

CZ**Návod k použití****ViroQ SARS-FluA/B-RSV**

Test pro kvalitativní průkaz RNA SARS-CoV-2, chřipky A, chřipky B a RSV

Elektronické verze návodů k použití naleznete na www.bag-diagnostics.com

REF	kat.č.	728267	ViroQ SARS-FluA/B-RSV	96 testů
REF	kat.č.	728268	ViroQ SARS-FluA/B-RSV	480 testů

Pro použití s		
Typ vzorku	Soupravy pro RNA extrakci / přístroje pro automatickou extrakci	Real-time PCR přístroje
Sputum (LRT)	QIAGEN EZ1 Virus Mini Kit V2.0 Thermo Fisher Thermo KingFisher MagMAX Viral/PathogenNucleic Acid Isolation Kit	Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Nosohltanové stěry (NP)		
Oropharyngeální stěry (OP)		Roche LightCycler® 480 System II
Stěry z nosu		Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR- System 96-Well Fast, laptop
Stěry z přední části nosu		
Stěr ze středu dutiny nosní		

Důležitá poznámka: pro některé cykléry je potřeba provést pro práci se se soupravou ViroQ SARS-FluA/B-RSV barevnou kompenzaci nebo kalibraci barev. Prosíme, zkontrolujte průběžně aktualizovaný seznam na naší webové stránce. Seznam zobrazíte kliknutím na tlačítko „Cycler Settings“ na stránce: <https://www.bag-diagnostics.com/en/sars-cov-2-en.html>

Verze: 1/2020 / Publikováno: 2020-12

Obsah

1. POUŽITÍ	3
2. POPIS VÝROBKU	3
3. PRINCIP TESTU.....	3
4. MATERIÁL.....	4
4.1 Obsah ViroQ SARS-FluA/B-RSV kit.....	4
4.2 Další potřebné reagentie a přístroje	4
4.3 Validované cykléry a reakční zkumavky.....	5
5. SKLADOVÁNÍ A STABILITA.....	5
6. PRŮBĚH TESTU	6
6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky	6
6.2 Izolace RNA.....	6
6.3 Příprava reagentů.....	6
6.4 Amplifikace	6
6.5 Interpretace výsledků.....	8
7. VÝKONNOST A CHARAKTERISTIKA TESTU	10
7.1 Limity detekce.....	10
7.2 Klinická studie.....	11
7.3 Zkřížená reaktivita.....	12
8. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ	13
9. OMEZENÍ METODY	14
10. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY	14
11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ.....	15
12. OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU A NA VÝROBCÍCH.....	15
13. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH.....	16
14. LITERATURA	17

1. POUŽITÍ

Souprava ViroQ SARS-FluA/B-RSV Kit slouží pro kvalitativní průkaz RNA virů SARS-CoV-2, chřipka A, chřipka B a RSV (Respiratory Syncytial Virus) ve vzorcích z dýchacího traktu, jako jsou sputum (LRT), nosohltanové (NP) oropharyngeální (OP), nosní, přední nosní a střední nosní stěry pomocí reverzní transkripce RNA a následné amplifikace pomocí real-time PCR. Test musí být prováděn pouze kvalifikovanými zaměstnanci ve specializovaných laboratořích.

2. POPIS VÝROBKU

Souprava ViroQ SARS-FluA/B-RSV Kit slouží pro *in vitro* průkaz RNA virů SARS-CoV-2, chřipka A, chřipka B a RSV (Respiratory Syncytial Virus) ve vzorcích z dýchacího traktu jako jsou sputum (LRT), nosohltanové (NP), oropharyngeální (OP), nosní, přední nosní a střední nosní stěry. Souprava je založena na jedнокrokové reakci pomocí technologie real-time PCR. Kombinace efektivní syntézy cDNA z RNA následovaná real-time PCR, umožňuje v soupravě ViroQ SARS-FluA/B-RSV provést test v jediné zkumavce. Test obsahuje primery a fluorescenční próby pro amplifikaci a detekci genových fragmentů SARS-CoV-2, chřipka A, chřipka B a RSV. 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. Pro SARS-CoV-2 jsou amplifikovány geny RdRP (RNA-dependent RNA-Polymerase) a N (Nucleocapsid) (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-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_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;));). Pro chřipku typu A je amplifikován segment genu Matrix (M1, Segment 7), pro chřipku typu B je amplifikován gen pro nestrukturální proteinový segment (NS1) a konečně pro RSV je amplifikován gen N (Nucleocapsid). 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 real-time PCR cykléru.

Test se provádí v jediné PCR reakci, ve které jsou detekovány dva geny SARS-CoV-2 a to RdRP a N, dále segment genu Matrix (M1) chřipky typu A, segment genu pro nestrukturální protein (NS1) pro chřipku typu B, gen N pro RSV a konečně univerzálně exprimovaný lidský „housekeeping“ gen (Rnase P) pomocí různých fluorescenčních barev. Průkaz Rnazy P potvrzuje, že byl správně proveden odběr vzorku, izolace RNA a RT-PCR amplifikace.

4. MATERIÁL

4.1 Obsah ViroQ SARS-FluA/B-RSV kit

- **ViroQ | ENZYME** **ViroQ Enzyme**, enzym, lyofilizovaný, obsahuje reverzní transkriptázu, Taq polymerázu a dNTPs
- **ViroQ | SOLV** **ViroQ Solvent**, rozpouštědlo, připraveno k použití, obsahuje rekonstituční pufr pro ViroQ Enzyme
- **ViroQ | MIX | FSR** **ViroQ Mix FSR**, připraven k použití, primery, próby, reakční pufr
- **ViroQ | CFX | IC | MIX** **ViroQ CFX IC-Mix**, obsahuje próby pro vnitřní kontrolu a fluorofor vhodný pro RT cyklér CFX
- **ViroQ | LC | IC | MIX** **ViroQ LC IC-Mix**, obsahuje próby pro vnitřní kontrolu a fluorofor vhodný pro RT cyklér LightCycler®
- **ViroQ | QS | IC | MIX** **ViroQ QS IC-Mix**, obsahuje próby pro vnitřní kontrolu a fluorofor vhodný pro RT cyklér QuantStudio
- **ViroQ | FSR | CONTROL | +** **ViroQ Pos Ctrl FSR**, pozitivní kontrola, sušená, obsahuje lidskou mRNA, referenční RNA viru
- **IFU | OR | eIFU** **Návod k použití nebo elektronický návod k použití**

4.2 Další potřebné reagensie a přístroje

- Reagensie 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)
- H₂O bez RNáz
- Pístové pipety a špičky (0,5 – 1000 µl)
- Kolor-kompenzační souprava pro LightCycler® 480 I+II, 2.0 (REF) kat.č. 728258 ViroQ CC Light Cycler®, dodává BAG Diagnostics)
- Kolor-kompenzační souprava pro QuantStudio, StepOne, ABI 7500, ViiA7 (REF) kat.č. 728260 RT CC Universal Applied Biosystems®, dodává BAG Diagnostics)

4.3 Validované cykléry a reakční zkumavky

Cyklér	Real-time-PCR reakční zkumavky	Real-time-PCR uzavírací systémy
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Comp. Bio-Rad	Vari-Strip™ 8 Well PCR Tube Strips Product No. 4ti-0753 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences	Crystal Strips™ Product No. 4ti-0755/120 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences
	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, Low Profile, 96 white wells, black frame Product No. 4ti-1201 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences	
	Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, Low Profile, thin wall, skirted, white/white Product No. HSP9655 Comp. Bio-Rad	0.2 ml Flat PCR Tube 8-Cap Strips, optical, ultraclear, Product No. TCS0803 Comp. Bio-Rad
LightCycler® 480 System II Comp. Roche	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white Product No. 04729692001 Comp. Roche	qPCR Seal Product No. 4ti-0560 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences
QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast, laptop Comp. Applied Biosystems	Vari-Strip™ 8 Well PCR Tube Strips Product No. 4ti-0753 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences	Crystal Strips™ Product No. 4ti-0755/120 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences
	FrameStar® 96 Well Semi-Skirted, PCR Plate, ABI® FastPlate Style, white wells, clear frame Product No. 4ti-0911 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences	qPCR seal, Product No. 4ti-0560 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences

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 výkonnost testu. Pokud se chystáme využívat soupravu postupně, je dobré připravit aliquoty reagentií.

6. PRŮBĚH TESTU

6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky

Molekulárně genetické metody jsou velmi citlivé a musí být prováděny pouze dobře zaškolenými osobami se zkušenostmi 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, reagensie 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 používat pro izolaci RNA CE IVD certifikované soupravy.

Validované soupravy pro izolaci RNA:

- QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini QIAcube Kit
- QIAGEN EZ1 Virus Mini Kit V2.0
- Thermo Fisher Thermo KingFisher MagMAX Viral/PathogenNucleic Acid Isolation Kit

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

6.3 Příprava reagensií

ViroQ Enzyme

Enzymový mix ViroQ Enzyme je lyofilizovaný. Před použitím musí být rozpuštěn ve 400µl rozpouštědla ViroQ Solvent. Rozmíchejte pipetou pipetováním nahoru a dolů.

ViroQ Pos Ctrl FSR

Pozitivní kontrola ViroQ Pos Ctrl FSR je usušená. Před použitím musí být rozpuštěna v 30µl H₂O bez RNáz. Rozmíchejte pipetou pipetováním nahoru a dolů, umožněte úplnou rehydrataci po dobu 15ti minut a pak znovu promíchejte vortexováním.

6.4 Amplifikace

Použity by měly být reakční zkušavky doporučené výrobcem nebo materiál doporučený v kapitole 4.3.

Pro každý vzorek napipetujte do reakční zkumavky následující množství reagensů:

4 µl	ViroQ Enzyme
2 µl	ViroQ Mix FSR (primery a próby)
2 µl	ViroQ IC-Mix* (próby) / CFX nebo LC nebo QS
5 µl**	vzorek RNA
7 µl	H ₂ O bez RNáz

* CFX96 Touch™ Real-Time PCR: ViroQ CFX IC-Mix
 LightCycler® 480 System II: ViroQ LC IC-Mix
 QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast, laptop: ViroQ QS IC-Mix

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

Speciální poznámka: Interní amplifikační kontrola bude detekována v různých barevných kanálech v závislosti na použitém real-time PCR cykléru. Je tedy nutno použít k danému real-time PCR cykléru odpovídající ViroQ IC-Mix, protože jednotlivé ViroQ IC-Mix obsahují próby pro interní amplifikační kontrolu značenou rozdílnými flouorofory. Prosím zkontrolujte filtry vašeho real-time PCR cykléru. Vlnové délky jednotlivých fluoroforů jsou uvedeny v tabulce v kapitole [6.5 Interpretace výsledků](#).

Reakční objem pro každý real-time PCR test je 20 µl.

Pokud připravujete premix ViroQ Enzyme, ViroQ Mix FSR, ViroQ CFX/LC/QS IC-Mix a H₂O bez RNáz pro více než jeden vzorek, přidejte navíc rozumné množství s ohledem na ztráty při pipetování.

Pro provedení **pozitivní kontroly (PTC)** použijte ViroQ Pos Ctrl FSR místo vzorku RNA.

Pro provedení **negativní kontroly (no template control /NTC)** připravte PCR reakci s vodou bez RNAs místo vzorku 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.

Spustěte PCR program s následujícími parametry:

Krok	Čas	Teplota	Počet cyklů
Reverzní transkripce	15 min	48°C	1 cyklus
Aktivace polymerázy	3 min	96°C	1 cyklus
Denaturace	3 sec	95°C	42 cyklů
Anealing + Extenze	15 sec + čtení	60°C	

Pro soupravu ViroQ SARS-FluA/B-RSV byly validovány následující cykléry:

Biorad: CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System

Roche: LightCycler® 480 System II

Applied biosystems: QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast, laptop

Speciální poznámka:

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

6.5 Interpretace výsledků

Posouzení výsledků testu klinických vzorků by mělo být provedeno poté, co byly pozitivní a negativní kontroly prozkoumány a stanoveny jako platné a přijatelné. Pokud kontroly nejsou platné, výsledky pacienta nelze interpretovat.

Pro všechny reakce v multiplexové PCR jsou pro určení positivity využívány definované hodnoty Ct cut-off. Pokud je hodnota Ct nejasná, může v rozhodování pomoci kontrola tvaru fluorescenční křivky.

Všechny testy, kromě negativní kontroly (NTC), musí vykazovat pozitivní fluorescenční signál v kanálu, kde se nachází interní kontrola. SARS-CoV-2 pozitivní vzorky musí vykazovat pozitivní signál v kanálu FAM channel (RdRP gen & N gen). Vzorky pozitivní pro chřipku musí vykazovat pozitivní signál buďto v kanálu CFO560 / HEX / VIC / JOE nebo v kanálu Q670 / CY5 (M1 nebo NS1). RSV pozitivní vzorky musí vykazovat pozitivní signál v kanálu CFR610 / Texas Red / ROX (N gen). Pozitivní kontrola musí vykazovat amplifikační signál v každém kanálu uvnitř definovaných Ct hodnot.

Barevný kanál	Specifita
FAM	SARS-CoV-2 / RdRP Gen (RNA-dependend RNA-Polymerase) & N gen (Nucleocapsid)
CFO560 / HEX / VIC / JOE	Chřipka A (H1N1pdm09 & H3N2) / Matrix segment (M1)
Q670 / CY5	Chřipka B (Yamagata & Victoria) / nestrukturální segment proteinu (NS1)
CFR610 / Texas Red / ROX	RSV / N Gen (Nucleocapsid)
Atto425 / Q705 / TAMRA	Buněčná kontrola / Rnase P

Amplifikační signál negativní kontroly pro jednotlivé specifity negativních vzorků musí být mimo definovanou oblast hodnot Ct pro odpovídající barevné kanály.

Negativní kontrola (NTC) je použita jako kontaminační kontrola. Pokud se dostane nechtěně RNA nebo amplikony do NTC, objeví se pozitivní signál. Pokud je Ct menší než 35, je třeba to považovat za možnou kontaminaci. Amplifikační signál větší než Ct 35 může být PCR artefaktem a lze ho pominout v závislosti na finálním RTU a tvaru křivky (viz níže interpretace výsledků s Ct mezi 35 a 42). Pokud máme podezření na kontaminaci PCR, je vhodné postupovat podle místních dekontaminačních zásad a vyměnit reagenty.

Pro všechny validní výsledky jsou hodnoty Cq ≤ 35 jsou považovány za pozitivní (viz tabulka níže)

	Channel/kanál	Ct-Level / hodnota Ct	Inspect / kontrola	Vlnová délka v nm
RSV	Red-červený (CFR610)	≤ 35	>35-42	Excitace: 690 Emise: 705
SARS-CoV-2	Green-zelený (FAM)	≤ 35	>35-42	Excitace: 495 Emise: 520
Chřipka typu A	Orange-oranžový (CFO560)	≤ 35	>35-42	Excitace: 538 Emise: 559
Chřipka typu B	Red-červený (Q670)	≤ 35	>35-42	Excitace: 647 Emise: 670
Buněčná kontrola s ViroQ CFX IC-Mix	Red-červený (Q705)	$\leq 35^*$	>35-42**	Excitace: 590 Emise: 610
Buněčná kontrola s ViroQ LC IC-Mix	Blue-modrý (Atto425)	$\leq 35^*$	>35-42**	Excitace: 437 Emise: 483
Buněčná kontrola s ViroQ QS IC-Mix	Red-červený (TAMRA)	$\leq 35^*$	>35-42**	Excitace: 557 Emise: 591

*Vysoká virová koncentrace/nálož ve vzorku může vést k oslabení nebo i zmizení signálu buněčné kontroly.

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

Nezávisle na hodnotě Ct musí mít křivka pozitivní reakce sigmoidální tvar a přijatelné konečné RFU. Hodnota RFU je závislá na použitém cykléru, koncové RFU pozitivní kontroly lze použít jako přibližnou hodnotu pro normální finální RFU daného cykléru. Pozitivní kontrolu lze také použít jako vzor správné sigmoidální křivky. Z toho plyne, že u vzorků s hodnotou Ct > 35 a nízkou hodnotou RFU, je nutné zkontrolovat tvar křivky pro ověření důvěryhodnosti reakce. Vzorky s nejasnými výsledky je nutno opakovat a reinterpretovat. Pokud máte otázky k úpravě prahu nebo k hraničním hodnotám Cq neváhejte kontaktovat podporu BAG Diagnostics na telefoním čísle: +49 (0)6404 925 125 nebo emailem na info@bag-diagnostics.com nebo kontaktujte vašeho obchodního zástupce.

The positive control **ViroQ Pos Ctrl FSR** must be positive for all four viruses detected with the kit. The expected Ct values for the positive control are summarized in the following table:

Specifita	Kanál	Rozsah Ct
RSV	Red-červený (CFR610)	28-36
SARS-CoV-2	Green-zelený (FAM)	25-33
chřipka A	Orange-oranžový (CFO560)	28-35
chřipka B	Red-červený (Q670)	28-35
Buněčná kontrola	Red-červený (Q705) / Blue-modrý (Atto425) / Red-červený (TAMRA)	28-35

Následující tabulka ukazuje interpretaci amplifikačních výsledků:

FAM SARS-CoV2	CFO560 chřipka A	Q670 chřipka B	CFR610 RSV	Atto425 / Q705 /TAMRA Buněčná kon.	Výsledek
+	-	-	-	+*	Detekována SARS-CoV-2 specifická RNA.
-	+	-	-	+*	Detekována specifická RNA chřipky A
-	-	+	-	+*	Detekována specifická RNA chřipky B
-	-	-	+	+*	Detekována specifická RNA viru RSV
+	+	-	-	+*	Detekována specifická RNA SARS-CoV-2 a chřipky A
+	-	+	-	+*	Detekována specifická RNA SARS-CoV-2 a chřipky B
+	-	-	+	+*	Detekována specifická RNA SARS-CoV-2 a RSV
-	+	+	-	+*	Detekována specifická RNA chřipky A a chřipky B
-	+	-	+	+*	Detekována specifická RNA chřipky A a RSV
-	-	+	+	+*	Detekována specifická RNA chřipky B a RSV
-	-	-	-	+	Není detekována specifická RNA SARS-CoV-2, ani chřipky A, ani chřipky B a ani RSV. Vzorek neobsahuje dostatečné množství kopií (LoD) specifické RNA.
-	-	-	-	-**	Neplatný výsledek způsobený inhibicí real-time PCR nebo selháním činidla. Opakujte izolaci a / nebo testování RNA z původního vzorku.

* Vysoká virová koncentrace / nálož 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. VÝKONNOST A CHARAKTERISTIKA TESTU

Kombinace primerů a prób zaručuje spolehlivou identifikaci specifické RNA virů SARS-CoV-2, chřipky A, chřipky B a/nebo RSV. Přesnost a opakovatelnost výsledků je verifikována pro každou šarži pomocí pre-typovaných referenčních vzorků.

7.1 Limity detekce

Nejnižší koncentrace RNA virů SARS-CoV-2, chřipky A, chřipky B a RSV, která je ještě detekována s pravděpodobností 95% nebo vyšší, určuje limity detekce (Limit of Detection (LoD)). LoD byla stanovena pomocí 5ti různých ředění virové RNA, každé ředění bylo testováno 20krát. Podle tohoto

experimentu je analytická citlivost soupravy ViroQ SARS-FluA/B-RSV RT-PCR při použití cykléru LightCycler® 480 II System **5-7 kopií na 20 µl reakce**.

SARS-CoV-2: **5 kopií / 20 µl reakce**
 chřipka A: **6 kopií / 20 µl reakce**
 chřipka B: **7 kopií / 20 µl reakce**
 RSV: **7 kopií / 20 µl reakce**

7.2 Klinická studie

Evaluační studie pro soupravu ViroQ SARS-FluA/B-RSV byla provedena s 165 pre-typovanými vzorky RNA. Bylo testováno 91 pre-typovaných vzorků RNA SARS-CoV-2 a 74 pre-typovaných vzorků RNA chřipky A, chřipky B a RSV. Výsledky studie byly porovnány s výsledky testů, které byly získány v klinické laboratoři v rutiním testování pomocí testovacích souprav jiného výrobce. Neshodné výsledky byly vyřešeny pomocí třetího testu a několika opakování. Závěrečné výsledky byly použity pro výpočet diagnostické senzitivity a specifity.

Výsledky pro SARS-CoV-2:

Bylo testováno 91 vzorků na průkaz SARS-CoV-2.

		Referenční test	
		Pozitivní	Negativní
ViroQ SARS-FluA/B-RSV	Pozitivní	39	0
	Negativní	0	52

Diagnostická specificita: 100%
 Diagnostická senzitivita: 100%

Výsledky pro chřipku A:

Bylo testováno 74 vzorků na průkaz chřipky A. Dva vzorky byly nepoužitelné a byly vyřazeny z hodnocení, jeden vzorek byl vyřazen z hodnocení z důvodů problémů při přepravě.

		Referenční test	
		Pozitivní	Negativní
ViroQ SARS-FluA/B-RSV	Pozitivní	30	0
	Negativní	1*	40

Diagnostická specificita: 100%
 Diagnostická senzitivita: 96,8%

* 1 vzorek byl otestován jako falešně negativní. Tento vzorek dával s ostatními soupravami slabě pozitivní výsledek s CT > 38

Výsledky pro chřipku B:

Bylo testováno 74 vzorků na průkaz chřipky B. Dva vzorky byly nepoužitelné a byly vyřazeny z hodnocení, jeden vzorek byl vyřazen z hodnocení z důvodu problémů při přepravě.

		Referenční test	
		Pozitivní	Negativní
ViroQ SARS-FluA/B-RSV	Pozitivní	10	0
	Negativní	0	61

Diagnostická specificita: 100%
 Diagnostická senzitivita: 100%

Výsledky pro RSV:

Bylo testováno 74 vzorků na průkaz chřipky RSV. Dva vzorky byly nepoužitelné a byly vyřazeny z hodnocení, jeden vzorek byl vyřazen z hodnocení z důvodu problémů s přepravou.

		Referenční test	
		Pozitivní	Negativní
ViroQ SARS-FluA/B-RSV	Pozitivní	26	0
	Negativní	0	45

Diagnostická specifická: 100%

Diagnostická senzitivita: 100%

7.3 Zkřížená reaktivita

Analýza *in silico* ukázala, že cílové oblasti genů virů prokazovaných pomocí soupravy ViroQ SARS-FluA/B-RSV nemají zkříženou reaktivitu s původci dalších respiračních onemocnění.

Pro ověření analytické specifity a exkluzivity soupravy ViroQ SARS-FluA/B-RSV byl použit kontrolní panel 22 respiračních patogenů (obsahující nepoškozené virové částice a bakteriální buňky). Z každého poolu z panelu byla extrahována RNA (viz tabulka níže) a otestována pomocí soupravy ViroQ SARS-FluA/B-RSV.

Kontrolní respirační panel					
	Směs (Pool) 1	Směs (Pool) 2	Směs (Pool) 3	Směs (Pool) 4	Směs (Pool) 5
Adenovirus Type 3	✓				
Coronavirus OC43	✓				
Human Metapneumovirus (Peru6-2003)**	✓				
Parainfluenza Type 2	✓				
<i>B. pertussis</i> (A639)	✓				
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)					✓

Výsledky testů s panelem respiračních chorob	
Flourescenční panel specifický pro:	Flourescenční signál při amplifikaci s RNA izolovanou z kontrolního panelu pro daný barevný kanál
SARS-CoV-2 RNA	Žádný flourescenční signál s RNA ze všech jednotlivých směsí (pool)
chřipka A RNA	Pouze flourescenční signál s RNA ze směsi obsahující chřipku A. Žádný flourescenční signál s RNA z ostatních směsí.
chřipka B RNA	Flourescenční signál s RNA ze směsi obsahující chřipku B. Žádný flourescenční signál s RNA z ostatních směsí.
RSV RNA	Flourescenční signál s RNA ze směsi obsahující RSV. Žádný flourescenční signál s RNA z ostatních směsí.

8. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

Souprava ViroQ SARS-FluA/B-RSV je určena 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 13 pro více informací.

Biologický 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).

Biologický 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 reagentů při tvorbě aliquotů. Doporučujeme používat sterilní jednosměrné pipety a špičky. Zakalené reagenty a/nebo reagenty 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.

Přítomnost inhibitorů RNA může vést ke špatným výsledkům s touto soupravou. Negativní výsledky nevylučují možnou infekci, neboť jsou závislé na vhodném odběru vzorků, absenci inhibitorů a definovaném LoD.

Extrémní opatrnost je nutná k zabránění kontaminace reagensů a dalšího laboratorního materiálu a vybavení amplikony, DNA nebo RNA. Pravidelné střevé 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 ($C_t > N.A.$). V případě, že se objeví v negativní kontrole signál, prosím postupujte podle kapitoly 6.5 a pokud situace ukazuje na kontaminaci, je třeba dekontaminovat pracovní prostor PCR a vyměnit reagensie.

Veškeré nástroje a přístroje (t.j. pipety, RT-cykléry atd.) musí být kalibrovány podle pokynů výrobce. Negativní výsledek není důkazem nepřítomnosti infekce SARS-CoV-2, chřipkou A, chřipkou B nebo RSV a neměl by být brán jako jediné vodítko pro rozhodnutí o zacházení s pacientem. Negativní výsledky je vždy nutno kombinovat s klinickým pozorováním, historií pacienta a epidemiologickými informacemi.

10. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY

Interní kontrolu kvality nové šarže soupravy ViroQ SARS-FluA/B-RSV lze provést pomocí kombinace RNA vzorků, u kterých víme, zda jsou pozitivní či negativní pro jednotlivé viry. Doporučujeme provádět negativní kontrolu pro vyloučení možné kontaminace. Využijte pro ni PCR s vodou bez RNAzy jako NTC.

11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Projev	Možná příčina	Možné/á řešení
Špatný nebo žádný signál	Přítomnost inhibitoru.	Použijte čisté reagenty.
	Nepřítomnost RNA v reakci.	Zopakujte test. Buďte pozorní na správné pipetování.
	Fluorescenční próby nebo primery jsou degradovány.	Použijte čerstvý ViroQ 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 4.3).
	Vypaření reagentů 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

Quasar® je registrovaná ochranná známka společnosti LGC Biosearch Technologies

13. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH

VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH	
	Dostatečné pro n testů
	Teplota skladování / Spodní hranice teploty
	Spotřebujte do
	Viz návod k použití
	Výrobce
DRY	Sušené
CONT	Obsah, obsahuje
FSR CONTROL +	Pozitivní kontrola pro ViroQ SARS-FluA/B-RSV
IFU	Návod k použití
OR	nebo
eIFU	Elektronický Návod k použití
IVD	Pro in vitro diagnostické použití
LOT	Číslo šarže
LYOPH	Lyofilizované
REF	Katalogové číslo
ViroQ ENZYME	Směs enzymů pro výrobky ViroQ
ViroQ MIX FSR	Primermix pro ViroQ SARS-FluA/B-RSV
ViroQ CFX IC MIX	Přídavný mix práb pro ViroQ SARS-FluA/B-RSV Pro použití s Real-time PCR-Cycler CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
ViroQ LC IC MIX	Přídavný mix práb pro ViroQ SARS-FluA/B-RSV Pro použití s Real-time PCR-Cycler LightCycler® 480 System II
ViroQ QS IC MIX	Přídavný mix práb pro ViroQ SARS-FluA/B-RSV Pro použití s Real-time PCR-Cycler QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast, laptop
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

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

Peter M. Howley, David M. Knipe; Fields Virology Emerging Viruses; Ausgabe 7; Wolters Kluwer Health, 2020; ISBN 1975112555, 9781975112554

Phoebe Lostroh; Molecular and Cellular Biology of Viruses; Ausgabe 1; CRC Press Inc, 2019; ISBN 978-0-8153-4523-7

van Elden LJ, van Loon AM, van der Beek A, Hendriksen KA, Hoepelman AI, van Kraaij MG, Schipper P, Nijhuis M.; Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults.; J Clin Microbiol. 2003 Sep;41(9):4378-81. doi: 10.1128/jcm.41.9.4378-4381.2003. Erratum in: J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):4308. PMID: 12958272; PMCID: PMC193825.

Peaper DR, Landry ML.; Rapid diagnosis of influenza: state of the art.; Clin Lab Med. 2014 Jun;34(2):365-85. doi: 10.1016/j.cll.2014.02.009. PMID: 24856533; PMCID: PMC7172071.

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 na telefonu +49 (0)6404-925-125