

Zestaw diagnostyczny wykrywający fragmenty genów RdRp i N wirusa SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 qRT-PCR Detection KIT jest przeznaczony do wykrywania koronawirusa SARS-CoV-2 w próbkach od pacjentów z objawami zakażenia COVID-19 oraz próbkach środowiskowych. 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 wewnątrz (startery, sondę znakowaną barwnikiem Cy5, egzogeny fragment kwasu nukleinowego—Internal Control), co pozwala na jednoczesną weryfikację procedury izolacji RNA i inhibicji reakcji PCR. 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 (2x) * brązowa probówka	2 x 625 µl	10 x 625 µl
Cov2 Enzyme Mix pomarańczowa nakrętka	100 µl	5 x 100 µl
Internal Control niebieska nakrętka	2 x 500 ul	10 x 500 ul
Positive Control (R/N)** czarna nakrętka	200 µl	1000 µl
RNase free Water przezroczysta 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.

Przygotowanie próbki RNA

RNA z wymazu, śliny, innej wydzieliny lub próbki środowiskowej 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 umożliwi 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 (2x),
- 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 μ l na każdy 1 μ l objętości elucji. Oznacza to, że w przypadku elucji buforem elucyjnym o objętości 50 μ l należy zastosować 5 μ l 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 0,5 μ l każde 25 μ l reakcji PCR.

Protokół

Przygotowanie reakcji PCR:

Składnik reakcji	Próbka RNA pacjenta	Kontrola negatywna	Kontrola pozytywna
Cov2 Buffer Mix (2x)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Cov2 Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Positive Control	-	-	5 µl
Opcjonalnie (w przypadku kontroli inhibicji reakcji PCR): Internal Control	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul
Próbka oczyszczonego RNA	5 µl	-	-
RNase free Water	do 25 µl	do 25 µl	do 25 µl
Objętość reakcji	25 µl	25 µl	25 µl

Uwagi:

1. Jeśli producent urządzenia real time PCR nie zaleca inaczej, reakcje należy nastawiać w objętości 25 µl.
2. 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 (2x), ponieważ może to wpłynąć negatywnie na skuteczność reakcji.
3. Przygotować jeden master mix reakcyjny poprzez wymieszanie Cov2 Buffer Mix (2x), Cov2 Enzyme Mix, wody i opcjonalnie Internal Control.
4. Rozporcjować po 20 µl mieszaniny reakcyjnej do próbek lub dołków płytki PCR.
5. Dodać 5 µl wody (kontrola negatywna), 5 µl oczyszczonego RNA (próbka RNA) lub 5 µl Positive Control (kontrola pozytywna).
6. W każdym cyklu testowym, obok badanych próbek DNA, należy nastawić co najmniej jedną kontrolę negatywną i pozytywną. Kontrola negatywna powinna być przygotowywana pierwsza, następnie próbki DNA, a na końcu kontrola pozytywna, aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia.
7. Krótko zwirować, aby osadzić roztwory na dnie próbek i usunąć pęcherzyki powietrza.
8. Przygotowane reakcje umieścić w termocyklerze zaprogramowanym zgodnie z poniższą tabelą.

Warunki reakcji PCR:

Etap	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	50 s	

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

Uwagi:

1. Należy stosować standardowe tempo zmian temperatury reakcji PCR (ang. standard ramp, standard mode).
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 – egzogeny fragment kwasu nukleinowego.

Interpretacja wyników:

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Kanał Cy5	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, badanie należy powtórzyć

Uwagi:

1. Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli: kontrola pozytywna daje sygnał we wszystkich trzech kanałach, natomiast kontrola negatywna daje sygnał wyłącznie w kanale Cy5.
2. Próbkę 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. W wyjątkowych 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).
3. Próbkę RNA jest negatywna ((SARS-CoV2⁻) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - Spełnione są warunki punktu 1,
 - Próbka daje sygnał wyłącznie w kanale Cy5.
4. 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 (>35) w kanale Cy5 mogą wskazywać na częściową inhibicję reakcji PCR. Z kolei całkowity brak sygnału w kanale Cy5 przy jednoczesnym braku sygnału w kanale 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.
5. Brak sygnału dla kontroli pozytywnej wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.