IVD CE

bosphore

# NÁVOD K POUŽITÍ

## SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens
Panel Kit v3

Pro *in vitro* diagnostiku

MB610v9f
24. srpna 2026

Anatolia geneworks

**OBSAH**


1. POPIS PRODUKTU ..... 2
2. OBSAH ..... 2
3. SKLADOVÁNÍ ..... 3
4. POŽADOVANÉ MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ ..... 3
5. DŮLEŽITÉ POZNÁMKY A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY ..... 4
6. OMEZENÍ POUŽITÍ PRODUKTU ..... 4
7. INFEKCE ..... 4
8. METODA ..... 5
9. POSTUP ..... 6
   9.1. Extrakce DNA/RNA ..... 6
   9.2. Komponenty soupravy ..... 7
   9.2.1. Negativní kontrola ..... 7
   9.2.2. PCR Master Mix 1 ..... 7
   9.2.3. PCR Master Mix 2 ..... 7
   9.2.4. PCR Master Mix 3 ..... 7
   9.2.5. RT Mix ..... 7
   9.2.6. Vnitřní kontrola ..... 7
   9.2.7. Pozitivní kontrola ..... 8
   9.3. Příprava PCR ..... 8
   9.4. Programování přístroje pro Real-Time PCR ..... 9
10. ANALÝZA ..... 10
11. SPECIFIKACE ..... 14
   11.1. Citlivost ..... 14
   11.2. Křížová reaktivita ..... 15
12. REFERENCE ..... 16
13. SYMBOLY ..... 16
14. INFORMACE K OBJEDNÁNÍ ..... 16
15. KONTAKTNÍ INFORMACE ..... 16

## 1. POPIS PRODUKTU

Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 je Real-Time PCR souprava pro *in vitro* diagnostiku, která detekuje a charakterizuje specifikované genové oblasti následujících patogenů z lidských respiračních vzorků, včetně nazofaryngeálních a orofaryngeálních stěrů, bronchoalveolární laváže (BAL), sputa a slin. Detekce fluorescence je prováděna pomocí filtrů FAM, HEX, Texas RED a Cy5.

| **Komponent** | **FAM** (Gen) | **HEX** (Gen) | **Texas RED** (Gen) | **Cy5** (Gen) |
|---|---|---|---|---|
| PCR Master Mix 1 | SARS-CoV-2 (gen Orf1ab/N) | RSV A/B (M gen) | Chřipka A (MP2) | Chřipka B (Segment 8/NS1) |
| PCR Master Mix 2 | Enterovirus (5 'UTR) | Lidský metapneumovirus A/B (nukleoprotein) | Vnitřní kontrola (RNase P) | Adenovirus (gen Hexonu) |
| PCR Master Mix 3 | Parainfluenza 1/2/3/4 (HN gen/N gen/F glykoprotein/HN gen) | Rhinovirus (5 'UTR) | *Legionella pneumophila* (*MIP*) | *Mycoplasma pneumoniae* (*Adhesin P1*) |

Byla použita vnitřní kontrola založená na detekci lidské endogenní nukleové sekvence (RNázy P) přítomné v lidském genomu k ověření extrakce nukleových kyselin, PCR inhibice a chyb odběru vzorků či aplikace. Data o zesílení vnitřní kontroly jsou detekována pomocí filtru Texas RED pouze pro PCR Master Mix 2.

## 2. OBSAH

Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 obsahuje následující $dH_2O$, Real-Time PCR Master Mixes, RT Mix a pozitivní kontroly.

| **Komponent** | **Činidlo** | **100 reakcí** | **50 reakcí** | **25 reakcí** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | $dH_2O$ | (1 000 µL) | (1 000 µL) | (1 000 µL) |
| 2 | PCR Master Mix 1 | (2 816 µL) | (1 408 µL) | (704 µL) |
| 3 | PCR Master Mix 2 | (2 816 µL) | (1 408 µL) | (704 µL) |
| 4 | PCR Master Mix 3 | (2 816 µL) | (1 408 µL) | (704 µL) |
| 5 | RT Mix | (132 µL) | (66 µL) | (33 µL) |
| 6 | Pozitivní kontrola 1 | (260 µL) | (130 µL) | (130 µL) |
| 7 | Pozitivní kontrola 2 | (260 µL) | (130 µL) | (130 µL) |
| 8 | Pozitivní kontrola 3 | (260 µL) | (130 µL) | (130 µL) |

## 3. SKLADOVÁNÍ

PCR činidla pro panel Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 by měla být skladována v -20 °C. Opakované rozmrazování a zmrazení (>3x) by se mělo vyhnout, protože může snížit citlivost. Pokud mají být komponenty používány v malém množství, měly by být zmrazeny v aliquotech. Při přípravě PCR by komponenty neměly být vystaveny pokojové teplotě déle než 10 minut a komponenty PCR master mixu by neměly být vystaveny světlu nebo vzduchu více, než je nutné. Lahvičky musí být zavřené, kromě období pipetování. Doporučujeme připravovat PCR na chladicím bloku a uchovávat PCR master mix v uzavřené nádobě. Pokud jsou složky skladovány podle doporučených podmínek, zůstanou stabilní až do dat expirace uvedených na etiketách.

## 4. POŽADOVANÉ MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ

- Montania 4896 Real-Time PCR přístroj – Anatolia Geneworks, CFX96 Real-Time PCR Detection System - Bio-Rad, QuantStudio 5 Real-Time PCR System – ThermoFisher, LightCycler 480 Instrument II – Roche, Q qPCR Cycler - Quantabio, nebo jiný Real-Time PCR systém s FAM, HEX, Texas RED, Cy5 filtry*
- 0,1 mL nebo 0,2 mL tenkostěnné PCR zkumavky, PCR destičky nebo stripy
- Extrakční systém Unio B24 nebo Unio B48 extrakční systém, nebo PCR setup systém Unio A24S a sada pro extrakci bakteriální DNA Unio nebo sada pro extrakci virální DNA/RNA Unio 600 µl, systém extrakce a PCR setup Unio 96 a univerzální sada pro extrakci nukleových kyselin Unio 96, extrakční systém Unio M32 a sada pro extrakci virové DNA/RNA Unio M32, Magrev 24 Manuální magnetický kuličkový extrakční stojan nukleových kyselin a Magrev univerzální sada pro extrakci nukleových kyselin nebo Magrev sada pro extrakci virové DNA/RNA či Magrev sada pro extrakci bakteriální DNA, sada pro extrakci virové DNA, sada pro extrakci virové RNA, sada pro extrakci virové DNA/RNA nebo univerzální sada pro extrakci nukleových kyselin nebo sada pro extrakci bakteriální DNA v2 nebo Magnesia 16 přístroj pro extrakci nukleové kyseliny a Magnesia virový DNA Kit pro extrakci RNA EP (Anatolia Geneworks) nebo jiné vysoce kvalitní sady a systémy pro extrakci nukleových kyselin
- Mrazák (-20 °C)
- Stolní centrifuga s rotorem pro mikrocentrifugační zkumavky o objemu 2 mL nebo 1,5 mL
- DNáza, RNáza, pyrogeny bezpyrogenní mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 mL nebo 2 mL
- Kalibrované, nastavitelné mikropipety
- DNáza, RNáza, špičky mikropipety bez pyrogenů s filtry
- Jednorázové laboratorní rukavice, pláště a čepice

*Pro další zařízení pro PCR v reálném čase, která lze použít s Bosphore SARS-CoV-2/Panel Kit pro respirační patogeny v3, kontaktujte prosím Anatolia Geneworks na základě informací v sekci 15.

## 5. DŮLEŽITÉ POZNÁMKY A BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

- Produkt by měl být doručen na suchém ledu. Při příjezdu zkontrolujte přítomnost suchého ledu.
- Při doručení zkontrolujte datum spotřeby na obalu a etiketě zkumavky. Nepoužívejte prošlé produkty ani komponenty.
- Měly by být použity kalibrované nebo ověřené mikropipety, DNáza, RNáza a hroty mikropipety bez pyrogenů s filtry a mikrocentrifugy bez DNázy, RNázy a pyrogenu.
- Před zahájením testovacího procesu by měly být všechny komponenty důkladně rozmrazeny. Po rozmrazení by měly být všechny komponenty krátce centrifugovány (odstředění na 3–5 sekund) a dobře promíchány, aby byla zajištěna homogenita před použitím.
- Komponenty sady by měly být uchovávány na ledu nebo na chladicím bloku, dokud není reakce připravena, a rychle vráceny na -20 ºC.
- PCR a extrakce nukleových kyselin musí být prováděny v různých komorách. Vzorky by měly být skladovány odděleně, aby se zabránilo kontaktu s komponentami sady.
- Informace o patogenech by měly být přezkoumány, aby bylo možné rozpoznat zdravotní rizika.
- S biologickými vzorky by mělo být zacházeno s maximální opatrností a v mikrobiologické bezpečnostní skříni odpovídající třídy. Fyzickému kontaktu s patogeny by se mělo vyvarovat nošením laboratorních plášťů a rukavic, bez ohledu na jídlo nebo pití v pracovním prostoru a zabráněním přístupu neoprávněných osob do pracovního prostoru.
- Po zpracování biologických vzorků by měly být všechny patogenní odpady vzniklé během extrakce nukleových kyselin, včetně materiálů s nimi do kontaktu, vyhozeny do lékařského odpadu a bezpečně zlikvidovány.

## 6. OMEZENÍ POUŽITÍ PRODUKTU

- Všechny komponenty mohou být použity výhradně pro *in vitro* diagnostiku.
- Tento produkt by měl být použit v souladu s tímto uživatelským manuálem.
- Tento produkt je určen pro personál speciálně vyškolený k provádění *in vitro* diagnostických postupů.

## 7. INFEKCE

Infekce dýchacích cest (RTI) jsou infekční onemocnění, která postihují dýchací cesty. RTI jsou klasifikovány jako infekce horních cest dýchacích (URI nebo URTI) a infekce dolních cest dýchacích

(LRI nebo LRTI). Infekce dolních cest dýchacích, jako je zápal plic, bývají mnohem závažnější než infekce horních cest dýchacích, například běžné nachlazení (Thapa et al., 2017).

Z klinického hlediska; příznaky jako nosní obstrukce, výtok z nosu, bolest v krku, kašel a podráždění krku patří k infekcím horních cest dýchacích, zatímco příznaky jako bronchitida a zápal plic patří k infekcím dolních cest (Nelson et al., 2022). Detekce patogenů ve vzorcích dýchacích cest pomocí Real-Time PCR umožňuje včasnou a přesnou diagnostiku infekcí dýchacích cest (Sundell et al., 2019).

RTI se může šířit čtyřmi hlavními způsoby přenosu: přímým kontaktem, nepřímým kontaktem/fomity, kapénkami a aerosolem (Leung, 2021). Respirační infekce zahrnují různorodou skupinu patogenů a zejména virové respirační infekce jsou nakažlivější (Harvard Health Publishing, n.d.). Virové příčiny respiračních infekcí zahrnují parainfluenzu 1, parainfluenzu 2, parainfluenzu 3, parainfluenzu 4, enterovirus, lidský metapneumovirus A/B, chřipku A, RSV A/B, bocavirus, rhinovirus, koronavirus 229E, koronavirus OC43, koronavirus NL63, koronavirus HKU1, pandemickou chřipku A (H1N1), parechovirus, adenovirus. Bakteriální příčiny respiračních infekcí zahrnují *Haemophilus influenza* typu B, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella longbeachae*, *Salmonella enterica*. Houbovými původci respiračních infekcí zahrnují oportunistické houbové patogeny, jako *je Pneumocystis jirovecii* (Thapa et al., 2017; Nelson et al., 2022; Sundell et al., 2019).

## 8. METODA

Bospore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 je založen na metodě Real-Time PCR. Polymerázová řetězová reakce je technika používaná k amplifikaci oblasti DNA. Reakce probíhá opakovanými cykly zahřívání a ochlazování. Hlavními složkami PCR jsou primery, dNTP, *Taq* DNA polymeráza (s vlastností horkého startu), pufrové roztoky a templáty. Stručně řečeno, primery jsou malé syntetické DNA, které nasedají do specifických oblastí templátu a zahajují syntézu, dNTP jsou stavebními kameny amplifikovaných produktů a *Taq* DNA polymeráza amplifikuje DNA templát. Nakonec pufrové roztoky zajišťují potřebnou úpravu pH pro reakci a templát, jak je uvedeno, je cílovou oblastí pro syntézu. Kromě těchto složek je v RT-PCR do reakce přidána reverzní transkriptáza a získává se syntéza cDNA z RNA templátu.

V Real-Time PCR technice, na rozdíl od konvenčního PCR, PCR produkty lze sledovat během reakce. Real-Time PCR tak eliminuje potřebu dalších analytických metod, jako je gelová elektroforéza, čímž se minimalizuje riziko kontaminace. Dvojitě značené sondy používané v reakci, kromě konvenčních PCR činidel, umožňují detekci amplifikovaného cíle s vyšší citlivostí.

Test využívá 5' exonukleázovou aktivitu *Taq* DNA polymerázy k štěpení dvojitě značené fluorescenční hydrolytické sondy během fáze extenze PCR. Sonda je na 5' konci označena fluorescenční 'reportérovou' molekulou a na 3' konci další fluorescenční molekulou, která působí jako 'pohasínač' pro 'reportéra'. Když jsou oba fluorofory poblíž a reportér je excitován světlem, nelze detekovat žádnou reportérovou fluorescenci. Během elongačního kroku PCR *Taq* DNA polymeráza narazí na sondu navázanou na templát a rozštípne ji. Jakmile je reportér osvobozen od potlačujícího účinku zhasínajícího faktoru, může být detekován fluorescenční signál. Fluorescence generovaná reportérem roste, jak se PCR produkt akumuluje; bod, kdy signál stoupá nad úroveň pozadí a stává se rozlišitelným, se nazývá prahový cyklus (CT). Existuje lineární vztah mezi logaritem počátečního množství DNA/RNA a jejím prahovým cyklem.

Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 využívá multiplex qPCR a systém zahrnuje vnitřní kontrolu pro kontrolu extrakčního postupu, PCR inhibice, odběru vzorků a aplikačních otázek.

Reakce probíhá ve třech PCR zkumavkách obsahujících PCR Master Mix 1, 2 a 3. Fluorescenční signál produkovaný vnitřním regulačním zesilováním je detekován pomocí filtru Texas RED v PCR Master Mix 2.

## 9. POSTUP

### 9.1. Extrakce DNA/RNA

Doporučujeme k dispozici systém pro extrakci Unio B24, nebo systém pro extrakci a PCR instalaci Unio A24S, sadu na extrakci bakteriální DNA Unio nebo sadu na extrakci virové DNA/RNA Unio 600 µl, systém pro extrakci a nastavení PCR systému Unio 96, univerzální sadu na extrakci nukleových kyselin Unio 96, systém extrakce Unio M32 a sadu na extrakci virové DNA/RNA Unio M32, Magrev 24 Manuální magnetický kuličkový extrakční stojan nukleové kyseliny a Magrev univerzální sada pro extrakci nukleových kyselin nebo Magrev sada pro extrakci virové DNA/RNA či Magrev sada pro extrakci bakteriální DNA, Bosphore sada pro extrakci virové DNA, Bosphore sada pro extrakci virové RNA, Bosphore sada pro extrakci virové DNA/RNA nebo univerzální sada pro extrakci nukleových kyselin nebo sada pro extrakci bakteriální DNA v2 nebo Magnesia 16 přístroj pro extrakci nukleové kyseliny a Magnesia virová DNA sada pro extrakci RNA EP (Anatolia Geneworks) nebo jiné vysoce kvalitní sady a systémy pro extrakci nukleových kyselin se používají s panelovou sadou Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3. Extrakce DNA/RNA by měla být provedena podle pokynů výrobce.

## 9.2. Komponenty soupravy

### 9.2.1. Negativní kontrola

Negativní kontrola je nezbytnou součástí panelové sady Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 pro Real-Time PCR.

Skládá se z destilované vody ($dH_2O$) a slouží jako referenční vzorek pro zajištění přesných výsledků detekcí případné kontaminace nebo chyb, které by mohly vést k falešně pozitivním výsledkům. Zahrnutí negativní kontroly a pečlivé sledování vám umožní s jistotou interpretovat svá data.

### 9.2.2. PCR Master Mix 1

PCR Master Mix 1 obsahuje vysoce specifickou a přesnou *Taq* DNA polymerázu (s vlastností hot-start), PCR pufry a směs dNTP. PCR Master Mix 1 také obsahuje přední a zpětné primery a dvojitě značené sondy specifické pro SARS-CoV-2, RSV A/B, chřipku A a chřipku B.

### 9.2.3. PCR Master Mix 2

PCR Master Mix 2 obsahuje vysoce specifickou a přesnou *Taq* DNA polymerázu (s vlastností hot-start), PCR pufry a směs dNTP. PCR Master Mix 2 také obsahuje přední a zpětné primery a duálně značené sondy specifické pro enterovirus, lidský metapneumovirus A/B, adenovirus a endogenní vnitřní kontrolu.

### 9.2.4. PCR Master Mix 3

PCR Master Mix 3 obsahuje vysoce specifickou a přesnou *Taq* DNA polymerázu (s vlastností hot-start), PCR pufry a směs dNTP. PCR Master Mix 3 také obsahuje přední a zpětné primery a dvojitě značené sondy specifické pro Parainfluenzu 1/2/3/4, Rhinovirus, *L. pneumophila* a *M. pneumoniae*.

### 9.2.5. RT Mix

RT Mix obsahuje vysoce kvalitní a výkonnostní směs reverzní transkriptázy a RNázového inhibitoru.

### 9.2.6. Vnitřní kontrola

Vnitřní kontrola, označovaná jako vnitřní kontrola vzorků, je založena na detekci endogenní sekvence lidských nukleových kyselin (RNáza P) přítomné v klinických vzorcích u lidí pomocí primerů a sondy obsažené v sadě ke kontrole odběru vzorku, extrakce DNA/RNA, inhibice PCR a aplikačních chyb. Absence amplifikace vnitřní kontroly v Texas RED filtru PCR Master

Mixu 2 v negativních vzorcích může naznačovat problém při odběru vzorků, extrakci nebo aplikaci, nebo že je PCR reakce inhibována.

**Pozor!** Neočekává se zvýšení vnitřní kontroly při externě přidané negativní kontrole v Real-Time PCR. Protože vnitřní kontrola může být potlačena u vzorků s vysokou bakteriální/virovou zátěží, doporučuje se použít negativní extrakční kontrolu (HSC) pro detekci vnitřní kontroly. Použitím vzorku negativního na patogeny detekované PCR Master Mixes se v každé sadě experimentů kontroluje schopnost sady správně detekovat RNázu P.

V tomto případě by měly být vzorky, extrakce a PCR zopakovány. Proto by měla být vnitřní kontrola amplifikace hodnocena podle tabulky v oddílu 10.

### 9.2.7. Pozitivní kontrola

Sada obsahuje 3 syntetické DNA pozitivní kontroly. Musí být zahrnuty do PCR reakce pro testování účinnosti reakce.

Pozitivní kontrola 1: syntetické DNA SARS-CoV-2, RSV A/B, INFLUENZA A a influenza B

Pozitivní kontrola 2: syntetický enterovirus, lidský metapneumovirus A/B, adenovirus a DNA RNázy P*

Pozitivní kontrola 3: syntetický lidský parainfluenzový virus typu 1/2/3/4, rhinovirus, *Legionella pneumophila* a *DNA* Mycoplasma pneumoniae

*Sada obsahuje endogenní vnitřní kontrolu. Kontrolována specifickými primery a sondami na RNázu P přítomnou v PCR Master Mix, RNáza P se také nachází v pozitivní kontrole. Očekává se zvýšení RNázy P v rámci pozitivní kontroly, v souladu s prahem kritérií přijetí (≤28).

Prahová hodnota $C_T$ pozitivní kontroly je uvedena v tabulce kritérií přijetí (sekce 10). Prahová hodnota $C_T$ pozitivní kontroly větší než horní hranice rozsahu v tabulce může naznačovat ztrátu výtěžnosti v reakci.

## 9.3. Příprava PCR

Pozitivní a negativní kontroly by měly být přidány do PCR reakce spolu se vzorky. Ujistěte se, že všechny komponenty sady jsou před použitím rozpuštěny, a pro přípravu směsi PCR reakce se podívejte na tabulku níže. Uvedené objemy jsou určeny pouze pro jednu reakci, vynásobte tyto objemy počtem vzorků, abyste získali objemy potřebné pro hlavní směs. Při přípravě směsi pro více než 5 vzorků by mělo být k celkovému počtu vzorků přidáno 10 %.

| Komponenty | Objem |
|---|---|
| PCR Master Mix 1/2/3 | 25,6 µL |
| RT Mix | 0,4 µL |
| Vzorek DNA/RNA<br>(Negativní / Pozitivní kontrola) | 14 µL |
| Celkový objem | 40 µL |

Pipetou vložte 26 µL PCR Master Mix (PCR Master Mix – RT Mix směs) do PCR zkumavek nebo stripů a přidejte 14 µL templátu (vzorek/pozitivní nebo negativní kontrola). Zavřete víčko zkumavky. Ujistěte se, že směs v každé zkumavce je na dně zkumavky. Pokud je to nutné, centrifugujte.

### 9.4. Programování přístroje pro Real-Time PCR

Termální protokol pro panel Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 zahrnuje reverzní transkripci, počáteční denaturaci pro aktivaci *Taq* DNA polymerázy (s vlastností horkého startu), dvoufázový amplifikační cyklus a terminální zadržení. Data v reálném čase jsou sbírána ve druhém kroku amplifikačního cyklu. Termální protokol, který má být použit pro reakci, je uveden níže:

| Kroky | Teplota | Čas | |
|---|---|---|---|
| Reverzní transkripce | 50 °C | 10:00 min | |
| Počáteční denaturace | 95 °C | 05:00 min | |
| Denaturace | 97 °C | 00:15 min | 42 cyklů |
| Annealing<br>(sběr dat) | 55 °C | 00:50 min | |
| Hold | 32 °C | 02:00 min | |

Před zahájením práce s Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 je nutné dokončit a zkontrolovat následující kroky:

- Vyberte všechny filtry, které budete používat (FAM, HEX, Texas RED a Cy5),
- Identifikovat neznámé vzorky, pozitivní i negativní kontroly,
- Vyberte správný tepelný protokol,
- Začněte experiment.

## 10. ANALÝZA

Na konci termálního protokolu software Real-Time PCR Instrument automaticky vypočítá základní cykly a práh. Analýzu výsledků by měl provádět vyškolený personál, který absolvoval potřebné školení pro analýzu dat Real-Time PCR. Doporučujeme, aby výsledky testů vyhodnocoval odborný lékař, přičemž se zohlední klinické nálezy pacienta a výsledky dalších testů.

Veškerá analýza probíhá automaticky při běžném používání. Pokud však vyškolení pracovníci, kteří absolvovali požadované školení od výrobce, považují za nezbytné, pokud systém umožňuje co nejvíce snížit práh k detekci nízkých zesílení, je třeba věnovat pozornost tomu, aby prahová čára zůstala nad pozadím.

Negativní kontrola je nezbytná pro přesnou analýzu výsledků. Zkontrolujte prosím negativní kontrolu a ujistěte se, že neukazuje zesílení mimo příslušný vnitřní kontrolní filtr.

Pokud má negativní kontrola signál mimo filtr spojený s vnitřní kontrolou, prosím, výsledky neuvádějte. Experiment opakujte po přijetí potřebných opatření proti kontaminaci. Pokud se stejný výsledek objeví znovu, kontaktujte prosím výrobce.

Vnitřní kontrola a pozitivní kontrola panelu Bosphore SARS-CoV-2/Respiratory Pathogens Panel Kit v3 jsou nezbytné pro přesnou analýzu výsledků. Kritéria pro přijetí prahu cyklu pro vnitřní kontrolu a pozitivní kontroly jsou uvedena níže:

| Komponenta / Parametr | Prahová hodnota (CT) |
|---|---|
| Pozitivní kontrola 1/2/3 | ≤28 |
| Vnitřní kontrola | ≤35 |

Ve kvalitativních testech; vzorky, které překročí práh ve filtrech FAM, HEX, Texas RED a Cy5; je hodnocena jako "pozitivní", vzorky, které nepřekročí práh, jsou u PCR Master Mix 1 a 3 označeny jako "No CT" nebo "Negativní", vzorky, které překročí práh ve filtrech FAM, HEX a Cy5; jsou hodnoceny jako "pozitivní", vzorky, které práh nepřekročí, jsou u PCR Master Mix 2 označeny jako "No CT" nebo "Negativní". Tyto vzorky jsou považovány za obsahující negativní nebo bakteriální/virovou zátěž pod detekční hranicí testu. Vnitřní kontrolní testu v texaském RED filtru těchto "nezjištěných" vzorků v PCR Master Mix 2 by měla být také zkontrolována, aby se předešlo falešně negativním výsledkům.

Zpožděné zesílení vnitřní kontroly může naznačovat problém při odběru vzorků, extrakci nukleových kyselin, inhibici PCR nebo selhání aplikace. V tomto případě by měl být odběr vzorku, extrakce a PCR opakovány. Vezměte prosím v úvahu, že u vzorků s vysokou bakteriální/virovou zátěží lze vnitřní kontrolu potlačit, a proto může být zpožděna nebo nebude detekována žádná nárůst signálu vnitřní kontroly.

Upozorňujeme, že tento produkt poskytuje pouze testování patogenů uvedených níže. Při poskytování výsledků pacientům je třeba zohlednit experimentální výsledky získáné z tohoto testu, rovněž s ohledem na klinické nálezy pacienta a pokyny příslušných zdravotnických orgánů. Tabulka níže ukazuje možné výsledky a jejich interpretaci.

| | SARS-CoV-2 (FAM) | RSV A/B (HEX) | Chřipka A (Texas RED) | Chřipka B (Cy5) | Výsledky |
|---|---|---|---|---|---|
| **PCR Master Mix 1** | + | - | - | - | Vzorek je pozitivní na SARS-CoV-2 |
| | - | + | - | - | Vzorek je RSV A/B pozitivní |
| | - | - | + | - | Vzorek je pozitivní na chřipku typu A |
| | - | - | - | + | Vzorek je pozitivní na chřipku typu B |
| | + | + | - | - | Vzorek je pozitivní na SARS-CoV-2 a RSV A/B |
| | - | + | + | - | Vzorek je pozitivní na RSV A/B a chřipku A |
| | - | - | + | + | Vzorek je pozitivní na chřipku A a chřipku B |
| | + | - | + | - | Vzorek je pozitivní na SARS-CoV-2 a chřipku typu A |
| | - | + | - | + | Vzorek je RSV A/B a chřipka B pozitivní |
| | + | - | - | + | Vzorek je pozitivní na SARS-CoV-2 a chřipku B |
| | - | + | + | + | Vzorek je pozitivní na RSV A/B, chřipku A a chřipku B |
| | + | - | + | + | Vzorek je pozitivní na SARS-CoV-2, chřipku A a chřipku B |
| | + | + | - | + | Vzorek je pozitivní na SARS-CoV-2, RSV A/B a chřipku B |
| | + | + | + | - | Vzorek je pozitivní na SARS-CoV-2, RSV A/B a chřipku A |
| | + | + | + | + | Vzorek je pozitivní na SARS-CoV-2, RSV A/B, chřipku A a chřipku B |
| | - | - | - | - | Vzorek je negativní* |

| | Enterovirus** (FAM) | Lidský metapneumovirus A/B (HEX) | Vnitřní kontrola (Texas RED) | Adenovirus (Cy5) | Výsledky |
|---|---|---|---|---|---|
| **PCR Master Mix 2** | + | - | +/- | - | Vzorek je pozitivní na enterovirus |
| | - | + | +/- | - | Vzorek je lidský metapneumovirus A/B pozitivní |
| | - | - | +/- | + | Vzorek je pozitivní na adenovirus |
| | - | - | + | - | Vzorek je negativní |
| | + | + | +/- | - | Vzorek je pozitivní na enterovirus a lidský metapneumovirus A/B |
| | - | + | +/- | + | Vzorek je pozitivní na lidský metapneumovirus A/B a adenovirus |
| | + | - | +/- | + | Vzorek je pozitivní na enterovirus a adenovirus |
| | + | + | +/- | + | Vzorek je pozitivní na enterovirus, lidský metapneumovirus A/B a adenovirus |
| | - | - | - | - | Test by se měl opakovat! |
| | **Parainfluenza 1/2/3/4 (FAM)** | **Rhinovirus (HEX)** | ***L. pneumophila* (Texas RED)** | ***M. pneumoniae* (Cy5)** | **Výsledky** |
| **PCR Master Mix 3** | **+** | **-** | **-** | - | Vzorek je pozitivní na virus H. parainfluenza typ 1/2/3/4 |
| | **-** | **+** | **-** | - | Vzorek je pozitivní na rhinovirus |
| | **-** | **-** | **+** | - | Vzorek je pozitivní pro *Legionella pneumophila* |
| | **-** | **-** | **-** | + | Vzorek je pozitivní pro *Mycoplasma pneumoniae* |
| | **+** | **+** | **-** | - | Vzorek je pozitivní na virus H. parainfluenza typ 1/2/3/4 a Rhinovirus |
| | **+** | **-** | **-** | + | Vzorek je pozitivní na virus H. parainfluenza typ 1/2/3/4 a *M. pneumoniae* |
| | **+** | **-** | **+** | - | Vzorek je pozitivní na virus H. parainfluenza typ 1/2/3/4 a *L. Pneumophila* |
| | **+** | **+** | **-** | + | Vzorek je pozitivní na virus H. parainfluenza typ 1/2/3/4, rhinovirus a *M. pneumoniae* |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | + | + | + | - | Vzorek je pozitivní na virus H. parainfluenza typ 1/2/3/4, rhinovirus a *L. pneumophila* |
| | + | - | + | + | Vzorek je pozitivní na virus H. parainfluenza typ 1/2/3/4, *L. pneumophila* a *M. pneumoniae* |
| | + | + | + | + | Vzorek je pozitivní na virus H. parainfluenza typu 1/2/3/4, rhinovirus, *L. pneumophila* a *M. pneumoniae* |
| | - | + | - | + | Vzorek je pozitivní na rhinovirus a *M. pneumoniae* |
| | - | + | + | - | Vzorek je pozitivní na rhinovirus a *L. pneumophila* |
| | - | + | + | + | Vzorek je pozitivní na rhinovirus a *L. pneumophila* a *M. pneumoniae* |
| | - | - | + | + | Vzorek je pozitivní na *L. pneumophila* a *M. pneumoniae* |
| | - | - | - | - | Vzorek je negativní* |

* Zkontrolujte také zesílení vnitřní kontroly v PCR Master Mix 2.

** Typy rhinoviru a enteroviru jsou si velmi podobné, protože rhinovirus je členem podrodiny enterovirů. Vzorky pozitivní na enterovirus mohou v testu na rhinovirus signalizovat. Vzorky pozitivní v obou testech by měly být považovány pouze za enterovirusově pozitivní. Nicméně vzorky pozitivní na rhinovirus (≤25 CT) mohou nastat při amplifikaci enteroviru při CT ≥35 a neměly by být interpretovány jako pozitivita enteroviru.

**Pozor!** Pro tento kit není definována žádná hraniční hodnota. Pokud amplifikační křivka a hodnota CT spolu s platnými výsledky pro vnitřní a pozitivní kontrolu splňují kvalitativní kritéria definovaná výrobcem, měla by být přítomnost nebo nepřítomnost signálu interpretována podle cíle.

**Montania 4896 Real-Time PCR:**

**PCR Master Mix:** Možnost křížové reactivity by měla být upravena, jak je uvedeno níže pro PCR Master Mix 1, 2 a 3.

| | Channel 1 | Channel 2 | Channel 3 | Channel 4 |
|---|---|---|---|---|
| Channel 1 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | 0,00 |
| Channel 2 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Channel 3 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,50 |
| Channel 4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

**LightCycler 480 Instrument II – Roche:** Pro Roche Light Cycler 480 použijte prosím **bílou destičku**. Jako typ analýzy pro vhodný výběr prahové úrovně by měl být zvolen "**Abs Quant/Fit Points**". Analýza by měla být provedena pomocí možnosti "**Cycle Range**".

Pro LC480 musí být proveden protokol barevné kompenzace podle tabulky níže:

| | FAM | HEX | Texas RED | Cy5 |
|---|---|---|---|---|
| PCR Master Mix 1 | Sada F | Sada F | Sada F | Sada D |
| PCR Master Mix 2 | - | Sada F | Sada F | Sada A |
| PCR Master Mix 3 | Sada F | Sada F | Sada F | Sada F |

**CFX96 Real-Time PCR Detection System - Bio-Rad:** Doporučuje se použít bílou destičku pro analýzu. Pokud je to nutné, v nastavení Baseline vyberte 'Apply Fluorescence Drift Correction'.

**Q qPCR Cycler - Quantabio:** Doporučuje se používat gain options pro zelená (FAM): 10, žlutá (HEX): 10, oranžová (Texas RED): 10 a červená (Cy5): 10. Při nastavení PCR by měla být zvolena možnost 'Standard TAQ'.

**Pro PCR Master Mix 1:** Použijte 'ignore cycles before '7 pro FAM filtr a 5 pro Cy5, pokud je to relevantní.

**Pro PCR Master Mix 2:** Použijte filtr Cy5 'ignore před '4, pokud je to relevantní.

**Quant Studio 5-ThermoFisher:** Doporučuje se používat 'Passive Referrence' jako 'None' pro analýzu.

Ve vzácných případech inhibice PCR způsobené léky nebo jinými inhibitory PCR ve vzorku doporučujeme test inhibovaných vzorků zmrazit a rozmrazit a použít je v PCR po jejich naředění 1:2 s $dH_2O$.

## 11. SPECIFIKACE

### 11.1. Citlivost

Analytická citlivost může být vyjádřena jako limit detekce: tj. nejmenší množství cílového markeru, které lze přesně detekovat. Detekční limit jednotlivých analytických postupů je nejnižší množství nukleové kyseliny ve vzorku, které lze detekovat, ale nemusí být nutně kvantifikováno jako přesná hodnota. Analytická citlivost nebo detekční limit pro NAT testy je vyjádřen 95% pozitivní mezní hodnotou.

Data citlivosti byla získána pomocí Montania 4896 Real-Time PCR přístroje, manuálního stojanu Magrev 24 pro extrakci magnetických kuliček nukleových kyselin a Magrev virové DNA/RNA extrakční sady s počátečním objemem 500 µL a elučním objemem 60 µL.

| Parametr | **Citlivost** (předkvantifikované referenční RNA materiály) | **Citlivost** (Sliny) | **Citlivost** (nasofaryngeální stěry) | **Citlivost** (orofaryngeální stěry) |
|---|---|---|---|---|
| SARS-CoV-2 | 0,7 kopií/µL | 1,5 kopie/µL | 0,5 kopie/µL | 0,7 kopií/µL |
| RSV A | 0,3 kopie/µL | 0,6 kopií/µL | 0,42 kopií/µL | 0,3 kopie/µL |
| RSV B | 7 kopií/µL | 14 kopií/µL | 9,8 kopií/µL | 7 kopií/µL |
| Influenza A | 0,8 kopií/µL | 1,6 kopií/µL | 1.1 kopií/µL | 0,8 kopií/µL |
| Influenza B | 0,9 kopií/µL | 1,8 kopií/µL | 1,2 kopií/µL | 0,9 kopií/µL |
| Enterovirus | 2 kopie/µL | 4,4 kopie/µL | 2,8 kopií/µL | 2 kopie/µL |
| *Lidský metapneumovirus* A/B | 6 kopií/µL | 13,2 kopií/µL | 8,4 kopií/µL | 6 kopií/µL |
| Adenovirus | 3,5 kopie/µL | 7,7 kopií/µL | 4,9 kopií/µL | 3,5 kopie/µL |
| *Virus* lidské parainfluenzy typu 1 | 10 kopií/µL | 22 kopií/µL | 14 kopií/µL | 10 kopií/µL |
| *Virus* lidské parainfluenzy typu 2 | 1 kopie/µL | 2,2 kopie/µL | 1,4 kopie/µL | 1 kopie/µL |
| *Virus* lidské parainfluenzy typu 3 | 5 kopií/µL | 11 kopií/µL | 7 kopií/µL | 5 kopií/µL |
| *Virus* lidské parainfluenzy typu 4 | 25 kopií/µL | 55 kopií/µL | 35 kopií/µL | 25 kopií/µL |
| Rhinovirus | 13 kopií/µL | 28,6 kopií/µL | 18,2 kopií/µL | 13 kopií/µL |
| *M. pneumoniae* | 0,15 kopií/µL | 0,33 kopií/µL | 0,21 kopií/µL | 0,15 kopií/µL |
| *L. pneumophila* | 2 kopie/µL | 4,4 kopie/µL | 2,8 kopií/µL | 2 kopie/µL |

### 11.2. Křížová reaktivita

Aby se eliminovala možná křížová reaktivita, byly použity jak podklady z návrhu testu, tak experimentální studie. Sekvence primerů a sond byly ověřeny na možnou homologii k jiným známým sekvencím patogenů pomocí analýzy porovnání sekvencí pomocí porovnání databáze.

Aby se eliminovalo riziko křížové reaktivity; Vzorky Bocaviru, Parechoviru, Coronaviru 229E, Coronaviru OC43, Coronaviru NL63, *Haemophilus influenza*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pneumocystis jirovecii* s známou vysokou pozitivitou byly testovány a byly negativní.

Experimentální výsledky ukázaly, že sada detekuje pouze patogeny SARS-CoV-2, RSV A/B, chřipku A, chřipku B, enterovirus, lidský metapneumovirus A/B, adenovirus, virus lidské parainfluenzy typu 1/2/3/4, rhinovirus, *Legionella pneumophila a Mycoplasma pneumoniae*.

## 12. REFERENCE


1. Thapa S, Gokhale S, Sharma AL, Sapkota LB, Ansari S, Gautam R, a kol. "Zátěž bakteriálních patogenů horních cest dýchacích u školních dětí v Nepálu". *BMJ Open Respiratory Research.* 2017; 4(1):1-9
2. Nelson PP, Papadopoulos NG, Skevaki C. "Respirační virové patogeny". *Encyklopedie respirační medicíny*. 2022; 4:129–137
3. Sundell N, Andersson LM, Brittain-Long R, Sundvall PD, Alsiö A, Lindh M, Gustavsson L, Westin J. "PCR detekce respiračních patogenů u asymptomatických a symptomatických dospělých". *Journal of Clinical Microbiology.* 2019; 57(1):16-18
4. https://www.health.harvard.edu/diseases-and-conditions/respiratory-tract-infection-is-it-contagious-the-family-healthguide (Citováno: 21.02.2023)
5. Leung NHL. "Přenosnost a přenos respiračních virů". *Nature Review Microbiology.* 2021; 19:528–545


## 13. SYMBOLY

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Datum expirace | | Pozor, čtěte přiložené dokumenty. |
| LOT | Číslo šarže | | Výrobce |
| REF | Katalogové číslo | IVD | *In vitro* Diagnostické zařízení |

## 14. INFORMACE K OBJEDNÁNÍ

Katalogové číslo: **ABSCR9 (100 rxn/box)**
**ABSCR8 (50 rxn/box)**
**ABSCR7 (25 rxn/box)**

## 15. KONTAKTNÍ INFORMACE

**Anatolia Diagnostic and Biotechnology Products Research Development Industry and Trade Inc.**
**Č.**: 1-9H, 34920 Sultanbeyli / Istanbul / Turecko
Č.: 18/Z02, 34956 Tuzla / Istanbul / Turecko

**Telefon:** +90 216 330 04 55 **Fax:** +90 216 330 00 42
**E-mail:** info@anatoliageneworks.com
www.anatoliageneworks.com



Anatolia Geneworks®, Bosphore®, Magnesia®, Magrev®, Montania®, Quantiphore® a Unio® jsou registrované ochranné známky Anatolia Tanı ve Biyoteknoloji A.Ş.

**Historie revize dokumentů**

| Verze dokumentu č. | Č. revize | Datum | Popis |
|---|---|---|---|
| V1 | 01 | 4. května 2022 | První vydání |
| V2 | 02 | 26. června 2024 | Částečná úprava obsahu |
| V3 | 03 | 21. ledna 2025 | Pozitivní regulační objemy změněny |
| V4 | 04 | 10. dubna 2025 | Částečné přidávání obsahu |
| V5 | 05 | 3. října 2025 | Částečný obsah aktualizován |
| V6 | 06 | 13. února 2026 | Částečný obsah aktualizován |
| V7 | 07 | 9. února 2026 | Částečný obsah aktualizován |
| V8 | 08 | 3. června 2026 | Částečná korekce obsahu |
| V9 | 09 | 24. srpna 2026 | Částečná korekce obsahu |