

N/RdRp SARS-CoV-2 Detection Kit

N/RdRp SARS-CoV-2 Detection Kit jest przeznaczony do wykrywania koronawirusa SARS-CoV-2 w próbkach od pacjentów z objawami zakażenia COVID-19, próbkach odzwierzęcych, próbkach środowiskowych oraz w żywności. Oczyszczony materiał genetyczny wirusa 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 RdRp (kanał FAM) i N (kanał HEX) charakterystycznych dla SARS-CoV-2. Dodatkowo zestaw zawiera kontrolę wewnętrzną (startery, sondę znakowaną barwnikiem Cy5, egzogenny fragment kwasu nukleinowego—Internal Control), co pozwala na jednoczesną weryfikację procedury izolacji RNA i inhibicji reakcji PCR. Wysoka czułość zestawu pozwala na detekcję wirusa SARS-CoV-2 zarówno w pojedynczych próbkach, jak i próbkach zmieszanych (pulowanych) w ilości maksymalnie 5 próbek indywidualnych.

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. E0435-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E0435-02 500 reakcji po 25 µl
Cov2 Buffer Mix * brązowa probówka	2 x 950 µl	10 x 950 µl
Cov2 Enzyme Mix pomarańczowa nakrętka	100 µl	5 x 100 µl
Internal Control niebieska nakrętka	2 x 500 µl	10 x 500 µl
Positive Control (R/N)** czarna nakrętka	200 µl	1000 µl
RNase free Water przeźroczysta nakrętka	1200 µl	5 x 1200 µl

Przechowywanie

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

* Unikać 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.

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

Barwnik referencyjny ROX

Barwnik referencyjny ROX zawarty w Cov2 Buffer Mix zestawu N/RdRp SARS-CoV-2 Detection Kit umożliwia normalizację fluorescencji w niektórych urządzeniach real-time PCR. Użycie barwnika referencyjnego ROX jest konieczne we wszystkich termocyklerach firmy Applied Biosystems i opcjonalne w przypadku termocyklerów firmy Agilent. ROX kompensuje zmiany sygnału fluorescencyjnego między dołkami z powodu niewielkich różnic w objętości reakcji i fluktuacji fluorescencji. Obecność barwnika ROX nie koliduje z PCR w czasie rzeczywistym na urządzeniach niewymagających tego barwnika referencyjnego.

Przygotowanie próbki RNA

RNA z wymazu, śliny, innej wydzieliny, próbki tkanek/narządów zwierzęcych, próbki środowiskowej, próbki żywności należy wyizolować przy pomocy zestawów dedykowanych do oczyszczania RNA wirusowego. Należy postępować zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta zestawu.

Kontrola wewnętrzna (ang. Internal Control)

Zestaw zawiera system kontroli wewnętrznej, który umożliwia monitorowanie procesu izolacji RNA, a także inhibicji samego procesu PCR.

System kontroli wewnętrznej składa się z:

- primerów i sondy znakowanej barwnikiem Cy5 obecnymi w mieszaninie reakcyjnej Cov2 Buffer Mix,
- egzogenego fragmentu kwasu nukleinowego zawartego w Internal Control.

Kontrola wewnętrzna (Internal Control) może być dodana na etapie izolacji RNA (**pkt A**) - wtedy stanowi zarówno kontrolę procesu oczyszczania RNA, jak i inhibicji reakcji PCR lub wyłącznie na etapie PCR (**pkt B**) - do oceny jakości oczyszczonego RNA i inhibicji reakcji PCR.

- A. Kontrolę wewnętrzną (Internal Control) należy dodać do buforu lizującego lub mieszaniny buforu lizującego i pobranej próbki (nie dodawać bezpośrednio do pobranej próbki) w ilości 0,1 µl na każdy 1 µl objętości elucji. Oznacza to, że w przypadku elucji buforem elucyjnym o objętości 50 µl należy zastosować 5 µl Internal Control w procesie izolacji RNA. Zaleca się używanie nośnikowego (carrier) RNA przy izolacji wirusowego RNA. Nośnikowe RNA zwiększa wydajność wiązania RNA do membran krzemionkowych w obecności niewielkich ilości materiału genetycznego w próbce oraz zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji wirusowego RNA.
- B. Kontrolę wewnętrzną (Internal Control) należy dodać do mieszaniny reakcyjnej w ilości 0,5µl na każde 25 µl reakcji PCR.

Protokół

Przygotowanie reakcji PCR:

	Kontrola negatywna amplifikacji -NAC	Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	Kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC	Próbka RNA	Kontrola pozytywna SARS-CoV2-TPC
Cov2 Buffer Mix	19 µl	19 µl	19 µl	19 µl	19 µl
Cov2 Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Internal Control (opcjonalnie)	-	-	-	0.5 µl	0.5 µl
Positive Control	-	-	-	-	5 µl
RNase free Water	5 µl	-	-	-	-
Próbka oczyszczonej H ₂ O/ oczyszczonej kontroli wewnętrznej/ oczyszczonego RNA	-	5 µl	-	-	-
	-	-	5 µl	-	-
	-	-	-	5 µl	-
Objętość reakcji	25 µl	25 µl	25 µl	25-25.5 µl	25-25.5 µl

Uwagi:

- Jeśli producent urządzenia real time PCR nie zaleca inaczej, reakcje należy nastawiać w objętości 25 µl.
- Wszystkie roztwory należy rozmrozić, delikatnie wymieszać i krótko odwirować. Cov2 Enzyme Mix powinien być trzymany na lodzie, natomiast reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania Cov2 Buffer Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
- Przygotować reakcje PCR zgodnie z powyższą tabelą.
- Dodać:
 - 5 µl wody (kontrola negatywna amplifikacji-NAC),
 - 5 µl wody oczyszczonej zgodnie z procedurą izolacji RNA (kontrola negatywna ekstrakcji-NEC),
 - 5 µl kontroli wewnętrznej oczyszczonej zgodnie z procedurą izolacji RNA (kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC),
 - 5 µl oczyszczonego RNA (próbka RNA),
 - 5 µl Positive Control (kontrola pozytywna SARS-CoV2-TPC).
- Niedodanie 0,5 µl Internal Control w reakcji kontroli pozytywnej SARS-CoV2-TPC spowoduje otrzymanie sygnału wyłącznie w kanałach FAM i HEX. W celu otrzymania sygnału we wszystkich kanałach (FAM, HEX, Cy5), należy dodać do reakcji 0,5 µl Internal Control. Zwiększenie objętości reakcji PCR dla próbek RNA i kontroli pozytywnej SARS-CoV2-TPC o 0,5 µl do 25,5 µl nie wpływa negatywnie na wydajność reakcji PCR.
- Krótko zwirować, aby osadzić roztwory na dnie probówek i usunąć pęcherzyki powietrza. Przygotowane reakcje umieścić w termocyklerze zaprogramowanym zgodnie z poniższą tabelą.

Warunki reakcji PCR:

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

Uwagi:

- Należy stosować standardowe tempo zmian temperatury reakcji PCR (ang. standard ramp, standard mode).

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.

2. Analiza fluorescencyjna w kanałach FAM, HEX, Cy5 powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanale FAM wykrywany jest fragment genu RdRp wirusa SARS-CoV-2, w kanale HEX fragment genu N wirusa SARS-CoV-2, natomiast w kanale Cy5 kontrola wewnętrzna—egzogenny fragment kwasu nukleinowego.

Interpretacja wyników:

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Kanał Cy5	Wynik
Kontrola negatywna amplifikacji-NAC	-	-	-	prawidłowy
Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	-	-	-	prawidłowy
Kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC	-	-	+	prawidłowy
Kontrola pozytywna targetu SARS-CoV2-TPC (- Internal Control) lub (+ Internal Control)	+	+	-	prawidłowy
	+	+	+	
1	-	-	+	negatywny SARS-CoV2 ⁻
2	+	+	+	pozytywny SARS-CoV2 ⁺
3	+	-	+	pozytywny SARS-CoV2 ⁺
4	-	+	+	pozytywny SARS-CoV2 ⁺
5	+	+	-	pozytywny SARS-CoV2 ⁺
6	+	-	-	pozytywny SARS-CoV2 ⁺
7	-	+	-	pozytywny SARS-CoV2 ⁺
8	-	-	-	nieprawidłowy

Uwagi:

- Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli:
 - kontrola negatywna amplifikacji-NAC nie daje sygnału w kanałach FAM, HEX i Cy5,
 - kontrola negatywna ekstrakcji-NEC nie daje sygnału w kanałach FAM, HEX i Cy5,
 - kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC (w przypadku, gdy oczyszczono Internal Control zgodnie z procedurą izolacji RNA) daje sygnał wyłącznie w kanale Cy5 ($C_T \leq 34$),
 - kontrola pozytywna SARS-CoV2-TPC daje sygnał w kanałach FAM i HEX, gdy nie dodano do reakcji Internal Control ($C_T \leq 33$) lub w kanałach FAM, HEX i Cy5, gdy dodano do reakcji Internal Control (C_T we wszystkich kanałach ≤ 33).
- Próbka RNA jest pozytywna (SARS-CoV2⁺) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał w kanale FAM lub kanale HEX (przy wartości $C_T \leq 38$) oraz w kanale Cy5 dla kontroli wewnętrznej ($C_T \leq 34$).
 W sytuacjach, gdy reakcja jest silnie dodatnia (SARS-CoV2⁺), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale Cy5. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji RNA wirusa SARS-CoV-2 i kontroli wewnętrznej (Internal Control).
- Próbka RNA jest negatywna (SARS-CoV2⁻) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał wyłącznie w kanale Cy5 ($C_T \leq 34$).
- Obecność sygnału fluorescencji w kanale Cy5 dla danej próbki świadczy o poprawności przebiegu procesu izolacji RNA i reakcji PCR (w przypadku dodania kontroli wewnętrznej do procesu izolacji RNA), bądź wyłącznie o braku inhibicji PCR (w przypadku dodania kontroli wewnętrznej do mieszaniny reakcyjnej PCR). Bardzo wysokie wartości C_T (>34) w kanale Cy5 mogą wskazywać na częściową inhibicję reakcji PCR. Z kolei całkowity brak sygnału w kanale Cy5 przy jednoczesnym braku sygnału w kanałach FAM lub HEX może wskazywać na całkowitą inhibicję reakcji PCR lub niedodanie RNA do reakcji PCR przy jednoczesnym dodaniu kontroli wewnętrznej w procesie izolacji RNA. W takim wypadku zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji RNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
- Brak sygnału dla kontroli pozytywnej SARS-CoV2-TPC wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.