

## SARS-CoV-2 qRT-PCR Detection KIT

SARS-CoV-2 qRT-PCR Detection KIT jest przeznaczony do wykrywania koronawirusa SARS-CoV-2 w próbkach od pacjentów z objawami zakażenia COVID-19. Oczyszczony materiał genetyczny wirusa z wymazów z gardzieli, noso-gardzieli, śliny itp. jest amplifikowany za pomocą real-time RT-PCR i wykrywany przy pomocy sond specyficznych dla SARS-CoV-2, znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Identyfikacja wirusa następuje na podstawie silnie konserwowanych rejonów w genach ORF1ab i NP charakterystycznych dla SARS-CoV-2. Dodatkowo zestaw zawiera startery specyficzne dla ludzkiego genu ACTB (gen kodujący beta-aktynę), co pozwala zweryfikować jednocześnie prawidłowość pobranego wymazu i jakość oczyszczania RNA. Test spełnia wymagania zawarte w Rekomendacji WHO „Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases” z 2 marca 2020 roku. Zestaw nie wykazuje reakcji krzyżowych wobec innych mikroorganizmów wywołujących choroby układu oddechowego.

### Zawartość zestawu:

Składnik	Nr kat. E0430-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E0430-02 500 reakcji po 25 µl
Cov Buffer Mix (2x) * brązowa probówka	2 x 625 µl	10 x 625 µl
Cov Enzyme Mix pomarańczowa nakrętka	100 µl	5 x 100 µl
Positive Control ** czarna nakrętka	50 µl	2 x 50 µl
RNase free Water przeźroczysta nakrętka	1200 µl	5 x 1200 µl

Wszystkie składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze -20°C.

\*Unikaj wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (> 2), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu. Odczynnik należy zamrozić w mniejszych porcjach, jeśli jest używany tylko sporadycznie.

\*\* Kontrolę pozytywną należy przechowywać oddzielnie, z dala od pozostałych składników zestawu.

### Przygotowanie próbki pobranej od pacjenta.

RNA z wymazu, śliny bądź innej wydzieliny należy wyizolować przy pomocy zestawów dedykowanych do oczyszczania RNA wirusowego. Należy postępować zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta zestawu.

## Protokół

### Składniki reakcji:

Składnik reakcji	Próbka RNA pacjenta	Kontrola negatywna	Kontrola pozytywna
Cov Buffer Mix (2x)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Cov Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Positive Control	-	-	5 µl
Próbka oczyszczonego RNA od pacjenta	5 µl	-	-
RNase free Water	6,5 µl	11,5 µl	6,5 µl
Objętość reakcji	25 µl	25 µl	25 µl

### Przygotowanie reakcji PCR:

1. Określić ilość nastawianych reakcji. Reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Enzyme Mix powinien być trzymany „na lodzie”.
2. Przygotować jeden Master Mix reakcyjny, czyli wymieszać ze sobą odpowiednią wielokrotność składników reakcyjnych wg. powyższej tabelki z wyjątkiem RNA od pacjenta: zmieszać w próbówce odpowiednie ilości Cov Buffer Mix (2x), Cov Enzyme Mix i wodę. Przed pobraniem Cov Buffer Mix (2x), bufor należy wymieszać przez kilkukrotne pipetowanie.
3. Składniki Master Mix należy wymieszać poprzez wielokrotne pipetowanie. Nie należy „worteksować” mieszaniny.
3. Rozporcjować Master Mix do próbek typu “strip” lub na płytkę przenosząc po 20 µl roztworu.
4. Przygotować reakcje w następującej kolejności:
  - 4a. Kontrola negatywna: dodać 5 µl wody i zamknąć próbkę, aby uniknąć zanieczyszczenia przez RNA pacjenta.
  - 4b. Próbki RNA pacjentów: dodać po 5 µl oczyszczonego RNA i zamknąć próbki.
  - 4c. Kontrola pozytywna: dodać 5 µl Positive Control.
5. W każdym cyklu testowym, obok badanych próbek od pacjenta, należy nastawić jedną kontrolę pozytywną i jedną kontrolę negatywną.
6. Przygotowane reakcje wstawić do termocyklera i zaprogramować go w następujący sposób:

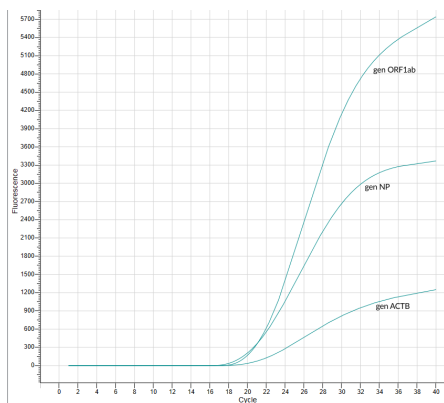
Cykl	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja	50°C	15 min	1
Denaturacja wstępna	95°C	2 min	1
Denaturacja	95°C	10 s	40-45
Przyłączanie starterów/ wydłużanie	60°C	40 s	

**Pomiar fluorescencji jest wykonywany na etapie przyłączania starterów/wydłużania w trzech kanałach: FAM dla genu ORF1ab; HEX dla genu ACTB i ROX dla genu NP.**

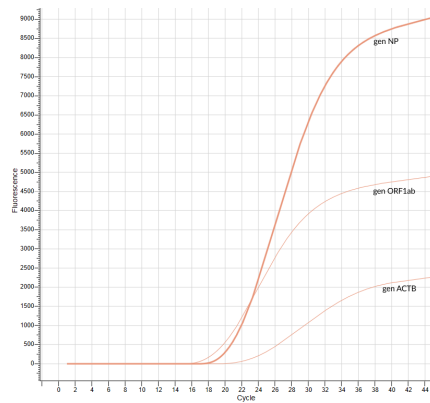
### Interpretacja wyników:

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Kanał ROX	Wynik
Kontrola negatywna	-	-	-	prawidłowy
Kontrola pozytywna	+	+	+	prawidłowy
1	-	+	-	negatywny SARS-CoV-2
2	+	+	+	pozytywny SARS-CoV-2
3	+	+	-	pozytywny SARS-CoV-2
4	-	+	+	pozytywny SARS-CoV-2
5	-	-	-	nieprawidłowy, bada- nie należy powtórzyć
6	+	-	+	nieprawidłowy, bada- nie należy powtórzyć

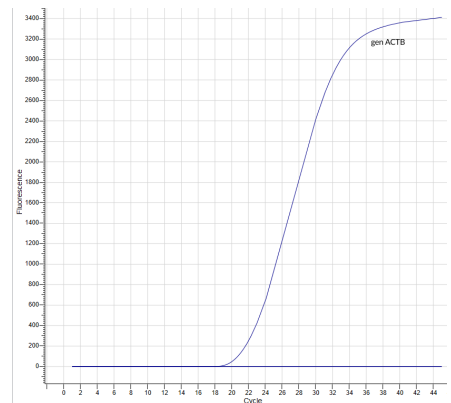
Badaną próbkę uznaje się za pozytywną jeżeli wykazała sygnał fluorescencji w kanale HEX i co najmniej w jednym z dwóch pozostałych kanałów, przy czym Ct powinno być mniejsze bądź równe 38.



Kontrola pozytywna



Wynik pozytywny SARS-CoV-2



Wynik negatywny SARS-CoV-2

### Uwagi:

W przypadku otrzymania nieprawidłowego bądź wątpliwego wyniku zalecane jest wykonanie badania ponownie.

Wszystkie badania powinny być wykonywane przez wykwalifikowany personel i oceniane w kontekście objawów klinicznych i wywiadu lekarskiego.

Podczas badania duże znaczenie ma prawidłowe pobranie wymazu i jakość oczyszczonego RNA.