

AUMED test RT - LAMP Assay SARS-CoV-2



Návod k použití soupravy

VÝROBCE: AUMED, a.s., Komořanská 326/63, 143 14 Praha 4 – Modřany, Česká republika

V&V: Vyvinuto společností Protean s.r.o., Pod Lesem 1300/9, 373 16 Dobrá Voda u Českých Budějovic, Česká republika

1. NÁZEV SOUPRAVY:

AUMED test RT-LAMP Assay SARS-CoV-2 - souprava pro RT-LAMP detekci SARS-CoV-2

2. POUŽITÍ

Souprava je určena pro diagnostiku přítomnosti viru SARS-CoV-2 ve vzorcích izolované virové RNA - pro 45 vzorků.

3. PRINCIP TESTU:

Technika molekulární amplifikace RT-LAMP (Reverse transcription - Loop mediated isothermal amplification – reverzní transkripce a izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou) umožňuje amplifikaci nukleových kyselin s vysokou specifičností, účinností a rychlostí za izotermálních podmínek - tedy za konstantní teploty, dosažitelné v inkubátorech, hybridizačních pecích či sušárnách. Výsledky jsou spolehlivě odečítány na základě barevné změny pouhým okem.

Test zahrnuje detekci viru SARS-CoV-2 a detekci interní kontroly (IC) pro kontrolu správného odběru a zpracování vzorku.



4. OBSAH SOUPRAVY:

- Krabička s reagensiemi pro 45 testů

Obsah	Objem (ul)	Barva	KS
MasterMix SARS-CoV2	1470	Oranžová	1
MasterMix IC	1470	Zelená	1
EnzymeMix	320	Černá	1
SARS-CoV2 PC	15	Červená	1
IC PC	15	Modrá	1
Nuclease-free Water	1800	Bílá	1

IC = interní kontrola

PC = pozitivní kontrola

- Sáček, obsahující dvě plata víček s barvou ve světlotěsném obalu, skladovat při pokojové teplotě v původním světlotěsném obalu nebo ve tmě.
- Sáček obsahující dvě 96 jamkové PCR destičky a papírovou šablonu nebo 24ks 8 jamkových PCR stripů a plastovou šablonu

5. POTŘEBNÝ MATERIÁL NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU:

- Automatické a multikanálové pipety
- Zkumavky na objem >2ml (lze vyřešit postupným smícháním), korytka pro nanášení multikanálovou pipetou
- Pipetovací špičky s aerosolovými filtry RNase a DNase free
- Zařízení pro inkubaci destiček při 63 °C

6. PRACOVNÍ POSTUP PRO STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI VIRU SARS-CoV2:

- Příprava testu musí být prováděna na ledu nebo v chlazeném stojánu na 4°C
- Reagencie rozmrazte a umístěte do chlazeného stojanu
- Pro každý vzorek je provedena **zvlášť jedna reakce na přítomnost SARS a jedna interní kontrola (IC)**
- Pro kontrolu průběhu reakce SARS a IC jsou zařazeny pozitivní a negativní kontroly
- Pro detekci SARS a IC připravte reakční směsi podle následující tabulky
 - pozor, celkový objem pro 50 reakcí je větší než 2 ml!

	50 reakcí *	1 reakce
Master Mix	1350 µl	27 µl
Enzyme Mix	150 µl	3 µl
water	750 µl	15 µl
celkem	2250 µl	45 µl

* 45 vzorků + PC + NC + 3 reakce navíc pro ztráty pipetováním

- PCR destičku / stripy vložte do chlazeného stojánu



Následující rozpis je pro analýzu 45 vzorků v destičce, při použití stripů nebo jiného počtu vzorků rozvrhněte rozmístění dle vlastní potřeby

- mix pro SARS rozpipetujte po 45 µl do 47 jamek v destičce (nejlépe z rezervoáru multikanálovou pipetou)
 - do jamky A1 přidejte 5 µl pozitivní kontroly SARS-CoV2 PC
 - do jamky B1 přidejte 5 µl vody = negativní kontrola NC
 - do dalších 45 jamek napipetujte 5 µl vzorků
 - obsah jemně promíchat opakovaným natažením do pipety
 - mix pro IC rozpipetujte po 45 µl do 47 jamek v destičce (nejlépe z rezervoáru multikanálovou pipetou)
 - do jamky A7 přidejte 5 µl pozitivní kontroly IC PC
 - do jamky B7 přidejte 5 µl vody = negativní kontrola
 - do dalších 45 jamek napipetujte 5 µl vzorků
 - obsah jemně promíchat opakovaným natažením do pipety
-
- Opatrně uzavřete zkumavky připravenými víčky s barvou tak, aby nedošlo ke kontaktu reakční směsi s víčkem. Dobře utěsněte.
 - Vložte PCR destičku / strip do inkubátoru předehřátého na 63 °C a inkubujte 55 minut.
 - S destičkou / stripem manipulujte opatrně, aby nedošlo ke kontaktu reakční směsi s víčkem!
 - Vyjměte PCR destičku / strip z inkubátoru a nechte zchladnout 5 minut při pokojové teplotě.
 - Znovu přitlačte víčka na destičku / strip.
 - Otočte destičku / strip dnem vzhůru a jemným rychlým pohybem sklepněte reakční směs do víčka.
 - Sklepnutí opakujte, destičkou / stripem lehce zatřepejte a ujistěte se, že došlo k obarvení všech zkumavek (reakční směs musí zůstat ve víčkách minimálně 2 minuty).
 - Zhruba po dvou minutách dojde k odbarvení negativních vzorků a negativních kontrol.
 - **V žádném případě zkumavky neotvírejte!**

7. VYHODNOCENÍ:

Vzorky musí být vyhodnoceny během následujících 2 hodin.

V žádném případě zkumavky neotvírejte!





A Prostým okem



- Sklepněte reakční směs do zkumavek a opatrně destičku / strip otočte víčky dolů tak, aby reakční směs zůstala nahoře ve špičkách zkumavek.
- Na destičkunasadte přiloženou papírovou šablonu tak, aby pozice vzorků byly správně označeny.
- Pozitivní kontrola musí být modrá a negativní kontrola bezbarvá.
- Provedte odečet jednotlivých vzorků podle kalibrátoru uvedeného níže.
- U interní kontroly IC musí být vzorky pozitivní. Pokud je vzorek negativní, přestože kontrola je v pořádku, pak byl vzorek špatně odebrán či zpracován a musí být proveden nový odběr.

Kalibrátor pro stanovení pozitivních (+) a negativních (-) vzorků.

- Pozitivní vzorky v IC mají slabší odstín modré než vzorky SARS-CoV2.

SARS-CoV2	-	-	+	+
				
IC	-	+	+	+

B Digitální fotodokumentace

- PCR destička
 - Sklepněte reakční směs z víček do zkumavek a opatrně destičku otočte víčky dolů tak, aby reakční směs zůstala nahoře ve špičkách zkumavek.
 - Na špičky zkumavek nasadte přiloženou papírovou šablonu tak, aby pozice vzorků byly správně označeny
 - Sundejte papírovou šablonu a vyfotografujte v této poloze destičku mobilem, digitálním fotoaparátem, kamerou nebo fotodokumentačním zařízením.
- PCR strip
 - Sklepněte reakční směs z víček do zkumavek a opatrně stripy otočte víčky dolů tak, aby reakční směs zůstala nahoře ve špičkách zkumavek.
 - Na stripy nasadte přiloženou plastovou šablonu tak, aby první zkumavka byla v pozici A1
 - Celou plastovou šablonu se stripy vyfotografujte v této poloze mobilem, digitálním fotoaparátem, kamerou nebo fotodokumentačním zařízením.
- Fotografie pořídte za denního nebo umělého osvětlení, na bílé podložce nebo na prosvětlovacím stolku.
- Fotografie pořídte pomocí automatického nastavení daného digitálního zařízení.
- Fotografie zkopírujte do PC a uložte jako .jpg soubor.
- Grafická analýza se provede pomocí skriptu Protean-LAMP96.

8. UPOZORNĚNÍ:

- Reakce a odečítání výsledků musí být prováděno v prostorech fyzicky oddělených od prostor pro přípravu testů.
- Po proběhnutí reakce při 63 °C **NESMÍ být zkumavky s reakční směsí v žádném případě otevírány!** Po odečtení výsledků by měly být reakční zkumavky co nejdříve zlikvidovány podle příslušných lokálních předpisů.
- Reagencie se skladují při -20 ± 5 °C, destičky / stripy s víčky při pokojové teplotě a v suchu ve světlotěsném a vzduchotěsném obalu.
- Při práci musí být dodržovány platné bezpečnostní předpisy.

9. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ:

- Pokud vlivem neopatrné manipulace dojde ke kontaktu reakční směsi s barvou ve víčku před nebo během reakce, musí se celý test zopakovat.
- Jestliže pozitivní kontrola není modrá, došlo během testu k chybě a test se musí zopakovat.
 - Možné chyby: špatně namíchaná reakční směs, nepoužití chlazeného stojánku, opomenutí pozitivní kontroly, nedostatečná teplota pro inkubaci reakce
- Jestliže je negativní kontrola modrá, došlo buď ke kontaminaci nebo přidání pozitivní kontroly či vzorku do jamky pro negativní kontrolu

10. BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY:

Všechny složky soupravy jsou určeny pouze pro laboratorní účely.

Při práci nejezte, nepijte a nekuřte. Používejte ochranné rukavice a po práci si důkladně umyjte ruce. Dbejte na to, aby nedošlo k rozlití vzorků a k tvorbě aerosolu.

11. ODPOVĚDNOST:

- 1 Výrobce zaručuje použitelnost soupravy jako celku.
- 2 Výrobce nenese žádnou odpovědnost za neshody vzniklé nesprávným použitím testu.
- 3 Dodržujte přesně pokyny uvedené v návodu. Nereprodukovatelné výsledky mohou vzniknout zejména:
 - * nedostatečným promícháním reagentů a vzorků před použitím
 - * nepřesným pipetováním a nedodržováním času a teplot inkubací
 - * použitím stejné špičky při pipetování různých roztoků nebo záměnou uzávěrů

12. SKLADOVÁNÍ A EXSPIRACE

- Krabičku s reagenty skladujte při teplotě -15 až -25 °C. Exspirace soupravy je uvedena na vnějším obalu, exspirace jednotlivých složek je uvedena na jejich obalu.

- Sáček, obsahující plata víček s barvou ve světlotěsném obalu, skladovat při pokojové teplotě v původním světlotěsném obalu nebo ve tmě. Exspirace je uvedena na vnějším štítku.
- Sáček obsahující 96 jamkovou PCR destičku a papírovou šablonu nebo 8 jamkové PCR stripy a plastovou šablonu skladujte při pokojové teplotě Exspirace je uvedena na vnějším štítku.

13. POUŽITÉ SYMBOLY



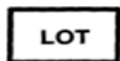
Conformité Européenne – výrobek splňuje legislativní požadavky EU



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



Exspirace



Šarže soupravy

Datum poslední verze tohoto návodu: 12/2020