

## 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, egzogeny 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<br>100 reakcji po 25 µl | Nr kat. E0435-02<br>500 reakcji po 25 µl |
|---|--|--|
| Cov2 Buffer Mix *<br>brązowa probówka       | 2 x 950 µl                               | 10 x 950 µl                              |
| Cov2 Enzyme Mix<br>pomarańczowa nakrętka    | 100 µl                                   | 5 x 100 µl                               |
| Internal Control<br>niebieska nakrętka      | 2 x 500 ul                               | 10 x 500 ul                              |
| Positive Control (R/N)**<br>czarna nakrętka | 200 µl                                   | 1000 µl                                  |
| RNase free Water<br>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 <sub>2</sub> O/ | -                                    | 5 µl                              | -                                 | -          | -                                |
| oczyszczonej kontroli wewnętrznej/    | -                                    | -                                 | 5 µl                              | -          | -                                |
| oczyszczonego RNA                     | -                                    | -                                 | -                                 | 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/<br>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<br>(- Internal Control)<br>lub<br>(+ Internal Control) | +         | +         | -         | prawidłowy                       |
|   | +         | +         | +         |                                  |
| 1   | -         | -         | +         | negatywny SARS-CoV2 <sup>-</sup> |
| 2   | +         | +         | +         | pozytywny SARS-CoV2 <sup>+</sup> |
| 3   | +         | -         | +         | pozytywny SARS-CoV2 <sup>+</sup> |
| 4   | -         | +         | +         | pozytywny SARS-CoV2 <sup>+</sup> |
| 5   | +         | +         | -         | pozytywny SARS-CoV2 <sup>+</sup> |
| 6   | +         | -         | -         | pozytywny SARS-CoV2 <sup>+</sup> |
| 7   | -         | +         | -         | pozytywny SARS-CoV2 <sup>+</sup> |
| 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  $\leq 33$ ).
- Próbka RNA jest pozytywna (SARS-CoV2<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup>), 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<sup>-</sup>) 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.