


# GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp sada

**REF IFMR-45**
 100 ks testů/  
 balení

 Skladujte při teplotě -20 °C nebo nižší.  
 Doba skladování je 12 měsíců od data výroby.

## Pro termocykly ABI7500/7500Fast & CFX96

### Způsob užití

Sada GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp je určena pro kvalitativní detekci Novel Corona viru (COVID-19) z tělních tekutin metodou real-time polymerázové řetězové reakce (qPCR).

### Obsah balení (sady)

Sada COVID-19 Plus RealAmp	100 ks testů/balení
COVID-19 Plus reakční směs <sup>1</sup>	1050 µL
COVID-19 Plus fluorescenční sondační směs <sup>2</sup>	550 µL
COVID-19 Plus směs pro pozitivní kontrolu <sup>3</sup>	50 µL
COVID-19 Plus směs pro negativní kontrolu <sup>4</sup>	50 µL

<sup>1</sup> obsah: Tris-HCL, MgCl<sub>2</sub> a dNTPs

<sup>2</sup> obsah: páry primerů a sondy pro amplifikaci a detekci každého cíle

<sup>3</sup> obsah: pozitivní kontrola pro cíle

<sup>4</sup> obsah: ultračistá voda (UPW) PCR kvality

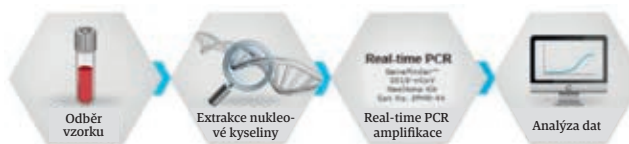
### Prekvizity

- Termocykly Applied Biosystems 7500/7500Fast nebo CFX96 Real-time PCR Instrument
- Pipety a špičky s aerosolovou bariérou
- Vortex
- Centrifuga s mikrorotorem
- Nepudrované rukavice na jedno použití

### Varování a preventivní opatření

- Tento produkt je určen pro in vitro diagnostiku (IVD).
- Test musí být proveden profesionálním kvalifikovaným personálem.
- Nepoužitých reagensů a odpadu se zbavte v souladu se zákony ČR a místními regulacemi.
- Opakované zamrazování a tání může mít za následek nesprávné výsledky.
- Nemíchejte dohromady reagenzie z jiných várek sady.
- Neupravujte objem reagensů/vzorku, které jsou používány k testu a nepoužívejte je jinak než je doporučeno.

### Pracovní postup



### Protokol

#### A. Vzorek

Tento produkt musí být použit se vzorky virové RNA extrahované z lidských vzorků získaných bronchoalveolární laváží (BAL), nasopharyngeálními stěry, ze sputa, atd.

#### B. Extrakce RNA

Pro extrakci doporučujeme použít komerční extrakční sadu, např. QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen).

#### C. Příprava reagensů

Před spuštěním PCR musí být všechny komponenty roztáté, jemně zamíchané a krátce zcentrifugované pro sběr roztoku na dně.

1. Smíchejte 10 µL COVID-19 Plus reakční směsi a 5 µL COVID-19 Plus fluorescenční sondační směsi pro vytvoření testovací směsi pro každou reakci zvlášť (viz níže). Připravte si dostatečný objem testovací směsi pro všechny reakce plus malé množství navíc ke korekci chyb pipetování.
2. Po důkladném promíchání umístěte 15 µL testovací směsi do 96-jamkové destičky nebo PCR mikrozkušavky.
3. Přidejte 5 µL vzorku extrahované RNA do 96-jamkové destičky nebo PCR mikrozkušavky, následně všechny komponenty promíchejte pipetováním. Stejně postupujte s ostatními RNA vzorky, směsí pro pozitivní kontrolu a směsí pro negativní kontrolu.
4. Dobře uzavřete mikrozkušavku víčkem nebo utěsněte 96-jamkovou destičku.
5. Přemístěte mikrozkušavky nebo 96-jamkovou destičku do Real-time PCR termocykly a zahajte amplifikační proces.

Komponenty	Na 1 reakci (µL)
COVID-19 Plus reakční směs	10
COVID-19 Plus fluorescenční sondační směs	5
Vzorek nebo PK <sup>5</sup> nebo NK <sup>6</sup>	5
Celkový objem	20

<sup>5</sup> PK, směs pro pozitivní kontrolu

<sup>6</sup> NK, směs pro negativní kontrolu

**pokračování na rubu >>**

## D. Nastavení Real-time PCR

Tento produkt byl validován na termocyklerech Applied Biosystems 7500/7500Fast a CFX96 Real-time PCR Instrument

1. Řiďte se pokyny Vašeho termocyklu a nastavte parametry v dedikovaném softwaru.

2. Nastavte PCR program a fluorescenci následovně, poté spusťte test.

Komponenty			
Cyklus	Teplota	Čas	
Segment 1	1 cyklus	50 °C	20 min
	1 cyklus	95 °C	5 min
Segment 2	45 cyklů	95 °C	15 sek
		58 °C*	60 sek

\* Vyberte „Sběr dat“

Nastavení fluorescence	
Cíl	Fluorofor
RdRp gen	FAM
N gen	JOE (ABI) / VIC (CFX96)
E gen	Texas Red
IC	Cy5
ŽÁDNÝ ZHÁŠEČ, ŽÁDNÉ REFERENČNÍ BARVENÍ	

## E. Nastavení analýzy

Hodnoty intenzity fluorescenčního záření vydávaného v průběhu amplifikace specifickými sondami a specifickými interními kontrolními sondami by měly být analyzovány dedikovaným softwarem.

1. Vyberte analyzační mód po dokončení a otevřete nastavení analýzy.

2. Vyberte editaci výchozích nastavení pro úpravu prahů uvedených níže.

Cíl	Práh		Výchozí bod	
	ABI	CFX96	Začátek	Konec
RdRp gen	30,000	300	3	15
N gen	30,000	300	3	15
E gen	30,000	300	3	15
IC	10,000	100	3	15

## F. Interpretace výsledků

#	RdRP	N	E	IC	Výsledek analýzy
1	≤43	≤43	≤43	≤35	COVID-19 Pozitivní
2	≤43	≤43	U.D*	≤35	COVID-19 Pozitivní
3	≤43	U.D	≤43	≤35	COVID-19 Pozitivní
4	≤43	U.D	U.D	≤35	Opakujte test (COVID-19 Pozitivní pokud RdRp≤43)
5	U.D	≤43	≤43	≤35	Opakujte test (COVID-19 Pozitivní pokud E a N≤43)
6	U.D	≤43	U.D	≤35	Opakujte test (COVID-19 Pozitivní pokud N≤43)
7	U.D	U.D	≤43	≤35	Beta koronavirus
8	U.D	U.D	U.D	≤35	Negativní
9	U.D	U.D	U.D	U.D	Neplatný výsledek (opakujte test)

\*U.D: Nedefinováno (nebo Nehodící se (N/A))

## Kontrola kvality

• Rozsah výsledků pozitivní a negativní kontroly by měl být následovný:

#	FAM	JOE/VIC	Texas Red	Cy5
PK	≤35	≤35	≤35	≤35
NK	U.D	U.D	U.D	U.D

## Provedení

Kritérium	Výsledek
Analytická specifita	14 DNA/RNA vzorků bylo testováno sadou Gene-Finder™ COVID-19 Plus RealAmp pro vyloučení možnosti zkřížené reaktivity. 14 DNA/RNA vzorků, které neobsahovaly detekční cíl, bylo vyhodnoceno negativně. * Zkřížená reaktivita: 100% Specifita
Analytická senzitivita	Bylo testováno sériové ředění (1000, 100, 10, 10, 1 kopií/test) COVID-19 RNA (3 dávky, 24 opakování každého testu). *Analytický senzitivita : 1) RdRp gen: 10 kopií/test 2) N gen: 10 kopií/test 3) E gen: 10 kopií/test

Opakovatelnost	Opakovatelnost byla potvrzena identickými standardními substancemi za různých podmínek; různé šarže, místa, časy a testery testované vždy 3 sadami. Kritérium opakovatelnosti bylo stanoveno CV < 5% Ct hodnoty.
Bezpečnost zamrazování/tání	Bezpečnost zamrazování/tání sady GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp byla potvrzena 12krát opakovaným testem zamrazování/tání. Kritérium bezpečnosti bylo stanoveno CV < 5 % Ct hodnoty.

## Řešení problémů

Problém	Možná příčina	Doporučení
Žádný signál ve všech vzorcích včetně pozitivní kontroly	Chyba v přípravě testovací směsi	Kontrolujte objemy při přípravě testovací směsi
	Přidány inhibitory	Opakujte extrakční proces s novým vzorkem
	Degradace sond	Použijte nové sondační reagenty
	Degradace směsi pozitivní kontroly	Použijte novou směs pro pozitivní kontrolu
	Vynechané komponenty	Ověřte přítomnost všech komponent a opakujte přípravu testovací směsi pro qPCR
Různá intenzita fluorescenčních signálů	Chyba v nastavení termocyklu	Zkontrolujte nastavení pozice pro pozitivní kontrolu a nastavení termálního cyklu
	Chyba pipetování	Ujistěte se, že v každé mikrozkušence nebo v každé jamce destičky je stejný objem reaktantů
Slabé nebo žádné fluorescenční signály pouze ve vzorku	Kontaminace vnějšího povrchu PCR mikrozkušavek nebo destičky	Během testu používejte rukavice
	Špatná kvalita RNA	Pro extrakci RNA použijte doporučenou sadu a uchovávejte extrahovanou RNA za teploty -70 °C
	Nedostatečné množství RNA	Opakujte PCR test s dostatečným množstvím RNA