

# I-es típusú $\alpha$ -koronavírus kimutatási készlet (PCR – fluoreszcens próbás módszer)

Használati útmutató  
(REF: JVP006)

## [A termék neve]

**Magyar megnevezés:** I-es típusú  $\alpha$ -koronavírus kimutatási készlet (PCR – fluoreszcens próbás módszer)

**Angol megnevezés:**  $\alpha$  Coronavirus Type I Detection Kit (PCR-Fluorescence Probe Method)

## [Kiszerelés]

8 teszt/készlet

## [Alkalmazási terület]

A készlet fluoreszcens RT-PCR-módszerrel mutatja ki az I-es típusú koronavírust (CoV-I) kutyák és macskák mellúri folyadékából (pleurális folyadékgyülem), hasúri folyadékából (ascites), illetve bélsártamponmintájából. Alkalmas a CoV-I kimutatására, diagnosztizálására és járványtani (epidemiológiai) vizsgálatára.

## [A vizsgálat elve]

A minták nukleinsavát (DNS/RNS) nukleinsav-kivonó reagenssel vonjuk ki. A nagy hatékonyságú reverz transzkriptáz enzim működése révén az RNS templátként szolgál, és a szintézisreakció során létrejön az RNS-templáttal komplementer cDNS-lánc. A Taq enzim működése révén a DNS szolgál templátként, és a specifikus célszakaszok kópiaszáma a magas hőmérsékleten végbemenő denaturáció, valamint a közepes hőmérsékleten végbemenő primerkapcsolódás (annealing) és lánchosszabbítás ciklikus ismétlődése révén sokszorozódik fel. A fluoreszcensen jelölt specifikus próba és a meghosszabbított célszakasz hibridizációja során – a Taq polimeráz 5' → 3' exonukleázának aktivitását kihasználva – a fluoreszcens próba riporter- és kioltó (quencher) csoportja elválik egymástól, és specifikus fluoreszcens jel keletkezik. A fluoreszcens jeleket fluoreszcens PCR-készülékkel detektáljuk. Az eredményt a minta Ct-értéke és az amplifikációs görbe alakja alapján kell értékelni.

## [A készlet összetevői és specifikációja]

| Összetevő                               |                         | Mennyiség |
|-----------------------------------------|-------------------------|-----------|
| Nukleinsav-kivonó reagens               | Kivonókazetta           | 8 db      |
|                                         | Mágnesrúd-védőhüvely    | 8 db      |
| PCR-amplifikációs reagens               | Liofilizált PCR-reagens | 8 db      |
| Egyszer használatos mintavételi készlet | Mintavevő tampon        | 8 db      |
|                                         | Mintatartósító reagens  | 8 cső     |
| Használati útmutató                     |                         | 1 db      |

## [Tárolási feltételek és felhasználhatóság]

A nukleinsav-kivonó reagens környezeti hőmérsékleten tárolandó. A liofilizált PCR-reagenst környezeti hőmérsékleten, fénytől védve kell tárolni.

A készlet 2–8 °C közötti tárolás esetén 18 hónapig, 8–30 °C közötti tárolás esetén 12 hónapig használható fel. Kérjük, a készletet a felhasználhatósági időn belül használja fel.

## **[A műszer üzemi környezete]**

A vizsgálatot 20–25 °C közötti környezeti hőmérsékleten ajánlott elvégezni.

## **[Mintatípusok]**

Mellúri folyadék (pleurális folyadékgyülem), hasúri folyadék (ascites) vagy bélsártampon.

## **[Mintavételi követelmények]**

**Folyékony minta** (beleértve a vérmintát, a hasúri folyadékot és a mellúri folyadékot):

Vegyen ki közvetlenül 200 µL-t, adja a tartósító reagenshez, majd rázza fel és keverje el alaposan – így használható fel. Ha a minta túl nagy mennyiségű, túl tömény vagy túl sűrű, a vizsgálat előtt hígítani kell. Vizelet- és liquorminta (agy-gerincvelői folyadék) esetén ajánlott közvetlenül 200 µL-t az LB jelű csőbe (lyukba) adagolni a kivonáshoz.

### **Tamponminta:**

1. Bélsártampon: a tamponnal vegyen fel megfelelő mennyiségű bélsármintát.
2. Végbél tampon (anális tampon): először nedvesítse meg a tampont a hígítóoldattal, majd azzal törölje le a mintát.
3. Orr-garat tampon: a szemtamponminta vételéhez húzza végig a tampont a szemhéj alatt; a száj- és orrváladékot a tamponnal mérsékelt erővel letörölve vegye le az orr-garat tamponmintát.
4. A tamponminta levétele után a tampon fejét gyorsan törje bele a tartósító oldatba, majd rázza össze alaposan, hogy a tamponfejen lévő kórokozó teljes mértékben beoldódjon a tartósító oldatba.

A mintavétel befejezése után ajánlott a nukleinsav-kivonást azonnal elvégezni; szükség esetén a minta átmenetileg 4 °C-on tárolható, tartósan pedig –20 °C alatt tartható el; a minta beküldésekor hűtve kell szállítani.

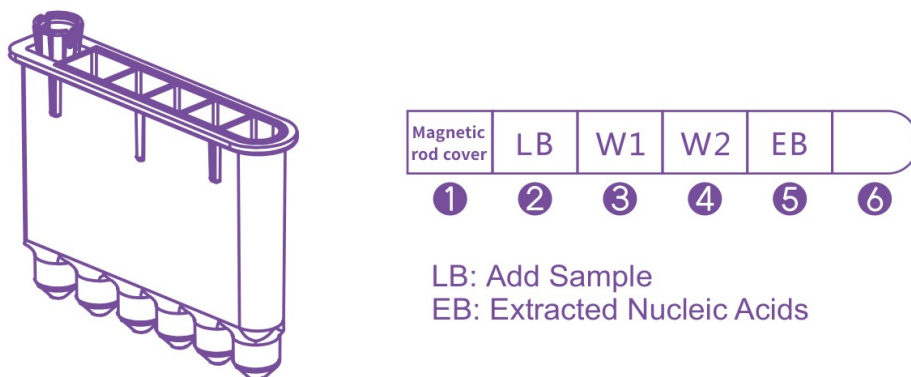
## **[A vizsgálat előtti előkészületek]**

1. A vizsgálat megkezdése előtt figyelmesen olvassa el ezt az útmutatót, ismerje meg az egyes lépéseket, és a készletet szigorúan az útmutatóban foglalt követelményeknek megfelelően használja.
2. A munkavégzés során a kezelő viseljen egyszer használatos kesztyűt és maszkot, és minden műveletet a PCR-vizsgálatok laboratóriumi környezeti követelményeinek megfelelő körülmények között kell elvégezni.
3. A minták számának megfelelő mennyiségű kivonóreagens-kazettát vegyen elő. Kérjük, vegye figyelembe a kazetta lyukainak oldalán található azonosító jelöléseket.

## [A vizsgálat lépései]

### Nukleinsav-kivonás:

1. Vegye elő a szükséges mennyiségű kivonóreagens-kazettát, és az azonosító jelölés alapján húzza le a felső zárófóliát. A kazetta lyukainak elrendezését a vázlatos ábra mutatja.



*Jelmagyarázat az ábrához – Magnetic rod cover: mágnesrúd-védőhüvely; LB (Add Sample): minta beadagolása; EB (Extracted Nucleic Acids): kivont nukleinsav.*

2. Pipettával vegyen ki 200 µL mintát, és adagolja az LB jelű lyukba.
3. Vegyen elő egy mágnesrúd-védőhüvelyt, és helyezze a kazettán a mágnesrúd-védőhüvely számára kialakított helyre.
4. Nyomja meg a készülék „In/Out” (Be/Ki) gombját , helyezze a kazettát az automatikus kivonáshoz a kazettatartóra, majd nyomja meg ismét az „In/Out” gombot, hogy a kazetta bekerüljön a műszerbe, és a kamraajtó bezáródjon.

**Megjegyzés:** A kazettát az oldalán jelölt iránynak megfelelően kell a kazettatartóba helyezni, és annak alján egyenletesen kell felfeküdnie. Ha a kazetta megfelelően van behelyezve, a műszer kezelőpaneljén világít a megfelelő csatorna piros jelzőfénye; ellenkező esetben a jelzőfény nem gyullad ki.

5. Nyomja meg a „Run” (Indítás) gombot , hogy a készülék megkezdje a nukleinsav kivonását; várja meg a futás befejeződését és a hangjelzést (berregő hang), majd a kazetta kivételéhez nyomja meg ismét az „In/Out” gombot.

**Megjegyzés:** A kivont nukleinsavmintát ajánlott azonnal megvizsgálni. Ha a mintát átmenetileg nem használja fel, tárolja  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on vagy  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

### PCR-amplifikáció:

1. Pipettával vegyen ki 20 µL kivont nukleinsav-felülúszót az EB jelű lyukból, és adja a PCR-reagenscsőhöz; ujjával pöccintse meg a reagenscsövet, hogy a száraz por egyenletesen feloldódjon, rázza a csőben lévő összes folyadékot a cső aljára, majd helyezze a csövet a PCR-készülék reakcióhelyére.

**Megjegyzés:** a) Amikor a nukleinsavoldatot pipettával felszívja, ne szívja fel az oldatban esetleg jelen lévő buborékokat.  
b) A liofilizált reagensnek teljesen fel kell oldódnia és el kell keverednie, és a csőben lévő összes reakciófolyadékot a cső aljára kell rázni, különben a háttér zavaró jele túl erőssé válhat, ami befolyásolja az eredmények értékelését.

2. Válassza ki a vizsgálandó kisállat-kórokozónak megfelelő programot, adja meg a minta és a vizsgálati tétel adatait, majd a reakció elindításához kattintson a Run (Indítás) ikonra.
3. A reakció befejezése után időben vegye ki a PCR-terméket tartalmazó csövet, és az egységes ártalmatlanítás érdekében csomagolja simítózáras tasakba.

### [Az eredmények értelmezése]

1. Ha a FAM detektálási csatornán tipikus S alakú amplifikációs görbe látható, és a Ct-érték  $< 36$ , az eredmény **POZITÍVNAK** értékelhető;

2. Ha a FAM detektálási csatornán nem látható tipikus S alakú amplifikációs görbe, és nincs Ct-érték, vagy a Ct-érték  $\geq 36$ , az eredmény **NEGATÍVNAK** értékelhető.

### [A kimutatási módszer korlátai]

1. Az amplifikációs termékek aeroszol útján történő elhurcolása könnyen álpozitív eredményt okozhat, ezért a vizsgálólaboratóriumot szigorúan a PCR-laboratóriumokra vonatkozó követelmények szerint kell kialakítani;
2. A negatív eredmény nem zárja ki teljes bizonyossággal a kórokozóval való fertőzöttség lehetőségét; az eredményt más klinikai mutatókkal együtt kell értékelni.

### [Teljesítményjellemzők]

1. Érzékenység: a készlet kimutatási határa 1000 kópia/ml.
2. Specifitás: a készlet nem ad keresztreakciót például herpeszvírust, calicivírust vagy parvovírust tartalmazó mintákkal.
3. Precizitás: egy erősen pozitív és egy gyengén pozitív mintát 10-10 alkalommal ismételt megvizsgálva a Ct-értékek variációs együtthatója (CV) 5% alatt volt.

### [Óvintézkedések]

1. **A termék ellenőrzése:** a PCR-amplifikációs reagensek használata előtt a csomagolás felbontásakor ellenőrizze, hogy a cső alján lévő száraz por megfelelő állapotú-e (fehér színű, összetapadt). Ha a por elfolyósodott, a reagens nem használható fel, különben befolyásolja a PCR-eredményeket.
2. **Pipettahasználat:** amikor a 20 µL nukleinsav-felúlszót PCR-amplifikációs templátként felszívja, ügyeljen arra, hogy a pipetta nyomógombját csak az első fokozatig (első kattanásig) nyomja le, ne ütközésig, különben a felszívott térfogat meghaladja a 20 µL-t, ami befolyásolja a vizsgálati eredményeket.
3. **A mintaadatok beállítása:** győződjön meg arról, hogy a PCR-cső abban a mérőhelyben van, amelyet a műszeren a mintához beállított. Ha a PCR-csövet az amplifikációs kamra 1-es (1#) mérőhelyére helyezi, a mintabeállítási felületen is az ennek megfelelő 1-es pozíciót válassza ki. A mintanév és a vizsgálati tétel beállítása után a PCR-amplifikáció elindításához kattintson a Run (Indítás) ikonra.

### [Jelölésmagyarázat]

| Jelölés                                                                             | Jelentés                  | Jelölés                                                                             | Jelentés                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|  | Gyártás dátuma            |  | Olvassa el a használati útmutatót               |
|  | Gyártó                    |  | Újrafelhasználni tilos                          |
|  | Tételkód (LOT)            |  | Napfénytől védve tartandó                       |
|  | Hőmérsékleti határértékek |  | $\langle n \rangle$ számú vizsgálathoz elegendő |
|  | Felhasználhatósági idő    |  | Katalógusszám (REF)                             |