



Pro profesionální použití



Uživatelská příručka

v01/2020

**DIOS-RT-qPCR POCT kit
pro přímou detekci SARS-CoV-2 viru**

Pro použití na přístroji RotorGene Q MDX a Realist DX

REF

⁴⁸reakcí



DPO48

OBSAH

1 POPIS KITU	4
2 ÚČEL METODY.....	4
3 SLOŽENÍ KITU	5
4 SKLADOVÁNÍ A EXSPIRACE KITU	5
5 MANIPULACE SE VZORKY, JEJICH SKLADOVÁNÍ A PŘÍPRAVA.....	6
6 DOPORUČENÝ POSTUP PŘI PROVÁDĚNÍ VÝTĚRU (SAMO-ODBĚRU) Z NOSNÍCH DUTIN PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY SARS-COV-2 VIRU	6
7 DOPORUČENÉ PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ NASOFARYNGEÁLNÍCH STĚŘŮ	6
8 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	7
9 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A MATERIÁL	7
10 PROTOKOL RT-PCR.....	8
11 INFORMACE O LIKVIDACI	9

Výhody DIOS-RT-qPCR POCT kit

- Kvantifikace viru SARS-CoV-2 přímo z výtěru, bez nutnosti izolace RNA
- Lze použít pro inaktivované i neinaktivované výtěry horních cest dýchacích
- Univerzální kit vhodný pro všechny real-time cyclery s kanály FAM a Cy5, validován na RotorGene Q MDX (QIAGEN) a Realist DX (Institute of Applied Biotechnologies)
- Rychlé a spolehlivé výsledky do 60 minut
- Esej specifická pro dva cílové geny SARS-CoV-2
- Detekce endogenní lidské kontroly
- Bez křížové reaktivity s běžnými lidskými respiračními viry CoV a MERS
- Kit vychází ze současných mezinárodních doporučení WHO, CDC a ECDC* (*World Health Organization, Center for Disease Control Atlanta US, European Center for Disease Control)

Balení: 48 reakcí

1 Popis kitu

DIOS-RT-qPCT (Direct-One-Step-RT-qPCR) POCT (Point Of Care Testing) kit je jednokrokový RT-PCR kit pro detekci SARS-CoV2 specifické RNA přímo ze vzorků horních cest dýchacích (jako jsou nazální, nasofaryngeální nebo orofaryngeální výtěry) bez nutnosti izolace RNA a s využitím RT-qPCR na přístroji RotorGene Q MDX (QIAGEN) a Realist DX (Institute of Applied Biotechnologies). Kit se dodává spolu s odběrovými štětičkami a odběrovým médiem. Mražená část kitu obsahuje mastermix enzymů, pufrů, nukleotidů, primerů a sond k detekci konzervované oblasti genů N1 a N2 SARS-CoV-2 RNA navržené tak, aby nedocházelo k nespecifické detekci RNA z jiných koronavirů nebo lidské mikroflóry. Souprava obsahuje vnitřní kontrolu pro detekci lidské RNA (gen RNase P) pro vyloučení možné inhibice PCR reakce a posouzení její spolehlivosti.


2 Účel metody


Tato souprava se používá pro kvalitativní *in vitro* detekci nukleových kyselin koronaviru (SARS-CoV-2) ve vzorcích dýchacích cest pacienta během akutní fáze infekce. Pozitivní výsledky ukazují na přítomnost SARS-CoV-2 RNA; klinická korelace s anamnézou pacienta a dalšími diagnostickými informacemi je nezbytná pro stanovení stavu infekce pacienta.

3 Složení kitu

Část kitu	Složení kitu	Skladování
Part 1 of 3	48x MasterMix, 16 µl, 48 0,2 ml zkumavek	-20 °C
	2x Positive control (50 copies/µl, 36 µl)	
	2x Negative control (No template Control, 36 µl)	
Part 2 of 3 DIOS-VTM	48 x Covid medium, 200 µl	2-8 °C
Part 3 of 3 Swab collection tip	50 x Flocked swab štětíčky	RT

4 Skladování a expirace kitu

 Všechny části kitu Part 1 of 3 skladujte při teplotě -15 °C až -25 °C a chraňte před světlem. Zamezte opakovanému rozmrazení a zmrazení. Z mražené části kitu (Part 1 of 3, -20 °C) vyjměte pouze počet zkumavek Mastermix určených k přímé spotřebě. Po rozmrznutí mastermix spotřebujte do 2 hodin. Vyhněte se opakovanému rozmrazování a zamrazování pozitivních kontrol (Positive Control). V každé zkumavce pozitivní a negativní kontroly je min. 36 µl, které postačí pro provedení 2 reakcí kontroly. Po rozmrazení pozitivní kontrolu spotřebujte do 48 hodin. Odběrová média Covid medium (Part 2 of 3) musí být skladována při 2-8 °C. Po vložení odběrové štětíčky s výtěrem do média analyzujte vzorek do 12 hodin. Reagencie jsou stabilní po dobu jednoho měsíce při dodržení skladovacích podmínek.

 Všechny části kitu jsou stabilní do data expirace, které je vyznačeno na štítku krabičky a štítcích zkumavek.

5 Manipulace se vzorky, jejich skladování a příprava

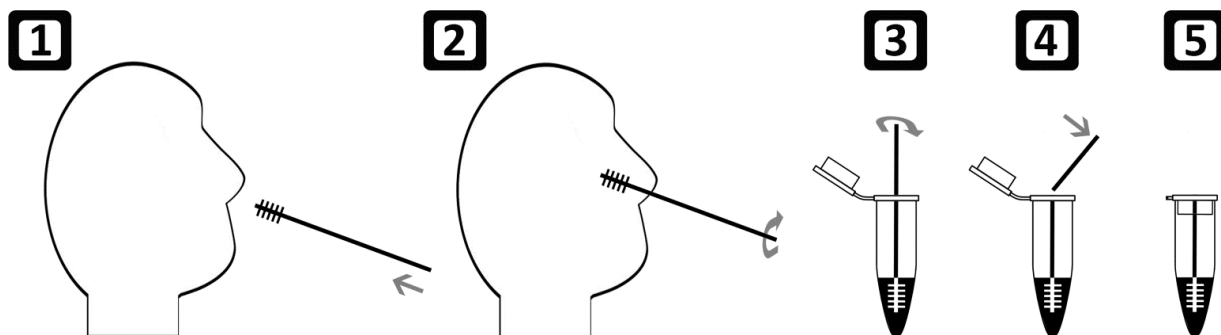
Se všemi vzorky stěrů pracujte jako s infekčním materiálem. Vždy používejte odpovídající osobní ochranné pomůcky. Chraňte kůži, oči a sliznice.

6 Doporučený postup při provádění výtěru (samo-odběru) z nosních dutin pro účely diagnostiky SARS-CoV-2 viru

- Vyndejte štětičku z obalu a proveďte výtěr nosu (hlavně vzadu, v kořenu nosu) obou nosních dírek. Po zasunutí štětičky do nosní dutiny se štětičkou několikrát zakružte po dobu alespoň 10 sekund. Poté úkon zopakujte stejnou štětičkou ve druhé nosní dírce (viz Obrázek 1, body 1 -2).
- Po provedení výtěru z obou nosních dírek štětičku přeneste do zkumavky s odběrovým médiem (viz Obrázek 1, bod 3).
- Odběrovou štětičku ponořte do média a zalomte o okraj zkumavky (štětička má asi v 3 cm zúžení, kde se dá dlouhá část oddělit, viz. Obrázek 1, bod 4).
- Zkumavku uzavřete a označte (viz Obrázek 1, bod 5).

Pro Direct RT-PCR kit lze použít teplotně inaktivované stěry nebo stěry bez inaktivace. Teplotní inaktivaci proveďte zahřátím vzorku na 75°C 10 min před přidáním do PCR reakce. Stěry analyzujte do 12 hodin od odběru.

Obr.1 – postup provedení výtěru nasofaryngeální dutiny, schématický náčrt.



7 Doporučené podmínky skladování nasofaryngeálních stěrů

Během přípravy RT-PCR reakce, krátkodobé skladování (12 hodin)2 až 8°C

Dlouhodobé skladování, přeprava-15 až -25°C*

*Dlouhodobé skladování může vést k falešné negativitě vzorků. Nedoporučujeme jej.

8 Přístrojové vybavení

Kit lze použít pro Real-time PCR přístroj s fluorescenčními kanály FAM a Cy5. Kit je validován (CE-IVD) pro použití s RotorGene Q MDX (QIAGEN) a Realist DX (Institute of Applied Biotechnologies).

9 Přístrojové vybavení a materiál

Potřebný materiál a pomůcky, které nejsou součástí kitu:

- Jednorázové rukavice
- Automatické pipety
- Sterilní špičky s filtrem

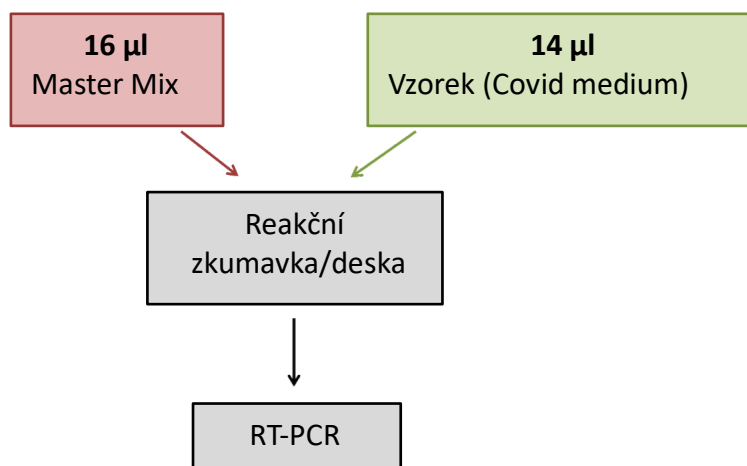
Potřebné přístrojové vybavení:

- Laboratorní třepačka
- Stolní centrifuga
- Real-time PCR cykler: RotorGene Q MDX (QIAGEN) nebo Realist DX (Institute of Applied Biotechnologies)

10 Protokol RT-PCR

Všechny reagenty před začátkem testu zcela rozmrazte a dobře promíchejte a následně zcentrifugujte. Všechny reagenty udržujte při práci v chladu, zkumavky s reagenty i Master Mixem umístěte na chladicí podstavec. RT-PCR detekční směs obsahuje specifické primery a sondy, chraňte ji před světlem. Směs je připravena k okamžitému použití.

Schéma přípravy RT-PCR reakce:



Rozmrazte potřebný počet 0,2 ml zkumavek s Master Mix (16 µl), Positive Control a Negative Control. Do reakční směsi Master Mix napipetujte 14 µl vzorku stěru v Covid medium nebo 14 µl Pozitivní či Negativní kontroly.

Nastavení reakce	
Master Mix	16 µl
Vzorek / Pozitivní / Negativní kontrola	14 µl
Celkový objem reakce	30 µl

Použití pozitivní a negativní kontrolu slouží k ověření správnosti RT-PCR reakce. Uzavřete PCR zkumavky a krátce centrifugujte.

RT- PCR reakční podmínky

Krok	Teplota	Čas	Cyklus
Reverzní transkripce	45°C	10 min	1
Úvodní denaturace	95°C	2 min	1
Denaturace	95°C	5 sec	40
Nasedání primerů, extense	60°C*	20 sec	

* snímání fluorescence

Nastavení fluorescenčního snímání

Cílový gen	Kanál
2019-nCoV N1+N2	FAM
Internal Positive Control (IPC)	Cy5

Interpretace výsledků

Detekovaný gen	2019-nCov N1+N2	IPC	
Fluorescenční kanál	FAM	Cy5	
Výsledek	+	+/-	Pozitivní
	-	+	Negativní
	-	-	Neplatný*

* PCR reakce je neplatná pokud pozitivní kontrola nemá logaritmický nárůst a Ct > 40, a pokud negativní kontrola má Ct < 40. Pokud je reakce neplatná, měření všech vzorků v tomto experimentu by mělo být opakováno.

Detekční limit reakce

Detekční limit kitu je 7 kopií (Ct±36).

11 Informace o likvidaci

Všechny komponenty v kitu (kromě kontrolních vzorků) lze likvidovat jako běžný komunální odpad (kód 200301).

V případě dalších dotazů kontaktujte naše technické oddělení na adrese
iabio@iabio.eu.



Výrobce:

Institute of Applied Biotechnologies a.s.

Sídlo:

Služeb 3056/4, Strašnice
108 00 Praha 10

IČO: 27225712

Tel/Fax: +420 255 700 885

iabio@iabio.eu

www.iabio.eu

Provozovny:

Praha
Služeb 3056/4, Strašnice, 108 00 Praha 10