



Návod k použití

ViroQ SARS-CoV-2

Testovací souprava ke kvalitativnímu průkazu SARS-CoV-2 RNA

Návody k použití v elektronické podobě naleznete na www.bag-diagnostics.com



REF kat. č. 728250 ViroQ SARS-CoV-2 96 testů

REF kat. č. 728251 ViroQ SARS-CoV-2 480 testů

Obsah

1. POUŽITÍ.....	2
2. POPIS VÝROBKU.....	2
3. PRINCIP TESTU.....	2
4. MATERIÁL.....	2
4.1 Obsah soupravy ViroQ SARS-CoV-2 kit.....	2
4.2 Další potřebné reagenty a přístroje.....	2
5. SKLADOVÁNÍ A STABILITA.....	3
6. PRŮBĚH TESTU.....	3
6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky.....	3
6.2 Izolace RNA.....	4
6.3 Příprava reagentů.....	4
6.4 Amplifikace.....	4
6.5 Interpretace výsledků.....	5
7. VÝKONOST TESTU.....	6
7.1 Limity detekce.....	6
7.2 Klinická studie.....	6
7.3 Skřížená reaktivita.....	6
8. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ.....	7
9. OMEZENÍ METODY.....	9
10. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY.....	9
11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ.....	9
12. OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU A NA VÝROBCÍCH.....	9
13. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH.....	10
14. LITERATURA.....	10

Verze: 1/2020 / Publikováno: 2020-04

1. POUŽITÍ

Souprava ViroQ SARS-CoV-2 slouží pro kvalitativní průkaz RNA viru SARS-CoV-2 RNA ve vzorcích jako je sputum nebo stěry dýchacího traktu pomocí reverzní transkripce RNA a real-time PCR. Test by měl být prováděn v specializovaných laboratořích kvalifikovanými pracovníky.

2. POPIS VÝROBKU

Souprava ViroQ SARS-CoV-2 Kit je určena pro *in vitro* průkaz RNA viru SARS-CoV-2 ve vzorcích jako je sputum nebo stěry dýchacího traktu. Souprava a její reagentie slouží k jedнокrokové reakci pomocí technologie RT-PCR. Kombinace efektivní syntézy cDNA z RNA následovaná real-time PCR umožňuje v soupravě ViroQ SARS-CoV-2 provést test v jediné zkumavce. Test obsahuje primery a fluorescenční próby pro amplifikaci a detekci genových fragmentů viru SARS-CoV-2. Navíc obsahuje interní kontrolu informující, zda byl odběr vzorku z dýchacího traktu proveden správně a zda proběhla amplifikace.

3. PRINCIP TESTU

Zdrojovým materiálem pro test je RNA. RNA je přepsána do cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy a následně amplifikována pomocí PCR. Primery jsou navrženy tak, aby selektivně amplifikovaly přepsanou cDNA odpovídající virovým genům RdRP a E (RdRP Gen: Institut Pasteur Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-ofsars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2; E Gen: Corman et al. 2020). Amplikony jsou detekovány pomocí také k lokusu specifickým fluorescenčně značenými hydrolyzačními próbami (TaqMan® probes). Pokud dojde k amplifikaci jsou próby hydrolyzovány Taq polymerázou a fluorescenční signál je generován proporčně k množství PCR produktu. Fluorescenční signál je měřen pomocí optického modulu RT-cykléru.

Test se provádí v jediné PCR reakci, ve které jsou detekovány pomocí různých fluorescenčních barev dva virové geny RdRP a E a univerzálně exprimovaný lidský housekeeping gen (Rnase P), který potvrzuje, zda byl správně proveden odběr vzorku a amplifikace.

4. MATERIÁL

4.1 Obsah soupravy ViroQ SARS-CoV-2 kit

- **ViroQ Enzyme**, enzym, lyofilizovaný, obsahuje reverzní transkriptázu, Taq polymerázu a dNTPs
- **ViroQ Solvent**, rozpouštědlo, připraveno k použití, obsahuje rekonstituční pufr pro ViroQ Enzyme
- **ViroQ Mix**, připraven k použití, primery, próby, reakční pufr
- **ViroQ Pos Ctrl**, sušená, obsahuje lidskou mRNA, referenční RNA viru
- **Návod k použití**

4.2 Další potřebné reagentie a přístroje

- Reagentie pro izolaci RNA (validované soupravy pro izolaci RNA, viz kapitola 6.2)
- Real-time PCR cyklér (validované cykléry viz kapitola 4.3)
- RT-PCR reakční zkumavky a víčka / krycí folie (validované výrobky, viz kapitola 4.3)
- DEPC H₂O / destilovaná voda. / WFI (Ampuwa®)
- Pístové pipety a špičky (0,5 – 1000 µl)

Validované cykléry a reakční zkumavky

Cyklér	Real-time-PCR reakční zkumavky	Real-time-PCR uzavírací systémy
CFX96™ Real-Time PCR Detection System. Comp. Bio-Rad	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, 96 clear wells, clear frame, Product No. 4ti-1200/C, Comp. 4titude	4titude Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Comp. 4titude
		4titude qPCR seal, Product No.: 4ti-0560
	Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/white, #HSP9655, Comp. Bio-Rad	0.2 ml Flat PCR Tube 8-Cap Strips, optical, ultraclear, #TCS0803, Comp. Bio-Rad
LightCycler® 480 System, Comp. Roche	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white, Product No. 04729692001, Comp. Roche	LightCycler® 480 Sealing Foil, Product No. 04729757001 Comp. Roche
QuantStudio 6	4titude FrameStar 96 Well Semi-Skirted, PCR Platte, ABI FastPlate Style, Product code: 4ti-0911	4titude qPCR seal, Product No.: 4ti-0560
		4titude Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Comp. 4titude

Speciální poznámka: Pokud je použit jiný real-time cyklér, reakční zkumavky či uzávěry, je nutno provést validaci uživatelem.

5. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Soupravy jsou distribuovány při pokojové teplotě. Po přijetí je nutno skladovat reagentie při ≤ -20 °C v mrazících boxech s kontrolovanou teplotou. Datum expirace je vyznačeno na etiketě každé reagentie. Datum expirace vyznačené na vnějším obalu soupravy odpovídá datu expirace té reagentie ze soupravy, která má dobu expirace nejkratší. Reagentie ViroQ Enzyme a ViroQ Solvent mohou být skladovány při pokojové teplotě po celou dobu trvanlivosti za podmínky, že enzym zůstává v lyofilizovaném stavu a není rozpuštěn v rekonstitučním pufru. Po rozpuštění lze enzym používat po dobu 12 měsíců. Vyhněte se opakovanému rozmrazování a zamrazování reagentií (více než dvakrát), neboť to může ovlivnit výkonost testu. Pokud se chystáme využívat soupravu postupně, je dobré připravit alikvoty reagentií.

6. PRŮBĚH TESTU

6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky

Molekulárně genetické metody jsou velmi citlivé a musí být prováděny pouze dobře zaškolenými osobami, zkušenými jak v technikách PCR.

Je nutné dodržovat zvláštní bezpečnostní opatření, aby se předešlo kontaminacím, a tím i falešným výsledkům:

- ◆ Pracujte v rukavicích (pokud je to možné, tak bez obsahu pudru).
- ◆ Používejte novou špičku (s integrovaným filtrem) na každý pipetovací krok.
- ◆ Používejte oddělená pracovní místa pro jednotlivé kroky: pre-amplifikační fáze (RNA izolace a příprava PCR reakce) a post-amplifikační fáze (detekce).
- ◆ Používejte nástroje, reagentie a přístroje samostatně pro každé pracovní místo zvlášť a nepřenášejte je.

6.2 Izolace RNA

Materál pro izolaci RNA musí být dodán ve vhodném sběrném systému. Pro správný odběr vzorků postupujte podle instrukcí WHO na tomto odkazu <https://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>

Doporučujeme pro izolaci RNA používat CE IVD certifikované soupravy.

Validované soupravy pro izolaci RNA:

Manuální

- QIAamp Viral RNA Mini Kit

Automatizované

- QIAamp® Viral RNA Mini QIAcube Kit
- QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Mini Kit
- Roche MagNA Pure 96 System

Pokud máte v laboratoři zavedenou standardní metodu izolace RNA, která není mezi výše zmíněnými, je nutné, abyste ji validovali.

6.3 Příprava reagensí

Enzym ViroQ musí být rozpuštěn před použitím ve 400µl rozpouštědla ViroQ Solvent. Rozmíchejte pipetou pipetováním nahoru a dolů.

Pozitivní kontrola ViroQ Pos Ctrl musí být před použitím rozpuštěna v 20µl DEPC H₂O. Rozmíchejte pipetou pipetováním nahoru a dolů.

6.4 Amplifikace

Použity by měly být reakční zkumavky doporučené výrobcem nebo materiál doporučený v kapitole 3.3.

Pro každý vzorek napipetujte do reakční zkumavky následující množství reagensí:

4 µl	ViroQ Enzyme
2 µl	ViroQ Mix
5 µl*	RNA Sample
9 µl	DEPC H ₂ O / WFI

* Při předpokládaném malém množství kopií viru lze zvýšit objem vzorku a odpovídajícím způsobem zmenšit objem vody.

Reakční objem každé reakce RT-PCR je 20 µl.

Pokud připravujete premix ViroQ Enzyme a ViroQ Mix pro více než jeden vzorek přidejte navíc rozumné množství s ohledem na ztráty při pipetování.

Pro provedení **pozitivní kontroly (PTC)** a **negativní kontroly (NTC)** připravte PCR reakci s ViroQ Pos. Ctrl, respektive pro negativní kontrolu s vodou místo RNA.

Uzavřete reakční zkumavky a krátce stočte obsah. Ujistěte se, že ve zkumavkách nejsou žádné bublinky. Pokud jsou bublinky přítomny, odstraňte je lehkým poklepáním o desku stolu. Spusťte PCR program s následujícími parametry:

Krok	Čas	Teplota	Počet cyklů
Reverzní transkripce	20 min	48°C	1 cyklus
Aktivace polymerázy	3 min	95°C	1 cyklus
Denaturace	15 sec	95°C	45 cyklů
Anealing + Extenze	30 sec + čtení	58°C	

Pro soupravu ViroQ SARS-CoV-2 byly validovány následující cykléry:

Biorad: CFX96™ Real-Time PCR Detection System

Roche: LightCycler® 480 II System

Applied biosystems: QuantStudio 6

Speciální poznámka:

- Při použití jiného RT-cykléru musíte jako uživatel provést validaci.

6.5 Interpretace výsledků

Všechny testy musí ukazovat pozitivní fluorescenční signál v červeném kanálu, kde se nachází interní kontrola. Vzorky pozitivní na SARS-CoV-2 musí vykazovat pozitivní signál v jednom nebo obou vyhrazených kanálech zelený FAM (RdRP gen) a oranžový CFO560 (E gen).

Barevný kanál	Specifita
FAM	Sars-Cov-2 / RdRP gen (RNA-dependend RNA-Polymerase)
CFO560 / HEX / VIC / JOE	Sars-Cov-2 / E gene (Sarbeco, Envelope)
CFR610 / Texas Red / ROX	Buněčná kotrola / Rnase P

Amplifikační signál negativní kontroly (SARS-CoV-2 negativní) musí být mimo definovanou oblast hodnot Cq pro oba kanály (zelený a oranžový). Kontrola bez templátu (NTC - negativní kontrola) s destilovanou vodou by neměla vykazovat žádný fluorescenční signál v průběhu celé real-time PCR a slouží jako kontaminační kontrola. Fluorescenční signál v NTC ukazuje na kontaminaci. Fluorescenční signál mimo rozsah hodnot Cq může být způsoben vysokou citlivostí metody při nesprávném pipetování. V těchto případech by měl být test zopakován.

Následující signály jsou považovány za pozitivní:

	Barevný kanál	Cq-Level	Neprůkazné	Vlnová délka v nm
Buněčná kontrola	Červený (CFR610)	<40*	>40-45**	excitace: 597 emise: 610
Virový gen RdRP	Zelený (FAM)	<40	>40-45	excitace: 495 emise: 520
Virový gen E	Oranžový (CFO560)	<40	>40-45	excitace: 538 emise: 559

*Vysoká koncentrace/nálož SARS-CoV-2 RNA ve vzorku může vést k oslabení nebo i zmišení signálu buněčné kontroly.

** Nedostatečná koncentrace/nálož lidského buněčného materiálu. Nesprávné odebrání nebo převoz vzorku.

Cq-level (Cq hodnota) je ten cyklus PCR, který ukazuje pozitivní signál oproti pozadí.

V následující tabulce najdete interpretaci výsledků amplifikace:

FAM	CFO560	CFR610	Interpretace
+	+	+*	Detekována SARS-CoV-2 (cílové E a RdRP geny) specifická RNA.
+	-	+*	Detekována SARS-CoV-2 (cílový RdRP gen) specifická RNA.
-	+	+*	Detekována SARS-CoV-2 (cílový E gen) specifická RNA.
-	-	+	Nebyla detekována specifická RNA SARS-CoV-2. Vzorek neobsahuje detekovatelné množství (LoD) specifické RNA.
-	-	-**	Neplatný výsledek způsobený inhibicí PCR v reálném čase nebo selháním činidla. Opakujte izolaci a / nebo testování RNA z původního vzorku.

* Vysoká koncentrace SARS-CoV-2 RNA ve vzorku může vést ke slabému, nebo chybějícímu signálu buněčné kontroly.

** Nedostatečná koncentrace / množství lidského buněčného materiálu. Nevhodně odebraný vzorek, nebo špatná přeprava vzorku.

7. VÝKONOST TESTU

Použitá kombinace primerů a prób zaručuje důvěryhodnou identifikaci specifické RNA SARS-CoV-2. Přesnost a reprodukovatelnost specifity testu je verifikována pro každou šarži pomocí předtypovaných referenčních vzorků.

7.1 Limity detekce

Nejnižší koncentrace, která je detekována s pravděpodobností 95% a vyšší určuje limit detekce (LoD). Limit detekce byl stanoven pomocí pěti různých ředění referenční virové RNA, která pak byla testována 20 krát každé. Podle výsledků tohoto experimentu je analytická senzitivita RT-PCR soupravy ViroQ SARS-CoV-2 **5 kopií na 20 µl reakce** pro oba cílové geny (RdRP, E gen).

7.2 Klinická studie

Klinická studie soupravy ViroQ SARS-CoV-2 byla provedena na skupině 376 pre-typovaných vzorků. Výsledky testů byly porovnány s výsledky získanými pomocí testů jiných výrobců.

		ViroQ SARS-CoV-2	
		pozitivní	negativní
Před-definované výsledky	pozitivní	40	0
	negativní	1*	335

Diagnostická specifita: 99,7%
Diagnostická senzitivita: 100%

*sporný výsledek, v tomto vzorku byl prokázán pouze gen E!

7.3 Skřížená reaktivita

Skřížená reaktivita primerů s dalšími respiračními viry a bakteriemi byla testována s pozitivními vzorky v Pasteurově institutu (Paříž) a Corman et al. 2020. Žádný z testovaných organismů nevykazoval reaktivitu.

Pro průkaz analytické specifity soupravy ViroQ SARS-CoV-2 byl použit kontrolní panel obsahující 22 respiračních patogenů (nepoškozené virové částice a bakteriální buňky). RNA byla extrahována z každého poolu (viz tabula níže) a otestována pomocí soupravy ViroQ SARS-CoV-2. Ani jeden pool neukazoval reaktivitu pro RdRP gen. Pro gen E byla pozorována velmi slabá reaktivita ve všech poolech.

Respirační kontrolní panel					
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5
Adenovirus Type 3	✓				
Coronavirus OC43	✓				
Human Metapneumovirus (Peru6-2003)**	✓				
Parainfluenza Type 2	✓				
<i>B. pertussis</i>	✓				
Coronavirus NL63		✓			
Bocavirus-Lambda (recombinant, Isolate 2)		✓			
Influenza A H1 (A/New Caledonia/20/99)		✓			
Parainfluenza Type 3		✓			
Coronavirus 229E			✓		
Rhinovirus (1A)			✓		
Influenza A H3 (A/Brisbane/10/07)			✓		
<i>C. pneumoniae</i> (CWL-029)			✓		
Influenza B (B/Florida/02/06)				✓	
Parainfluenza Type 4A				✓	
Respiratory Syncytial Virus B (CH93(18)-18)				✓	
<i>M. pneumoniae</i> (M129)				✓	
Coronavirus HKU-1 (recombinant)				✓	
Influenza A H1N1 (A/NY/02/09)					✓
Parainfluenza Type 1					✓
Respiratory Syncytial Virus A (2006 Isolate)					✓
<i>L. pneumophila</i> (Philadelphia)					✓

8. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

Souprava ViroQ SARS-CoV-2 je navržena pro in-vitro-diagnostiku a měla by být používána pouze dobře zaškolenými a kvalifikovanými osobami. Veškerá práce by měla probíhat za dodržování Standardů správné laboratorní práce.

Reagencie ViroQ Solvent je látka označená **Warning a Health hazard (varování a zdravotní riziko)**. Prosíme nahlédněte do kapitoly 12 pro více informací.

Bilogický materiál použitý pro extrakci RNA, t.j. vzorek z dýchacích cest je třeba považovat za potenciálně infekční. Při manipulaci s biologickým materiálem je třeba dodržovat přísná bezpečnostní opatření (tj. nepipetujte ústy, používejte jednorázové rukavice při manipulaci s biologickým vzorkem a při provádění testů, desinfikujte ruce po ukončení práce).

Bilogický materiál je třeba před likvidací deaktivovat (např. autoklávováním). Jednorázový materiál by měl být autoklávován nebo spálen.

Vylitý potenciálně infekční materiál by měl být ihned odstraněn savým papírovým ubrouskem a kontaminovaná oblast očištěna standardním desinfekčním prostředkem nebo 70% alkoholem. Materiál použitý na úklid včetně rukavic je nutné před likvidací inaktivovat (např. v autoklávu).

Likvidace všech vzorků, nepoužitých činidel a odpadu by měla být v souladu s místní legislativou a nařízeními.

Je třeba zabránit mikrobiální kontaminaci reagensů při tvorbě alikvotů. Doporučujeme používat sterilní jednosměrné pipety a špičky. Zakalené reagensie a/nebo reagensie vykazující jakékoli znaky mikrobiální kontaminace nesmí být použity.

Bezpečnostní listy, respektive prohlášení k Bezpečnostním listům jsou k dispozici ke stažení na www.bag-diagnostics.com.

9. OMEZENÍ METODY

Mutace a/nebo polymorfismus v oblasti vazby primerů a prób může vést k falešně negativním výsledkům.

Z důvodů vysoké citlivosti metody RT-PCR je nezbytná velmi přesná práce při izolaci RNA, čímž bude vyloučena kontaminace vzorku jiným vzorkem.

Extrémní opatrnost je nutná k zabránění kontaminace reagensů a dalšího laboratorního materiálu a vybavení amplikony, DNA nebo RNA. Pravidelné stěrové testy a negativní kontrola s destilovanou vodou v každém běhu testu jsou důrazně doporučovány.

V kontrole bez templátu s destilovanou vodou nesmí být žádný fluorescenční signál ($C_q > N.A.$). V případě, že se objeví v negativní kontrole jakýkoli signál, je třeba dekontaminovat pracovní prostor PCR a v případě potřeby vyměnit reagenzie.

Veškeré nástroje a přístroje (t.j. pipety, RT-cykléry atd.) musí být kalibrovány podle pokynů výrobce. Negativní výsledky testu nevylučují infekci SARS-CoV-2 a neměly by samy o sobě sloužit jako jediný zdroj pro rozhodování o diagnóze pacienta. Negativní výsledky je třeba vždy spojit také s klinickým pozorováním, historií pacienta a epidemiologickými informacemi.

10. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY

Interní kontrolu kvality nové šarže soupravy ViroQ SARS-CoV-2 kit lze provést pomocí kombinace RNA vzorků, u kterých víme, zda jsou pozitivní či negativní. Doporučujeme provádět negativní kontrolu pro vyloučení možné kontaminace. Využijte pro ni PCR s vodou bez RNAsy.









11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Projev	Možná příčina	Možné/á řešení
Špatný, nebo žádný signál	Přítomnost inhibitoru.	Použijte čisté reagenzie.
	Nepřítomnost RNA v reakci	Zopakujte test. Buďte pozorní na správné pipetování.
	Fluorescenční próby nebo primery jsou degradovány.	Použijte čerstvý Primer-Probe-Mix Zabraňte osvětlení a častému zamrazování a rozmrazování. Zkontrolujte podmínky skladování!
	Bublinky v PCR reakčních zkumavkách / zbytky roztoku na vnitřních stěnách zkumavky.	Pečlivě pipetujte. Stočte PCR desku.
	Nekompatibilní nebo nekvalitní spotřební plast.	Použijte kompatibilní a vysoce kvalitní spotřební plast (viz kapitola 3.3).
	Vypaření reagensů díky nesprávnému uzavření reagenčních zkumavek.	Ujistěte se, že zkumavky jsou správně uzavřeny. Buďte opatrní na krajích přelepovací fólie.
Signál v negativní kontrole	RNA nebo DNA kontaminace negativní kontroly	Zopakujte negativní kontrolu. Dekontaminujte pracovní prostor.

12. OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU A NA VÝROBCÍCH

TaqMan® je ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems Inc.
Cal Fluor® je ochranná známka společnosti LGC Biosearch Technologies

13. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH

	Dostatečné pro N testů
	Teplota skladování / spodní hranice teploty
	Teplota skladování / Omezení teploty
	Spotřebujte do
	Viz návod k použití
	Výrobce
CONT	Obsah, obsahuje
CONTROL +	Pozitivní kontrola
IFU	Návod k použití
LOT	Číslo šarže
LYOPH	Lyofilizované
REF	Katalogové číslo
RUO	Pouze pro výzkumné účely
ViroQ ENZYME	Směs enzymů pro výrobky ViroQ
ViroQ MIX	Směs primerů pro výrobky ViroQ
ViroQ SOLV	Rozpouštědlo pro Směs enzymů ViroQ
	POZOR! H302: Poškozující při požití. H412: Poškozující pro život ve vodě s dlouhotrvajícími účinky.
	Zdravotní nebezpečí H371: Může poškodit centrální nervový systém. Způsob expozice: Orální

14. LITERATURA

Victor M Corman, Christian Drosten et.al.(2020), Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, Euro Surveill. 2020;25(3);pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

Institut Pasteur Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2.
https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2

Více informací naleznete na našich webových stránkách <http://www.bag-diagnostics.com>

Návody k použití v jiných jazycích na: <http://www.bag-diagnostics.com> nebo přímo na info@bag-diagnostics.com nebo telefonu +49 (0)6404-925-125