

## Diagnostický kit vDetect COVID-19 RT-qPCR

500 reakcií

### Podrobný návod na použitie

Ver. 1.0 (sk), 05/2020

 **UPOZORNENIE!**

- Tento kit je určený na *in vitro* diagnostické účely.

## Obsah

<b>Návod na použitie</b> .....	<b>1</b>
1. Vysvetlivky a skratky .....	3
2. Účel použitia.....	3
3. Princíp testu .....	3
4. Zloženie kitu .....	4
5. Skladovanie a doba použiteľnosti: .....	4
6. Spotrebný materiál a zariadenia, ktoré nie sú súčasťou kitu.....	5
7. Pracovný postup .....	5
Odber vzorky a extrakcia RNA.....	6
RT-qPCR.....	6
Príprava pracovného priestoru .....	7
Príprava reagensí.....	7
Príprava reakčnej zmesi .....	8
Príprava platničky a kontroly.....	8
Nastavenia real-time PCR prístroja .....	9
Analýza získaných údajov .....	10
8. Interpretácia výsledkov.....	10
Kontrola kvality (výsledky kontrolných reakcií) .....	10
Pozitívny výsledok.....	11
Negatívny výsledok .....	11
9. Funkčné charakteristiky .....	11
Detekčný limit kitu .....	11
Špecifická kitu .....	12
Klinické hodnotenie výkonu.....	13
10. Nakladanie s odpadom .....	14
11. Riešenie problémov .....	14
12. Referencie .....	14
13. Nehody, Poruchy, Zlyhania Zdravotníckych Pomôcok (NPZ ZP) .....	14
14. Použité symboly a označenia .....	15

## 1. Vysvetlivky a skratky

baseline – základná fluorescencia pozadia alebo tzv. "šum"

BHQ-1 – nefluorescenčný zhášač pre reportérovú fluorescenčnú značku FAM (skratka z angl. Black Hole Quencher-1)

BSL – úroveň biologickej bezpečnosti (skratka z angl. biosafety level)

COVID-19 – ochorenie spôsobené vírusom SARS-CoV-2 (skratka z angl. COronaVirus Disease 2019)

C<sub>T</sub> – prahový cyklus, cyklus v ktorom fluorescenčný signál reakcie prekročí nastavenú prahovú hodnotu fluorescencie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FAM – fluorescenčné farbivo 6-karboxyfluoresceín

gén E – gén kódujúci malý membránový obalový proteín vírusu SARS-CoV-2 (označenie E pochádza zo skratky z angl. envelope)

gén RdRP – gén kódujúci RNA dependentnú RNA polymerázu vírusu SARS-CoV-2

NTC – kontrola bez templátu (skratka z angl. Non Template Control)

PC – pozitívna kontrola (skratka z angl. Positive Control)

PCR – polymerázová reťazová reakcia (skratka z angl. Polymerase Chain Reaction)

qPCR – kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (skratka z angl. Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RNA – ribonukleová kyselina

ROX – fluorescenčné farbivo karboxy-X-rodamín

RT-qPCR – kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou

SARS-CoV-2 – koronavírus 2 ťažkého akútneho respiračného syndrómu (skratka z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome COronaVirus 2)

threshold – prahová hodnota fluorescencie

## 2. Účel použitia

Diagnostický kit **vDetect COVID-19 RT-qPCR** je kvalitatívny *in vitro* test určený na detekciu prítomnosti genetického materiálu koronavírusu SARS-CoV-2 vo vzorkách biologického materiálu získaného primárne z horných dýchacích ciest človeka (nosa a nosohltanu) pomocou metódy RT-qPCR. Kit je určený výhradne na použitie v diagnostickom laboratóriu so zodpovedajúcim vybavením, bezpečnostným štandardom a náležite vyškoleným personálom. Cieľovou skupinou, pre ktorú je kit **vDetect COVID-19 RT-qPCR** určený, sú osoby s podozrením na ochorenie COVID-19, prípadne osoby, ktoré boli v kontakte s osobami nakazenými vírusom SARS-CoV-2, ďalej osoby, u ktorých bolo testovanie nariadené alebo osoby, ktoré sa rozhodli podstúpiť testovanie dobrovoľne.

Diagnostický kit **vDetect COVID-19 RT-qPCR** bol vytvorený v rámci neziskovej iniciatívy s finančnou podporou firmy ESET, spol. s r.o.

## 3. Princíp testu

Diagnostický kit **vDetect COVID-19 RT-qPCR** je založený na princípe reverznej transkripcie RNA vírusu SARS-CoV-2 a následnej qPCR analýze v rámci jednej skúmavky. V kite sa využívajú dva sety primerov a TaqMan prób. Jeden set je určený na špecifickú detekciu vírusového génu E a druhý na špecifickú detekciu vírusového génu RdRP. Obe TaqMan próby sú značené reportérovou fluorescenčnou značkou FAM na 5' konci a zhášačom BHQ-1 na 3' konci. Stanovenie prítomnosti dvoch špecifických cieľových sekvencií vírusu zvyšuje špecifickosť a spoľahlivosť kitu. Kit obsahuje

pozitívnu kontrolu vo forme vírusovej RNA na overenie správneho priebehu testov a funkčnosti jeho komponentov. Kit obsahuje pasívne referenčné fluorescenčné farbivo ROX, ktoré slúži na normalizáciu fluorescenčného signálu.

 **UPOZORNENIA!**

- Pred začiatkom práce si prečítajte všetky inštrukcie v tomto návode na použitie.
- Nikdy nepoužívajte naraz oba sety primerov a TaqMan prób v jednej reakcii.

 **VAROVANIE!**

SARS-CoV-2 je nebezpečný patogén, dodržujte preto všetky platné nariadenia a odporúčania pre laboratóriá triedy BSL2+ alebo BSL3.

#### 4. Zloženie kitu

- 1x lyofilizát zmesi primerov a próby SARS-CoV-2\_E (lyofilizát je nutné rozpustiť v 1 ml vody určenej pre PCR)
- 1x lyofilizát zmesi primerov a próby SARS-CoV-2\_RdRP (lyofilizát je nutné rozpustiť v 1 ml vody určenej pre PCR)
- 1x 5 ml 1Step RT qPCR Probe ROX L Mix, 2X
- 1x 1 ml RT3 Mix, 20X
- 1x 5 ml PCR Water
- 1x 500 µl PC SARS-CoV-2 BMC5 (koncentrácia ~200 kópií/µl)
- 1x Návod na použitie

#### 5. Skladovanie a doba použiteľnosti:

Všetky zložky kitu sa musia vždy prepravovať a skladovať pri -20 °C v tme. Doba použiteľnosti kitu je maximálne 12 mesiacov od dátumu výroby. Presná doba expirácie kitu je uvedená na vonkajšom obale. Presná doba expirácie jednotlivých zložiek kitu je uvedená na vnútorných obaloch.

 **VAROVANIE!**

Kit nepoužívajte po uplynutí doby expirácie, ktorá je uvedená na vonkajšom aj vnútornom obale.

Kit a jeho jednotlivé zložky sú určené na uskutočnenie 500 reakcií.

Užívateľom, ktorí uskutočňujú menší počet reakcií v rámci jedného pracovného cyklu, odporúčame všetky zložky kitu rozaliquotovať v súlade s interne zaužívanými postupmi a štandardným počtom reakcií na jeden pracovný cyklus. Alikvotovanie zložiek kitu minimalizuje potrebu opakovaného otvárania jednotlivých skúmaviek a tým minimalizuje riziko kontaminácie zložiek kitu. Alikvotovanie zložiek kitu taktiež zabráni opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu jednotlivých zložiek, ktoré môže viesť k zníženiu účinnosti. Pred alikvotovaním je nevyhnutné jednotlivé zložky kitu úplne rozmraziť. Rozmrazenie je optimálne uskutočniť šetrne, inkubáciou v chladničke (pri teplote +4 °C) po dobu približne 2 hodiny. Tesne pred uskutočnením alikvotovania je nevyhnutné obsah skúmaviek dôkladne ale zároveň opatrne premiešať, vyvarujúc sa vzniku bublín, kým nebude úplne homogénny. V prípade skúmaviek obsahujúcich enzýmy (1Step RT qPCR Probe ROX L Mix, 2X a RT3 Mix, 20X) odporúčame miešanie uskutočniť mnohonásobným otočením skúmavky, pulzným vortexovaním, prípadne krátkym vortexovaním nie dlhším ako 5 sekúnd.

 **VAROVANIE!**

Zložka RT3 Mix, 20X sa nesmie prepravovať ani skladovať pri teplote nižšej ako -20 °C. Pri teplote -20 °C je daná zložka stále v tekutom stave, zamrzá až pri teplote -26 °C. Opakované vystavenie danej zložky teplote nižšej ako -26 °C, teda opakované zmrazovanie a rozmrazovanie danej zložky znižuje jej účinnosť. Rovnaký efekt má aj preprava RT3 Mixu na suchom ľade, ktorý má teplotu -78,5 °C. Preto nikdy neprepravujte vDetect COVID-19 RT-qPCR kit, najmä jej zložku RT3 Mix, na suchom ľade.

 **UPOZORNENIA!**

- Používajte vhodné ochranné oblečenie, rukavice a ochranu očí a tváre.
- Nikdy nepipetujte ústami.
- V laboratóriu nikdy nekonzumujte potraviny ani nepite, nefajčite a nepoužívajte žiadnu kozmetiku.
- Po manipulácii so vzorkami a reagensiami si vždy dôkladne umyte ruky.

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

- Real-time PCR zariadenie; diagnostický kit vDetect COVID-19 RT-qPCR bol validovaný a testovaný na zariadeniach Agilent - Mx3005P®, Thermo Fisher Scientific - QuantStudio™5, Bio-Rad - CFX96™
- Box s laminárnym prúdením vzduchu
- Vortex
- Mini centrifúga
- Centrifúga s rotorom na platničky
- Ochranné pracovné pomôcky: jednorazové laboratórne rukavice bez púdrov, ochranné okuliare, ochranný štít, respirátor FFP3, ochranné oblečenie
- Laboratórny plast bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz: reagenčné skúmavky, PCR skúmavky, PCR stripy, PCR platničky, PCR fólie, sterilné pipetové špičky s filtrom
- Autoklávovateľné nastaviteľné mikropipety
- Nádoba na biologický odpad
- Autoklávovateľné stojany na skúmavky

## 7. Pracovný postup

 **VAROVANIE!**

Prácu s kitom musí vykonávať kvalifikovaný personál.

 **UPOZORNENIA!**

Pracovné priestory musia byť zabezpečené tak, aby existovali oddelené miestnosti (zóny) určené na izoláciu nukleových kyselín, na prípravu amplifikačných reakcií a na samotnú amplifikáciu/detekciu amplifikačných produktov. Produkty amplifikácie sa nikdy nesmú dostať do miestnosti (zóny) určenej na izoláciu nukleových kyselín alebo na prípravu amplifikačných zmesí.

Používajte laboratórne plášte, rukavice a všetky ostatné ochranné pracovné pomôcky výlučne buď na izoláciu nukleových kyselín alebo na prípravu amplifikačných reakcií alebo na samotnú amplifikáciu/detekciu amplifikačných produktov. Nikdy nepoužívajte tie isté laboratórne plášte, rukavice či pomôcky v rôznych miestnostiach (zónach).

So všetkými biologickými vzorkami manipulujte vždy ako s potenciálne infekčným materiálom. Vyhýbajte sa priamemu kontaktu s biologickým materiálom. Zabráňte rozliatiu vzoriek, reagensí a tvorbe aerosólov. Postupujte presne podľa priloženého návodu na použitie.

## Odber vzorky a extrakcia RNA

Nevhodný postup pri odbere, preprave a skladovaní vzoriek a tiež pri extrakcii RNA môže spôsobiť nesprávny výsledok testovania.

Pri odbere vzorky je nutné použiť sterilné výterové tyčinky s plastovou alebo hliníkovou tyčinkou a syntetickým tampónom. Nesmú byť použité výterové tyčinky s drevenou tyčinkou a/alebo bavlneným tampónom.

Extrakcia RNA z odobratých vzoriek by sa mala uskutočniť v čo najkratšom čase po odbere. V prípade potreby krátkodobého uskladnenia vzoriek, s trvaním do 12 h po odbere, uskladnite vzorky pri teplote +4 °C. V prípade potreby dlhodobého uskladnenia vzoriek uskladnite vzorky pri teplote -70 °C. Vyhnite sa opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu vzoriek.

Pri extrakcii RNA postupujte podľa návodu výrobcu použitého extrakčného kitu. Kit vDetect COVID-19 RT-qPCR bol validovaný a testovaný na vzorkách RNA získaných použitím extrakčných kitov:

- Zymo Research, Quick-RNA Viral 96 Kit
- Cytiva (predtým GE Healthcare Life Sciences), RNASpin 96 Kit.

### **VAROVANIE!**

Pri práci používajte vždy ochranné pracovné pomôcky a ochranné oblečenie; pracujte vždy v boxoch s laminárnym prúdením vzduchu. Vzorky centrifugujte v boxoch s laminárnym prúdením vzduchu. Aj vírusová RNA môže spôsobiť infekciu, preto dbajte na bezpečnosť a vždy s ňou manipulujte ako s potenciálne infekčným materiálom.

### **UPOZORNENIA!**

- Analyzované vzorky musia byť určené na tento typ analýzy; od začiatku s nimi manipulujte tak, aby ste predišli novej kontaminácii, degradácii nukleových kyselín atď. Vzorky spracovávajú v boxe s laminárnym prúdením vzduchu. Rôzne vzorky neotvárajte v tom istom čase. Na manipuláciu so vzorkami používajte pipety určené výlučne na tento účel. Používajte jednorázové špičky s filtrom. Používané špičky musia byť sterilné a bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz.
- Všetky centrifúgy, mini centrifúgy a vortexy používajte výlučne v boxoch s laminárnym prúdením vzduchu, zabránite tak kontaminácii prostredníctvom aerosólov.

## RT-qPCR

V rámci pracovného postupu vDetect COVID-19 RT-qPCR kitu je prvým, skriningovým testom stanovenie prítomnosti vírusovej RNA pre gén E. Stanovenie prítomnosti vírusovej RNA pre gén RdRP je druhým, konfirmačným testom. Konfirmačný test slúži na potvrdenie výsledku z vyšetrenia prítomnosti vírusovej RNA pre gén E v prípade jeho pozitivity.

## Príprava pracovného priestoru

Pred začatím práce vyčistíte pracovný priestor laminárneho boxu a príslušné povrchy najprv 10% roztokom chlórnanu sodného (bielidlo), potom 70% roztokom etanolu. Pred prácou aj po práci v laminárnom boxe spustíte UV dekontaminačný cyklus.

## Príprava reagensí

Vyberte potrebné zložky kitu z mrazničky, vložte ich do vychladeného chladiaceho stojana na skúmavky a nechajte ich úplne rozmraziť, prípadne zložky kitu nechajte rozmraziť v chladničke (pri teplote +4 °C). Akonáhle sú zložky úplne rozmrazené, ich obsah dôkladne ale zároveň jemne premiešajte, kým nebude úplne homogénny. V prípade skúmaviek obsahujúcich enzýmy (1Step RT qPCR Probe ROX L Mix, 2X a RT3 Mix, 20X) odporúčame miešanie uskutočniť mnohonásobným otočením skúmavky, pulzným vortexovaním, prípadne krátkym vortexovaním nie dlhším ako 5 sekúnd. Následne skúmavky krátko odstredte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka a všetka tekutina bola na dne skúmaviek.

Zmesi primerov a TaqMan prôb označené SARS-CoV-2\_E a SARS-CoV-2\_RdRP sú kvôli zvýšeniu stability dodávané v lyofilizovanej podobe. Pri prvom použití kitu je preto nutné zmesi primerov a prôb rozpustiť vo vode určenej pre PCR. Do oboch skúmaviek (SARS-CoV-2\_E a SARS-CoV-2\_RdRP) pridajte 1000 µl vody zo skúmavky PCR Water. Obsah skúmaviek dôkladne homogenizujte vortexovaním. Následne skúmavky krátko odstredte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka a všetka tekutina bola na dne skúmaviek.

Reakčnú zmes pripravte v čo možno najkratšom čase po premiešaní obsahu jednotlivých zložiek kitu. V prípade potreby obsah skúmaviek premiešajte ešte raz tesne pred prípravou reakčnej zmesi.

Po použití vráťte všetky zložky kitu do mrazničky (na teplotu -20 °C). Vyhnite sa opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu zložiek kitu. V prípade plánovaného opätovného použitia v priebehu časového rozpätia kratšieho ako 2 hodiny, uskladnite zložky kitu pri teplote +4 °C.

### **VAROVANIE!**

S reagensiami manipulujte vždy v boxe s laminárnym prúdením vzduchu. Reagencie určené na amplifikáciu pripravujte vždy oddelene, naraz pripravujte reagencie výlučne pre jednu analýzu. Na prípravu reagensí používajte pipety určené výlučne na tento účel. Používajte jednorázové špičky s filtrom. Používané špičky musia byť sterilné a bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz.

### **UPOZORNENIA!**

- Používajte iba reagencie nachádzajúce sa v tomto kite a reagencie odporúčané výrobcom.
- Nekombinujte a nezmiešavajte reagencie z rôznych šarží.
- Nekombinujte reagencie z kitov od rôznych výrobcov.

## Príprava reakčnej zmesi

Odporúčaný celkový objem jednej reakcie je 20 µl. Pre prípravu reakčnej zmesi treba jednotlivé zložky kitu zmiešať v nasledujúcej postupnosti a pomere:

Reakčná zmes pre detekciu E génu	
Zložky kitu	Objem zložky na 1 reakciu
1Step RT qPCR Probe ROX L Mix, 2X	10 µl
RT3 Mix, 20X	2 µl
SARS-CoV-2_E	2 µl
PCR Water	1 µl
<b>Spolu</b>	<b>15 µl</b>

Reakčná zmes pre detekciu RdRP génu	
Zložky kitu	Objem zložky na 1 reakciu
1Step RT qPCR Probe ROX L Mix, 2X	10 µl
RT3 Mix, 20X	2 µl
SARS-CoV-2_RdRP	2 µl
PCR Water	1 µl
<b>Spolu</b>	<b>15 µl</b>

Tabuľka vypočítaných objemov na daný počet reakcií:

Zložky kitu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	96
1Step RT qPCR Probe ROX L Mix, 2X	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	70 µl	80 µl	90 µl	100 µl	960 µl
RT3 Mix, 20X	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl	12 µl	14 µl	16 µl	18 µl	20 µl	200 µl
SARS-CoV-2_E alebo SARS-CoV-2_RdRP	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl	12 µl	14 µl	16 µl	18 µl	20 µl	200 µl
PCR Water	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl	6 µl	7 µl	8 µl	9 µl	10 µl	100 µl
<b>Spolu</b>	<b>15 µl</b>	<b>30 µl</b>	<b>45 µl</b>	<b>60 µl</b>	<b>75 µl</b>	<b>90 µl</b>	<b>105 µl</b>	<b>120 µl</b>	<b>135 µl</b>	<b>150 µl</b>	<b>1,500 µl</b>

### UPOZORNENIE!

- Namiešaná reakčná zmes má limitovanú stabilitu, použite ju v čo možno najkratšom čase po príprave. Ak nie je možné namiešanú reakčnú zmes použiť ihneď, skladujete ju v chladničke pri teplote +4 °C.

## Príprava platničky a kontroly

K pripraveným 15 µl reakčnej zmesi pridajte 5 µl vzorky. Výsledný celkový objem reakcie je 20 µl.

Prípravte si potrebný počet čistých PCR skúmaviek, PCR stripov alebo PCR platničiek a vložte ich do vychladeného chladiaceho stojana. Pripravenú reakčnú zmes dôkladne ale zároveň jemne premiešajte mnohonásobným otočením skúmavky, pulzným vortexovaním, prípadne krátkym vortexovaním nie dlhším ako 5 sekúnd. Následne ju krátko odstredte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka a všetka tekutina bola na dne skúmavky. Z pripravenej reakčnej zmesi rozpipetujte po 15 µl do jednotlivých PCR skúmaviek alebo jamiek PCR platničky v súlade s potrebným počtom a pozíciami uskutočnených reakcií. Následne premiestnite PCR skúmavky alebo PCR platničku s rozpipetovanou reakčnou zmesou z laminárneho boxu určeného na prípravu reakčnej zmesi do laminárneho boxu určeného na finalizáciu prípravy platničky. V tomto laminárnom boxe pridajte 5 µl vzorky, alebo 5 µl pozitívnej kontroly (PC SARS-CoV-2 BMC5) alebo 5 µl PCR vody do príslušných PCR skúmaviek alebo jamiek PCR platničky. Následne dôkladne uzavrite jednotlivé PCR skúmavky vrchnákmi alebo jamky PCR platničky optickou fóliou. PCR skúmavky alebo PCR platničku krátko odstredte, aby všetka tekutina bola na dne skúmaviek/jamiek. Vložte PCR skúmavky alebo PCR platničku do real-time PCR zariadenia.

Do každej analýzy je nutné zahrnúť minimálne 1 negatívnu kontrolu na overenie prítomnosti kontaminácie. Ako negatívna kontrola slúži kontrola bez templátu (NTC) obsahujúca PCR vodu namiesto neznámej vzorky. Negatívnu



kontrolu pre test na prítomnosť vírusového génu E a negatívnu kontrolu pre test na prítomnosť vírusového génu RdRP je nutné zahrnúť samostatne.

Do každej analýzy je nutné zahrnúť minimálne 1 pozitívnu kontrolu na overenie správneho priebehu analýzy a funkčnosti zložiek kitu. Ako pozitívna kontrola slúži reakcia obsahujúca kontrolný materiál PC SARS-CoV-2 BMC5 namiesto neznámej vzorky. Pozitívnu kontrolu pre test na prítomnosť vírusového génu E a pozitívnu kontrolu pre test na prítomnosť vírusového génu RdRP je nutné zahrnúť samostatne.

Pozitívna kontrola (PC SARS-CoV-2 BMC5) obsiahnutá v kite je kompletná jednovláknová RNA vírusu SARS-CoV-2 kmeň Slovakia/SK-BMC5/2020. Táto RNA obsahuje cieľové sekvencie pre test prítomnosti vírusového génu E aj vírusového génu RdRP. Koncentrácia templátu v kontrolnom materiáli je ~200 kópií/μl. Vyhnite sa opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu pozitívnej kontroly.

Vírus SARS-CoV-2 kmeň Slovakia/SK-BMC5/2020 a tiež vyextrahovaná RNA tohto kmeňa sú dostupné aj prostredníctvom Európskeho vírusového archívu:

- <https://www.european-virus-archive.com/virus/sars-cov-2-strain-slovakiask-bmc52020>
- <https://www.european-virus-archive.com/nucleic-acid/sars-cov-2-strain-slovakiask-bmc52020-rna>

Kompletná sekvencia vírusového kmeňa Slovakia/SK-BMC5/2020 je dostupná na webovej stránke organizácie GISAID (EPI\_ISL\_417879):

- <https://www.epicov.org/epi3/frontend#11a1c>

V prípade potreby je do analýzy možné zahrnúť kontrolu bez reverznej transkriptázy. Je to reakcia pripravená bez pridania RT3 mixu, ktorá umožňuje odlíšenie kontaminácie spôsobenej RNA templátom a kontaminácie spôsobenej DNA templátom.

## Nastavenia real-time PCR prístroja

Pri nastaveniach podmienok analýzy týkajúcich sa objemu reakcie, teplotných podmienok reakcie a použitých optických kanálov postupujte v zmysle nasledujúcich pokynov.

Objem reakcie:

- 20 μl

Teplotné podmienky pre prácu s kitom:

- Reverzná transkripcia: 50 °C, 10 min
- Prvotná denaturácia: 95 °C, 2 min
- Cyklovanie, 45 cyklov:
  - Denaturácia: 95 °C, 5 s
  - Anelácia/extenzia: 60 °C, 20 s

Použitie optické kanály:

- Optický kanál pre značku FAM / modrý alebo zelený kanál podľa použitého real-time PCR zariadenia / excitačné maximum okolo 495 nm, emisné maximum okolo 520 nm
- Optický kanál pre farbivo ROX / oranžový alebo červený kanál podľa použitého real-time PCR zariadenia / excitačné maximum okolo 575 nm, emisné maximum okolo 605 nm

V prípade real-time PCR zariadení podporujúcich normalizáciu na základe prítomnosti pasívneho referenčného fluorescenčného farbiva ROX v reakčnej zmesi, odporúčame uskutočnenie analýzy so zapnutím tejto funkcie.

Fluorescenčný signál farbiva ROX nezasahuje do detekčného kanálu fluorescenčnej značky FAM. Vďaka tomu je vDetect COVID-19 RT-qPCR kit plne kompatibilný aj s real-time PCR zariadeniami, ktoré funkciu normalizácie farbivom ROX nepodporujú.

Pri nastaveniach podmienok analýzy týkajúcich sa počtu a typu vzoriek, rozloženia vzoriek na platničke, typu použitého plastového materiálu (skúmavky, stripy, platničky) postupujte v zmysle manuálu výrobcu real-time PCR zariadenia a v súlade s vašimi interne zaužívanými postupmi pre tento typ testov.

### **VAROVANIE!**

Neupravujte a nemeňte odporúčané protokoly pre PCR analýzy.

### **VAROVANIE!**

S produktami amplifikácie manipulujte mimoriadne opatrne, tak aby nedochádzalo k ich rozptýleniu do priestoru laboratória a k prípadnej kontaminácii nových testovaných vzoriek. Pri manipulácii s produktami amplifikácie používajte pipety určené výlučne na tento účel. Používajte jednorázové špičky s filtrom. Používané špičky musia byť sterilné a bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz.

## Analýza získaných údajov

Pri nastavení baseline pre jednotlivé reakcie postupujte v zmysle manuálu výrobcu real-time PCR zariadenia a v súlade s vašimi interne zaužívanými postupmi pre tento typ testov.

Pri nastavení thresholdu pre jednotlivé analýzy postupujte v zmysle manuálu výrobcu real-time PCR zariadenia a v súlade s vašimi interne zaužívanými postupmi pre tento typ testov.

## 8. Interpretácia výsledkov

### Kontrola kvality (výsledky kontrolných reakcií)

Štandardný výsledok negatívnej kontroly je charakterizovaný úplnou absenciou nárastu signálu vo FAM kanále, resp. absenciou amplifikačnej krivky. V prípade nárastu signálu po 40. cykle analýzy je výsledok stále považovaný za negatívny a je preto akceptovateľný, ale naznačuje možnú prítomnosť kontaminácie. V prípade nárastu signálu pred 40. cyklom analýzy je výsledok považovaný za pozitívny a potvrdzuje prítomnosť kontaminácie. V prípade pozitívneho výsledku v negatívnej kontrole nie je možné jednoznačne určiť správnosť ostatných pozitívnych signálov získaných v danej analýze, odlíšiť pozitívne a falošne pozitívne výsledky. Preto výstup takejto analýzy nie je možné vyhodnotiť.

Štandardný výsledok pozitívnej kontroly je charakterizovaný nárastom signálu vo FAM kanále, amplifikačnou krivkou typického tvaru a tiež dosiahnutím určitej štandardnej hladiny signálu. Štandardné  $C_T$  hodnoty pre pozitívnu kontrolu PC SARS-CoV-2 BMC5 sa hýbu v rozmedzí  $30 \pm 1$  pre E gén a  $31.5 \pm 1$  pre RdRP gén. Hladina signálu, t.j. relatívna fluorescencia bez normalizácie farbivom ROX, štandardne dosahuje hodnoty nad 1200 RFU pre E gén a nad 2000 RFU pre RdRP gén. Absencia signálu, prítomnosť nárastu signálu, ale s vyššími  $C_T$  hodnotami ako sú pre daný kontrolný materiál zvyčajné, alebo prítomnosť signálu s nízkou hladinou, potvrdzujú nesprávny priebeh reakcie a naznačujú

chybu pri príprave analýzy alebo nesprávne fungovanie niektorej zložky kitu. V prípade negatívneho výsledku v pozitívnej kontrole nie je možné jednoznačne určiť správnosť ostatných negatívnych výsledkov získaných v danej analýze, odlíšiť negatívne a falošne negatívne výsledky. Preto výstup takejto analýzy nie je možné vyhodnotiť.

## Pozitívny výsledok

Pozitívny výsledok na SARS-CoV-2 je charakterizovaný amplifikáciou cieľovej sekvencie v géne E aj v géne RdRP. Amplifikácia je spojená s nárastom fluorescenčného signálu vo FAM kanále. Ak sa takýto amplifikačný signál objaví vo FAM kanále pred 40. cyklom analýzy, znamená to, že SARS-CoV-2 RNA bola detekovaná v danej vzorke. Vzorka je teda pozitívna na prítomnosť RNA SARS-CoV-2.

Okrem pozitívneho výsledku príznačného pre prítomnosť SARS-CoV-2 RNA, korelácia s klinickým stavom pacienta a s inými diagnostickými informáciami je nevyhnutná pre potvrdenie diagnózy a stanovenie stavu infekcie. Pozitívne výsledky nevylučujú bakteriálne infekcie alebo koinfekcie inými vírusmi. Prítomnosť SARS-CoV-2 RNA nemusí byť definitívnou príčinou zdravotného stavu pacienta. Všetky pozitívne výsledky musia byť nahlásené príslušným orgánom verejného zdravotníctva.

## Negatívny výsledok

Pokiaľ nedôjde k nárastu amplifikačného signálu vo FAM kanále pred 40. cyklom analýzy, je možné výsledok interpretovať ako pravdepodobne negatívny alebo s koncentráciou RNA pod detekčným limitom kitu (8 kópií templátu na reakciu).

Negatívny výsledok nevylučuje prítomnosť infekcie vírusom SARS-CoV-2, pretože výsledky testu sú závislé na správnom odbere vzorky aj na jej spracovaní. Výsledky sú tiež závislé na prítomnosti dostatočného množstva analyzovanej RNA vírusu SARS-CoV-2 v klinickej vzorke. Existujú dôkazy, že vírus môže byť vylučovaný prerušovane a dokonca aj u infikovaného pacienta môže byť hladina vírusu v klinických vzorkách v rôznych fázach ochorenia pod detekčným limitom akejkoľvek metódy RT-qPCR. Z tohoto dôvodu sa odporúča uskutočniť aspoň dva, najlepšie viac nových odberov a RT-qPCR vyšetrení u jedného pacienta s odstupom niekoľkých dní. Negatívne výsledky by sa nemali použiť ako jediný základ pre voľbu liečebného postupu a klinického manažmentu pacienta. Mali by byť skombinované s klinickým stavom pacienta a s inými epidemiologickými informáciami.

### **UPOZORNENIE!**

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

## 9. Funkčné charakteristiky

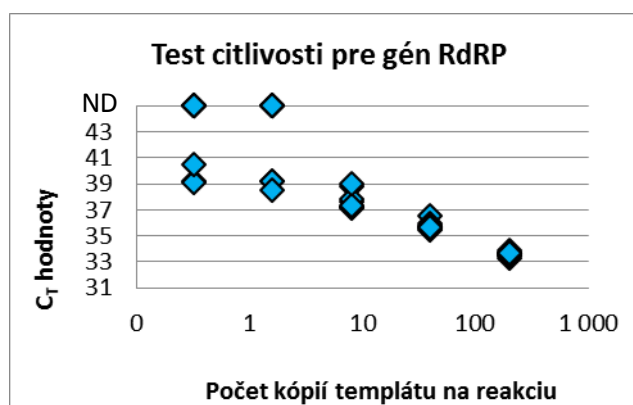
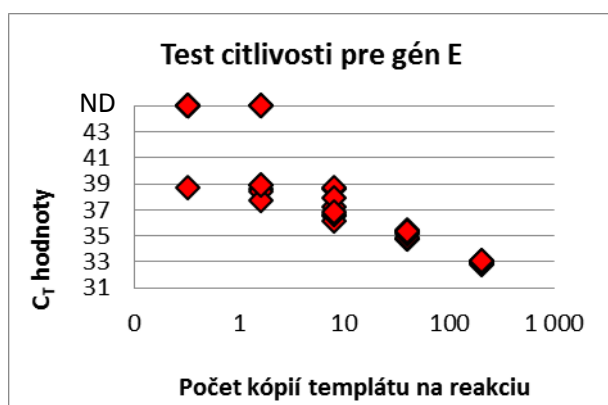
### Detekčný limit kitu

Hodnotenie analytickej citlivosti (detekčného limitu) bolo uskutočnené pre skriningový test na E gén ako aj pre konfirmačný test na RdRP gén. Test bol uskutočnený pomocou kontrolného materiálu „SARS-CoV-2 Standard“ (Exact Diagnostics), ktorý v neriedenom stave obsahuje 200 kópií templátu na 1  $\mu$ l. Päťnásobným sériovým riedením boli pripravené riedenia s koncentráciou 40 kópií/ $\mu$ l (=200 kópií/reakciu), 8 kópií/ $\mu$ l (=40 kópií/reakciu), 1.6 kópií/ $\mu$ l (=8 kópií/reakciu), 0.32 kópií/ $\mu$ l (=1.6 kópií/reakciu) a 0.064 kópií/ $\mu$ l (=0.32 kópií/reakciu), ktoré boli použité v teste analytickej citlivosti. Na riedenie kontrolného materiálu bolo použité riediace médium pripravené zmiešaním vyextrahovanej RNA z odobratých vzoriek niekoľkých COVID-19 suspektných pacientov s negatívnym výsledkom RT-

qPCR diganostického testovania. Použité riediace médium zároveň slúžilo na čo najhodnovernejšie napodobenie charakteristík štandardných klinických vzoriek ako komplexnej zmesi vrátane prípadného obsahu RT-qPCR inhibítorov. Test bol uskutočnený v 8 replikátoch pre každé pripravené riedenie.

Test potvrdil vysokú citlivosť diagnostického kitu vDetect COVID-19 RT-qPCR. Spoľahlivá detekcia templátu, pre stanovenie prítomnosti E génu aj RdRP génu, bola preukázaná až do riedenia obsahujúceho 8 kópií na reakciu (1.6 kópií na 1  $\mu$ l vzorky). Pozitívny signál bol pozorovaný aj pri niektorých, nie však všetkých, reakciách s koncentráciou 1.6 a 0.32 kópií na reakciu. Spoľahlivosť detekcie templátu pri týchto riedeniach má teda nižšiu ako 100% účinnosť (viď nižšie uvedenú tabuľku a grafy).

	E gén			RdRP gén		
	Celkový počet reakcií	Počet reakcií s pozitívnym výsledkom	Úspešnosť detekcie	Celkový počet replikátov	Počet reakcií s pozitívnym výsledkom	Úspešnosť detekcie
200 kópií/reakciu	8	8	100%	8	8	100%
40 kópií/reakciu	8	8	100%	8	8	100%
8 kópií/reakciu	8	8	100%	8	8	100%
1.6 kópií/reakciu	8	5	63%	8	3	38%
0.32 kópií/reakciu	8	1	13%	8	2	25%
Pozitívna kontrola	4	4	-	4	4	-
NTC	4	0	-	4	0	-



## Špecifita kitu

Hodnotenie špecifity (krížovej reaktivity na iné koronavírusy) bolo uskutočnené pre skriningový test na E gén ako aj pre konfirmačný test na RdRP gén. Test bol uskutočnený pomocou kontrolného materiálu „Coronavirus RNA špecifity panel“ (EVAg, European Virus Archive - Global), ktorý obsahuje RNA vírusov HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NI63, SARS-CoV HKU39849, MERS-CoV a SARS-CoV-2, každú v samostatnej skúmavke. Test bol uskutočnený v 3 replikátoch pre každý z uvedených vírusov.

Test potvrdil vysokú špecificitu diagnostického kitu vDetect COVID-19 RT-qPCR. Pozitívny výsledok bol zaznamenaný výlučne v reakciách obsahujúcich SARS-CoV-2 RNA a to rovnako v stanoveniach prítomnosti E génu aj RdRP génu.

Výskyt kontaminácie syntetickými pozitívnymi kontrolami v rôznych komerčne dostupných produktoch používaných na uskutočnenie RT-qPCR diagnostiky ochorenia COVID-19, napr. primerov, prób alebo RT-PCR zmesí, predstavuje globálny problém. Zmes primerov a próby SARS-CoV-2\_E v kite vDetect COVID-19 RT-qPCR bola navrhnutá tak, aby neamplifikovala najčastejšie používané syntetické pozitívne kontroly vôbec alebo len s nízkou účinnosťou. Kit vDetect COVID-19 RT-qPCR tak môže byť účinne použitý aj na pracoviskách, ktoré majú problém s kontamináciou pri testovaní prítomnosti E génu SARS-Cov-2.

Hodnotenie chemickej stability (nešpecifickej reakcie medzi oligonukleotidmi obsiahnutými v jednotlivých zmesiach primerov a prób) bolo uskutočnené pre skriningový test na E gén ako aj pre konfirmačný test na RdRP gén. Test bol uskutočnený formou mnohonásobnej analýzy kontrol bez templátu (NTC) v počte 20 replikátov pre E gén a 40 replikátov pre RdRP gén.

Test potvrdil vysokú chemickú stabilitu oligonukleotidov obsiahnutých v kite vDetect COVID-19 RT-qPCR. V každej z analyzovaných NTC bol zaznamenaný negatívny výsledok bez náznaku zvýšenia signálu alebo prítomnosti amplifikácie.

### Klinické hodnotenie výkonu

Klinické hodnotenie výkonu kitu vDetect COVID-19 RT-qPCR bolo uskutočnené pre skriningový test na E gén ako aj pre konfirmačný test na RdRP gén. Hodnotenie bolo uskutočnené na vybranom súbore 38 pozitívnych a 54 negatívnych klinických vzoriek pacientov, ktoré boli potvrdené referenčnou metódou štandardne používanou na rutinné testovanie regionálnymi úradmi verejného zdravotníctva Slovenskej republiky. Testovanie tohto vybraného súboru vzoriek bolo uskutočnené nezávisle v dvoch laboratóriách, pričom jedno z laboratórií pracovalo so zaslepenými vzorkami.

Nezávislé analýzy v oboch laboratóriách jednoznačne potvrdili výsledky referenčnej metódy pre všetky hodnotené vzorky a preukázali vysokú spoľahlivosť a reprodukovateľnosť výsledkov nadobudnutých pomocou kitu vDetect COVID-19 RT-qPCR (viď nižšie uvedenú tabuľku). Na základe získaných údajov má kit vDetect COVID-19 RT-qPCR 100% diagnostickú citlivosť a 100% diagnostickú špecifickosť. Zároveň nie je možné určiť podiel falošne negatívnych a falošne pozitívnych výsledkov.

	Referenčná metóda	vDetect COVID-19 RT-qPCR kit laboratórium 1		vDetect COVID-19 RT-qPCR kit laboratórium 2	
		E gén	RdRP gén	E gén	RdRP gén
Počet správne pozitívnych vzoriek	38	38	38	38	38
Počet falošne pozitívnych vzoriek	-	0	0	0	0
Počet správne negatívnych vzoriek	54	54	54	54	54
Počet falošne negatívnych vzoriek	-	0	0	0	0

## 10. Nakladanie s odpadom

### **UPOZORNENIA!**

- Všetok materiál, ktorý sa dostal do kontaktu s biologickými vzorkami dekontaminujte pred likvidáciou 3% chlórnanom sodným minimálne 30 minút alebo autoklávujte pri 121 °C minimálne 60 minút.
- Všetky použité pomôcky, špičky, skúmavky, pracovný materiál a ochranné odevy považujte za potencionálne kontaminované a zlikvidujte ich podľa platných predpisov pre likvidáciu infekčného odpadu.
- Zvyšné reagenty a materiál zlikvidujte v súlade s platnými bezpečnostnými predpismi.

## 11. Riešenie problémov

V prípade akýchkoľvek problémov kontaktujte:

**Lambda Life a.s.** – zmluvný výrobca  
Kontaktná osoba: MUDr. Ivan Juráš  
Funkcia: Prevádzkový a vedecký riaditeľ  
IČO: 35848189  
Adresa: Levočská 3  
851 01 Bratislava  
Tel.: +421 2 44880163  
Email: [vdetect@lambda.sk](mailto:vdetect@lambda.sk)

## 12. Referencie

- Drosten C., et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. N Engl J Med. 2003;348(20):1967-76.
- Corman V. M., et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Euro Surveill. 2012;17(39).
- Vogels C. B. F., et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-COV-2 qRT-PCR primer-probe sets. medRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20048108>. Last version posted April 26, 2020.
- Corman V. M., et al. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3).
- Európska Komisia. OZNÁMENIE KOMISIE, Usmernenia k diagnostickým testom in vitro na COVID-19 a ich funkčnosti (2020/C 122 I/01).
- Muth D., et al. Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. Sci Rep. 2018;8(1):15177.
- Drexler J. F., et al. Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus in European Bats and Classification of Coronaviruses Based on Partial RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Sequences. J Virol. 2010;84(21):11336-49.

## 13. Nehody, Poruchy, Zlyhania Zdravotníckych Pomôcok (NPZ ZP)

V slovenských právnych predpisoch je hlásenie a vyhodnocovanie NPZ ZP zakotvené v § 116 ods.2 zákona č.362/2011 Z. z. o liekoch a zdravotníckych pomôckach (ZP), podľa ktorého sú zdravotnícki pracovníci, zdravotnícke zariadenia, zdravotné poisťovne, výrobcovia a splnomocnenci povinní NPZ ZP bezodkladne oznamovať ŠÚKL-u. Opatrenia (zaznamenávanie a vyhodnocovanie údajov o NPZ ZP, pozastavenie výdaja ZP, stiahnutie ZP z trhu alebo z používania) podľa § 116 ods.3 až 6 zákona č.362/2011 Z. z. vykonáva národný príslušný úrad (NCA) pre zdravotnícke pomôcky, ktorým je v SR ŠÚKL.

Definícia NPZ ZP podľa MEDDEV 2.12-1 rev.8:









NPZ ZP je také zlyhanie, alebo zhoršenie charakteristických vlastností a/alebo funkcie ZP, rovnako ako nedostatok v označení výrobku, alebo v návode na použitie, ktoré priamo, alebo nepriamo viedli, alebo mohli viesť k smrti pacienta, používateľa, alebo iných osôb, alebo viedli, alebo mohli viesť k vážnemu zhoršeniu zdravotného stavu.

Ak zdravotnícky pracovník, poskytovateľ zdravotnej starostlivosti, zdravotná poisťovňa oznámi nehodu, poruchu alebo zlyhanie zdravotníckej pomôcky podľa odseku 2 štátnemu ústavu, štátny ústav je povinný preveriť, či výrobca je o nehode, poruche a zlyhaní informovaný. Ak výrobca o nehode, poruche alebo zlyhaní zdravotníckej pomôcky nie je informovaný, štátny ústav je povinný výrobcu o nehode, poruche alebo zlyhaní zdravotníckej pomôcky informovať. Pre oznámenie kontaktujte výrobcu alebo použite formulár **MIR – Manufacturer's incident report** na stránke [https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/zdravotnicke-pomocky/formulare?page\\_id=498](https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/zdravotnicke-pomocky/formulare?page_id=498) a postupujte podľa inštrukcii uvedených nižšie:

**MIR – Manufacturer's incident report** – hlásenie výrobcu o NPZ ZP (podľa prílohy č.3 Guidelines), jeho verzia na elektronické posielanie je jednotná pre úvodné hlásenie, priebežné hlásenie, spoločné úvodné a záverečné hlásenie a posielajú ho výrobca, splnomocnenec, zdravotnícky personál. V prípade, ak súbor .pdf nejde priamo otvoriť, uložte ho najprv do svojho PC a potom ho otvorte. Vyplnený formulár pošlite vo formáte .pdf.

Kontaktná osoba výrobcu: Lambda Life a.s. – zmluvný výrobca	Kontaktná osoba NCA za Slovenskú republiku:
Meno: MUDr. Ivan Juráš	Ing. Darina Kaminská
Funkcia: Prevádzkový a vedecký riaditeľ	odborný zamestnanec vigilancie ZP
IČO: 35848189	Sekcia zdravotníckych pomôcok
Adresa: Levočská 3, 851 01 Bratislava	Kvetná 11, 825 08 Bratislava
Tel.: +421 2 44880163	Tel.: +421 2 50701215
Email: <a href="mailto:vdetect@lambda.sk">vdetect@lambda.sk</a> Web: <a href="http://www.vdetect.eu">www.vdetect.eu</a>	Email: <a href="mailto:darina.kaminska@sukl.sk">darina.kaminska@sukl.sk</a> Web: <a href="http://www.sukl.sk">www.sukl.sk</a>

## 14. Použité symboly a označenia

	Výrobca
	Číslo šarže
	Odporúčaná teplota skladovania
	Veľkosť balenia
	Tento výrobok spĺňa požiadavky európskej smernice 98/79/ES o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro
	Dátum výroby
	Diagnostické zdravotnícke pomôcky in vitro
	Pozor, rešpektujte bezpečnostné pokyny v návode na použitie, ktoré ste dostali s týmto výrobkom

POSLEDNÁ STRANA



ESET, spol. s r.o.  
IČO: 31 333 532  
Adresa: Einsteinova 24, 851 01 Bratislava, Slovenská republika  
Tel: +421 2 322 44 111  
Email: vdetect@eset.com

© 2020 ESET, spol. s r.o. Všetky práva vyhradené.  
vDetect COVID-19 je ochranná známka spoločnosti ESET, spol. s r.o.  
Všetky ostatné názvy produktov a ochranné značky sú majetkom ich právoplatných vlastníkov