné pasivní referenční barvivo!**

**Nastavte následující teplotní profil:***Udržovací fáze (Holding stage)*

55°C 15 min Ramp rate (1.6°C/s)

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min Ramp rate (1.6°C/s)

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cyklů

95°C 5 s Ramp rate (1.6°C/s)

55°C 15 s Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON

67°C 15 s Ramp rate (1.6°C/s)

Post-Read Stage

40°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s)

Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 55 °C.

Kompletní teplotní profil lze nahrát ze šablony spuštěním "EliGene COVID19 Omicron Lite RT_QS3.edt" nebo "EliGene COVID19 Omicron Lite RT_QS5.edt". Šablonu pro spuštění lze zkopírovat z disku CD, který je součástí sady.

RotorGene Q (Qiagen):

V okně "New Run" vyberte volbu "Three Step"

Vyberte příslušný typ rotoru "Rotor Type" a klikněte na tlačítko "Next".

Nastavte následující teplotní profil:*Udržovací fáze (Holding stage)*

55°C 15 min

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cyklů

95°C 5 s

55°C 15 s Odečet signálu v kanálech (Acquiring in channels) "Green", "Yellow" a "Red"

67°C 15 s

Udržovací fáze (Holding stage)

40°C 20 s

Pro možnost "Gain Optimization" vyberte možnost "Automatic gain optimization before first acquisition". Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene COVID19 Omicron Lite RT_Q-GENE.ret". Šablonu pro spuštění lze zkopírovat z disku CD, který je součástí sady.

CFX96 Touch (Bio-Rad):

V úvodní možnosti "Startup Wizard" založte "New Experiment" a vytvořte nový protokol "Create New Protocol".

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 55°C 15 min

Step 2 95°C 2 min

Step 3 95°C 5 s

Step 4 55°C 15 s + Plate Read



Step 5 67°C 15 s

Step 6 GOTO Step 3 44x

Step 7 40°C 20 s

Doplňte "Sample Volume" na 20 µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 4 při 55 °C.

Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM, HEX a Cy5. Označte pozice s umístěnými vzorky jako „Unknown“ vzorky nebo „Standard“.

MIC PCR (Bio Molecular Systems Pty Ltd):

V Run Setup vytvořte nový Run Profile pro daný přístroj MIC. Zadejte objem vzorku 20 µl a Temperature Control "Fast TAQ (v3)".

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

55°C 15 min

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 2 min

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 45 cyklů

95°C 5 s

55°C 15 s Odečet signálu "Green", "Yellow" a "Red"

67°C 15 s

Udržovací fáze (Holding stage)

40°C 20 s

Příprava reagensí

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagensie zcela rozmražené, krátce promíchané na vortexu a krátce stočené.
- 5 µl interní kontroly RNA (IC RNA) přidávejte až po přidání lyzačního roztoku do vzorku. V žádném případě nepřidávejte interní kontrolu k izolované RNA až těsně před PCR analýzou!

VAROVÁNÍ: Je možná kontaminace v laboratorním prostoru! Používejte samostatnou pipetu pro Master Mixy, samostatnou pipetu pro pozitivní kontroly a samostatnou pipetu pro vzorky! Dodržujte všechna doporučení pro laboratoře provádějící analýzy RNA.

Příprava reakčního mixu

1. Vezměte zkumavku označenou COMiL Mix a Enzyme Mix a rozmrazte při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce odstředte v centrifuze. Připravte Master Mix smícháním 14 µl COMiL Mix a 1 µl Enzyme Mix na reakci a krátce odstředte.

2 Detekce: Přidejte 15 µl Master Mixu do amplifikačních zkumavek nebo destiček a přidejte 5 µl izolovaného vzorku RNA. Při pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili křížové kontaminaci vzorků. Připravený Master Mix by měl být použit do 30 minut a nelze jej znovu použít. Připravený Master Mix nemrazte.



3. Pozitivní kontrola: Napipetujte 15 µl Master Mixu samostatně do amplifikační zkumavky nebo destičky. Poté přidejte 5 µl PC COmiL. Při pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. **K pipetování pozitivních kontrol použijte mikropipetu určenou pouze pro pipetování pozitivních kontrol.**

Vložte mikrozkušavky nebo destičku do qPCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace qPCR přístroje výše.

Odečet výsledků

LightCycler® 480 (Roche):

V nabídce "Sample Editor" zvolte možnost "Abs Quant".

V nabídce "Analysis" zvolte možnost "Abs Quant/2nd Derivative Max".

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (465-510). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2 variantu Omicron: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálech FAM (465-510) a Cy5 (618-660). Hodnota počtu cyklů mezi jednotlivými kanály se nesmí lišit o více než dva cykly.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (533-580).

QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

V nabídce "Analyse Settings" vyberte možnosti "Automatic Threshold" a "Automatic Baseline" a zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2 variantu Omicron: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálech FAM a Cy5. Hodnota počtu cyklů mezi jednotlivými kanály se nesmí lišit o více než dva cykly.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX (VIC) kanálu.

Rotor-Gene Q (Qiagen):

Klikněte v hlavní nabídkové liště na ikonu "Analysis" a vyberte Analýzu "Quantitation". V okně „Quantitation Analysis“ zvolte možnosti "Dynamic Tube" a "Slope Correct". V nabídce "Outlier Removal" nastavte NTC Threshold na 10 %.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (Green). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2 variantu Omicron: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálech FAM (Green) a Cy5 (Red). Hodnota počtu cyklů mezi jednotlivými kanály se nesmí lišit o více než dva cykly.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX (Yellow) kanálu.



CFX96 Touch (Bio-Rad):

V okně "Data Analysis" zvolte možnost "Quantification". V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Setting“ a vyberte „Baseline Subtracted Curve Fit“ a možnost „Apply Fluorescence Drift Correction“.

V okně "Data Analysis" zvolte jeden fluorofor (FAM, HEX, Cy5) kliknutím na políčko vedle názvu fluoroforu pod grafem zesílení a přečtěte si výsledky pro jednotlivé vzorky.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2: V nabídce „Nastavení“ vyberte možnost „Baseline Threshold“ a nastavte „Single Threshold“ na hodnotu „Auto Calculated“. Pozitivní výsledek je charakterizován růstem fluorescenčního signálu v kanálu FAM. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci a detekci signálu.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2 variantu Omicron: Pozitivní výsledek je charakterizován růstem fluorescenčního signálu v kanálech FAM a Cy5. Hodnota počtu cyklů mezi jednotlivými kanály se nesmí lišit o více než dva cykly.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. V nabídce „Settings“ vyberte možnost „Baseline Threshold“ a nastavte "Single Threshold" na nastave na hodnotu „Auto Calculated“. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu.

MIC Cycler (Bio Molecular Systems):

Pro zobrazení a analýzu naměřených dat, klikněte na malý křížek vedle Cyklování v modulu Analýza a poté vyberte cíl – Non-Assay Green (FAM), Non-Assay Yellow (HEX) a Non-Assay Red (Cy5). V pravém dolním rohu zvýšte „Fluorescence Cut-off Level“ na 20 %. Pro každou pozitivní jamku se zobrazí hodnota kvantifikačního cyklu (Cq). Toto je číslo cyklu, při kterém fluorescence vzorku stoupne nad prahovou hodnotu (červená vodorovná čára v dolní části grafu amplifikační křivky). V panelu „Samples“ na pravé straně klikněte na názvy vzorků, chcete-li skrýt nebo zobrazit související amplifikační křivky a výsledky.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (Green). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Pozitivní výsledek pro SARS-CoV-2 variantu Omicron: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálech FAM (Green) a Cy5 (Cy5). Hodnota počtu cyklů mezi jednotlivými kanály se nesmí lišit o více než dva cykly.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX (Yellow) kanálu.

Interpretace výsledků

Negativní výsledek:

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálech FAM a Cy5 před 40. cyklem, s příslušným nastavením baseline hodnoty, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně negativní nebo s koncentrací RNA pod detekčním limitem soupravy (5 genomových RNA/reakcí). Signál pro interní kontrolu (IC RNA) musí být pozitivní (viz kapitola Kontrola kvality).

Tento výsledek nevylučuje přítomnost SARS-CoV-2 ve vzorku, protože výsledky tohoto testu závisí na správném odběru a zpracování vzorku. Výsledky jsou také závislé na adekvátním množství analyzované RNA viru. **Bylo zjištěno, že viry mohou být vylučovány přerušovaně, a dokonce i u infikovaného pacienta může být hladina viru v klinických vzorcích v daných dnech pod detekčním limitem kterékoli metody RT-qPCR. Z tohoto důvodu se doporučuje provést alespoň dvě, ideálně více RT-qPCR vyšetření u jednoho pacienta v průběhu několika dnů.**

Pozitivní výsledek:

Pokud se amplifikační signál v kanálu FAM objeví před cyklem číslo 40 s příslušným nastavením baseline hodnoty, je ve vzorku detekována RNA příslušného viru. Pokud je ve vzorku přítomna varianta Omicron viru SARS-CoV-2,



musí být přítomen amplifikační signál v kanálech FAM a Cy5.

Fluorescenční signál v kanálu FAM je silnější (má vyšší absolutní fluorescenci) než v kanálu Cy5! Je třeba poznamenat, že amplifikační signál pro mutaci E484A v kanálu Cy5 může být nerozeznatelný od pozadí ve slabě pozitivních vzorcích (číslo cyklu vyšší než 30), i když je mutace E484A přítomna. Hodnoty počtu cyklů v obou kanálech FAM a Cy5 musí ležet v rámci rozdílu 2 cyklů, pokud je mutace E484A přítomna!

DŮLEŽITÉ!

Kvůli rychlému vývoji viru SARS-CoV-2 může v budoucnu dojít k nové mutaci a může se změnit definice variant. Doporučujeme uživatelům zkontrolovat nejnovější informace o klasifikaci SARS-CoV-2, aby se zabránilo možné nesprávné klasifikaci viru SARS-CoV-2. Důrazně se doporučuje provést sekvenování vzorků v konkrétním časovém úseku a oblasti (celý genom nebo jen část genomu viru SARS-CoV-2), aby bylo možné přesně identifikovat variantu viru SARS-CoV-2 přítomnou v dané oblasti!

Tato sada pro detekci a genotypizaci viru SARS-CoV-2 je určena pro rutinní screening velkých sad vzorků a neslouží k úplné genotypizaci variant viru SARS-CoV-2. Použití této sady nenahrazuje sekvenování.

Inhibovaný vzorek:

V případě, že v žádném z kanálů, včetně HEX kanálu pro IAC, není pozorováno zvýšení amplifikačního signálu, je třeba analýzu opakovat, nejlépe s nově izolovanými vzorky RNA. Ujistěte se, že eluční pufr neinhibuje reakci qPCR. V tomto případě se doporučuje provést eluci do vody pro molekulární biologii.

Kontrolní postup

Souprava EliGene® COVID19 Omicron Lite RT zahrnuje interní kontrolu (IC RNA). Interní kontrola sleduje kvalitu izolace RNA a detekuje inhibici procesu reverzní transkripce a amplifikace. Interní kontrola musí být přidána přímo do vzorku s lyzačním pufrem před izolací virální RNA. I v případě že nedojde k amplifikaci v kanálech FAM a Cy5, musí být přítomna amplifikace v kanálu HEX (amplifikace interní kontroly) v 32. cyklu nebo nižším.

Kromě toho **hodnoty počtu cyklů všech vzorků podstupujících stejný postup izolace RNA musí mít hodnotu čísla cyklu IAC v kanálu HEX v rozsahu 3 cyklů**. Vyšší fluktuace hodnot počtu cyklů v jednom běhu qPCR naznačuje nestandardní podmínky v izolaci RNA. Tato podmínka se však nevztahuje na vysoce pozitivní vzorky (počet cyklů v kanálu FAM <20).

Referenční materiál:

Ke sledování celého vyšetřovacího procesu zahrnujícího izolaci RNA a detekci qPCR je možné použít referenční virový materiál pozitivní na SARS-CoV-2. Pozitivní komerční materiál není k dispozici. Nepoužívejte umělou RNA nebo DNA ani pozitivní kontroly od jiných výrobců.

Řešení problémů:

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly (IC RNA), může jít o závadu v postupu izolace RNA, nebo použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro qPCR.
2. Pokud je rozsah počtu cyklů interní kontroly amplifikace vyšší než 3 cykly, jedná se o pravděpodobně o nehomogenitu v izolaci RNA, která způsobila částečnou inhibici qPCR. V tomto případě je třeba zvážit opakování izolace RNA. Další možností je dvakrát nebo případně i vícekrát zředit izolovanou RNA.
3. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro qPCR. Dále se může jednat o nedodržení doporučeného postupu při přípravě a vyhodnocení vzorku.



Funkční charakteristiky

Analytické funkční charakteristiky:

Analytická citlivost soupravy EliGene® COVID19 Omicron Lite RT definovaná jako nejnižší počet kopií genomové RNA přítomných v amplifikační reakci, kterou lze úspěšně amplifikovat ve 3 nezávislých opakováních, je 5 genomových RNA SARS-CoV-2 přidávaných do Master Mixu. Citlivost postupu RT-qPCR závisí na metodě izolace RNA. Citlivost metody byla ověřena následovně. Byly připraveny série ředění pozitivní kontroly známé koncentrace. Byly testovány třikrát. Detekce SARS-CoV-2 byla 100% úspěšná ve všech vzorcích, které obsahují 5 nebo 50 a více RNA v Master Mixu.

Analytická citlivost je 5 kopií SARS-CoV-2 virových RNA v reakčním Mixu.

Analytická specifita metody je 100%. Všechny primery a sondy byly převzaty z odborné literatury a/nebo schváleny úřady jako WHO, CDC nebo ECDC. Kromě toho byla analytická specifita metody analyzována porovnáním sekvencí primerů a sond se všemi známými sekvencemi RNA a DNA v databázi GenBank a nebyla nalezena žádná křížová reakce. Nebyla nalezena žádná křížová reakce s lidským genomem.

Klinická specifita a senzitivita byla testována na celkem 700 klinických vzorcích, z toho 600 vzorcích SARS-CoV-2 (z toho 500x varianta Omicron). Jako vzorky referenčního materiálu byla použita kombinace orofaryngeálních a nasofaryngeálních výtěrů. Vzorky byly nezávisle testovány referenční metodou soupravou EliGene® COVID19 Triple RIC RT. Přítomnost specifické mutace E484A ve spike proteinu byla analyzována NGS sekvenováním všech pozitivních vzorků, které měly dostatečnou koncentraci RNA.

Senzitivita a specifita detekce SARS-CoV-2

A = 600 Skutečně pozitivní	B = 0 Falešně pozitivní
C = 0 Falešně negativní	D = 100 Skutečně negativní

$$\text{Senzitivita} = A/(A+C) = 600/(600+0) = 100\%$$

$$\text{Specifita} = D/(D+B) = 100/(100+0) = 100\%$$

Klinická specifita a senzitivita soupravy EliGene® COVID19 Omicron Lite RT je 100%.

Ve srovnání se vzorky sekvenovanými metodou NGS souprava vykazala 100% specifitu pro mutaci E484A při minimálním Ct 30.

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci 5×10^1 – 5×10^8 virových RNA molekul v reakční směsi.

Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality se používá interní kontrola (IC RNA) pro kontrolu procesu izolace RNA, reverzní transkripce a amplifikace DNA. Používá se pozitivní kontrola pro funkční kontrolu Master Mixu a jako referenční vzorek.



Limitace testovacího postupu

Senzitivita soupravy závisí na manipulaci se vzorkem (izolace RNA). Důrazně se doporučuje používat izolační sady a postupy doporučené v této příručce.

Negativní výsledek nevylučuje výskyt virové infekce. Výsledky tohoto testu závisí na správném odběru a zpracování vzorku. Výsledky jsou také závislé na dostatečném množství analyzované RNA. Přítomnost viru v klinických vzorcích infikovaných osob závisí na fázi infekce a může být přerušovaná. Konečný závěr k diagnostice a léčbě pacientů musí dát ošetřující lékař.

Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné pro tuto soupravu.

Upozornění

Po smíchání je Master Mix stabilní po dobu 30 minut.

Nezamrazujte zkumavky s Master mixem opakovaně!

Nemíchejte komponenty kitů různých šarží.

Obecná varování a bezpečnostní opatření

Tato souprava je určena pouze pro použití in vitro.

- Laboratorní ochranné rukavice a respirátory FFP3 jsou nezbytné pro práci. Pracujte prosím v příslušných Biohazard boxech. Také odstředování vzorků musí být prováděno v Biohazard boxech. Mějte na paměti, že i virová RNA může způsobit infekci.
- SARS-CoV-2 je velmi nebezpečný patogen, dodržujte aktuální nařízení a doporučení WHO pro laboratoře BSL2+ nebo BSL3!
- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů.
- Všechny centrifugy, mini centrifugy a vortexy používejte pouze v Biohazard boxu, abyste zabránili kontaminaci aerosolem.
- Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být dekontaminován 3 % chlornanem sodným po dobu nejméně 30 minut anebo autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut před umístěním do odpadu.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Všechny použité pomůcky, špičky a pracovní materiály a oděvy považujte za potencionálně infekční a zlikvidujte podle platných předpisů a doporučení pro manipulaci s vysoce infekčním odpadem.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Pracujte ve standardním režimu oddělených místností: izolace, PCR set up, amplifikace, detekce
- Před započatím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.



- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagenty poskytované v rámci kitu a reagenty doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagenty z různých šarží!
- Nepoužívejte reagenty ze souprav jiných výrobců!
- Neměňte doporučené protokoly PCR analýzy!

Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro RNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagenty by mělo být pracováno v PCR boxu. Připravujte reagenty určené pro amplifikaci odděleně. Automatické pipety užívané pro práci s reagenty musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty po amplifikaci je třeba zacházet maximálně opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků. Automatické pipety užívané pro práci s PCR produkty musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

Zkumavky obsahující COmiL Mix a Enzyme Mix jsou jednorázové, a proto je nutné je použít při přípravě reakční směsi pouze jednou

Mixy obsahují následující bezpečnostní upozornění (P):

P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít

P281 Podle potřeby používejte osobní ochranné prostředky.

Zkumavky obsahující IC RNA jsou jednorázové, a proto se musí použít pouze jednou při přípravě reakční směsi.

V případě jakýchkoliv problémů se obraťte na zákaznické centrum společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Literatura

He F, Deng Y, Li W. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): What we know? J Med Virol. 2020 Mar 14. doi: 10.1002/jmv.25766.

Khan S, Siddique R, Shereen MA, Ali A, Liu J, Bai Q, Bashir N, Xue M. The emergence of a novel coronavirus (SARS-CoV-2), their biology and therapeutic options. J Clin Microbiol. 2020 Mar 11. pii: JCM.00187-20. doi: 10.1128/JCM.00187-20.



Ashour HM, Elkhatib WF, Rahman MM, Elshabrawy HA. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. Pathogens. 2020 Mar 4;9(3). pii: E186. doi: 10.3390/pathogens9030186.

Symbols



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci)



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98/79/EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol s r.o.

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká Republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: info@elisabeth.cz