

DIAGNOVITAL

SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-Kit

Qualitativer RT-PCR-basierter Erkennung der SARS-CoV-2 N501Y-Mutation

Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

RUO

REF 

090R01025 25 Tests

090R01050 50 Tests

090R01100 100 Tests

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	3
Produktbeschreibung	3
Mitgelieferte Materialien.....	4
Zusätzliche Materialien Erforderlich	4
Lagerung	4
Leistungsmerkmale	6
Überlegungen vor dem Start.....	7
Probenvorbereitung	8
Reaktions-Setup	9
Analyse & Fehlerbehebung	10
Einschränkungen	12
Warenzeichen.....	12
Symbole	13



Verwendungszweck

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit** ist ein Echtzeit-RT-PCR-basierter Test zur Erkennung und Unterscheidung von SARS-CoV-2 N501Y-Mutationen in Atemwegsproben. **Dieses Kit wurde entwickelt, um nur Proben zu testen, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.**

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit weist die N501Y-Mutation in extrahierter SARS-CoV-2-RNA aus Nasopharyngeal- und Oropharynx-Abstrichproben während einer Infektion nach. Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2 hin. RNA weist eine einzelne Punktmutation nach, die auf den Austausch der Aminosäure Asparagin (N) zu Tyrosin (Y) im Spike-Protein an Position 501 zurückzuführen ist. Eine Mutation an Position 501 wird in einer Abstammungsvariante gefunden. Der Austausch zu Tyrosin ist jedoch spezifisch für die Linie B.1.1.7 Grossbritannien (UK) und kann zur genauen Unterscheidung der verschiedenen Variantentypen von SARS-CoV-2 beitragen, wobei sowohl Wild- als auch Mutantentypen die letztere Substitution gemeinsam haben. Die Mutation befindet sich im Spike-Protein, das sich in der Rezeptor-Bindungsdomäne (RBD) befindet und in einer sich schnell ausbreitenden Abstammungslinie (B.1.1.7) entstanden ist, erhöht die Affinität für das Wildtyp-Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) um das 20-fache. Diese Mutation scheint einen Einfluss auf die Immunantwort des Körpers und möglicherweise auf die Wirksamkeit des Impfstoffs zu haben. Von monoklonalen und aus Serum stammenden Antikörpern wird berichtet, dass sie bei der Neutralisierung von Viren, die eine N501Y-Mutation tragen, weniger wirksam sind.

Produktbeschreibung

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit ist ein Echtzeit-RT-PCR-basiertes Erkennungs- und Unterscheidungssystem für die SARS-CoV-2 N501Y-Mutation. **Dieses Kit wurde entwickelt, um nur Proben zu testen, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.**

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit** weist das Vorhandensein von sequenzspezifischer humaner RNA nach, die als humane Extraktionskontrolle (HEC) dient, und weist Wildtyp-501N-SNP und Y501-SNP in zwei verschiedenen Kanälen nach.

ECHTZEIT-PCR-BASIERTE ERKENNUNG VON SARS-CoV-2

Der erste Schritt bei der Erkennung der SARS-CoV-2 N501Y-Mutation ist die Umwandlung von viraler RNA in cDNA. Anschließend werden die viralen Zielsequenzen und die HEC gleichzeitig in einer Reaktion verstärkt, wobei die Verstärkung durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden in Echtzeit überwacht wird: Beim Einbau in die neu verstärkten DNA-Stränge wird das Fluorophor freigesetzt und die Fluoreszenz erhöht. Signal kann beobachtet werden.

Mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit** wird die Unterscheidung zwischen den viralen Erregern durch die Verwendung von drei verschiedenen Fluorophoren erreicht, die in drei verschiedenen Kanälen erkannt werden: FAM™ für Wildtyp SARS-CoV-2 501N, HEX/VIC für die 501Y-Variante und der HEC wird im Cy5-Kanal nachgewiesen.

Aufgrund der intrinsischen Mutationsrate von Viren ist es möglich, dass Mutationen in der Zielsequenz auftreten und sich im Laufe der Zeit anhäufen. Dies kann bei einem PCR-basierten Nachweisansatz zu falsch-negativen Ergebnissen führen.



Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit** mit Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx validiert und kompatibel mit BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 Real-Time PCR Systems-kalibrierter FAM™, HEX/VIC und Cy5-Kanälen.

Mitgelieferte Materialien

	Reagenzien	Menge und Volumen (25 Tests)	Menge und Volumen (50 Tests)	Menge und Volumen (100 Tests)
1	PCR-Mastermix	1 × 375 µl	1 × 750 µl	1 × 1500 µl
2	Positivkontrolle	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl
3	Nukleasefreies dH ₂ O	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl

Tabelle 1: DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutation PCR Kit Inhalt



WICHTIG! Die obige Tabelle gibt das Standard-Farbschema des Kits wieder. Aufgrund von Lieferantenproblemen während der COVID-19-Krise können einzelne Farben der Röhrchenkappen je nach Verfügbarkeit ersetzt werden. Überprüfen Sie vor der Verwendung immer die Kennzeichnung des Reagenzes.

Zusätzliche Materialien Erforderlich

- Geeignete Mittel & Ausrüstung zur Nukleinsäureextraktion
- Echtzeit-PCR-Detektionssystem ausgestattet für FAM™-, HEX/VIC- und CY5-Erkennung
- Verstellbare Pipetten & passende gefilterte Pipettenspitzen
- Geeignete persönliche Schutzausrüstung und Arbeitsbereiche für die Arbeit mit potenziell infektiösen Proben
- Oberflächendekontaminanten wie DNAzap™ (Life Technologies), DNA Away™ (Fisher Scientific), RNAse Away™ (Fisher Scientific), 10 % Bleichmittel (1:10 Verdünnung von handelsüblichem 5,25-6,0 % Natriumhypochlorit)
- Nukleasefreie Röhrchen/ Streifen/ Platten zur Herstellung von Verdünnungen, Mastermixen etc.
- Real-Time PCR-Reaktionsröhrchen/-platten/-kapillaren

Für **BIO-RAD CFX96:** Hard-Shell Dünnwandige Umrandete 96-Well-PCR-Platten mit Barcodes (BIO-RAD, Kat.-Nr.: HSP-9955), Hard-Shell Dünnwandige Umrandete 96-Well-PCR-Platten (BIO-RAD, Kat.-Nr.: HSP-9655), Microseal 'B' Klebedichtungen, optisch klar (BIO-RAD, Kat.-Nr.: MSB-1001), Einzelne PCR-Röhrchen, Low Tube Streifen, 8-Röhrchen-Streifen, 0,2 ml Low Profile, Weiß (BIO-RAD, Kat.-Nr.: TCS0851), Flat Cap Strips, optisch klar, 8-Kappen-Streifen, 0,2 ml (BIO-RAD, Kat.-Nr.: TCS0803).

Für **Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx- Quant Studio 5 Real-Time PCR System,** MicroAmp® Optische 96-Well-Reaktionsplatte (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 4306737), MicroAmp® Optischer Klebefilm (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 4311971), MicroAmp® Optischer 8-Röhrchen-Streifen, 0,2 mL (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 4316567), MicroAmp® Optische 8-Kappen-Streifen (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 4323032)

- Geeignete Aufbewahrungsmöglichkeiten für Reagenzien und Proben (4°C, -20°C, -70°C)

Lagerung

- Lagern Sie alle Komponenten bei -15°C /-25°C und vermeiden Sie mehr als 3 Gefrier- und Auftauzyklen.
- Schützen Sie den qPCR-Mastermix vor Licht, da eine längere Exposition die Leistung der Fluorophore beeinträchtigen kann.



- Wenn die Komponenten des Kits während des Transports beschädigt wurden, wenden Sie sich an RTA Laboratories. Nicht verwenden, da die Leistung beeinträchtigt werden kann.
- Halten Sie die Reagenzien vom Probenmaterial getrennt, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Nicht nach dem angegebenen Verfallsdatum verwenden.



Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze für Nukleinsäure-basierte Assays wird durch den 95 % positiven Cutoff-Wert ausgedrückt. Dies ist die Analytkonzentration, bei der 95 % der Testläufe nach seriellen Verdünnungen mit einem Referenzmaterial positive Ergebnisse liefern. In dieser Studie wurde die analytische Sensitivität unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL(MBC137-R) für den Wildtypkanal und VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.1.7 RNA CONTROL (MBC138-R) für den mutierten Kanal analysiert. Verdünnungen wurden durch eine negative klinische RNA-Probe hergestellt. Jede Verdünnung wurde mit 23 Wiederholungen getestet. QuantStudio 5-DX Real-time PCR Systems wurde für die Verstärkung, Signaldetektion und Analyse der Ergebnisse verwendet. Die Probit-Analyse wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics 27 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unten gezeigt.

Tabelle 1: DIAGNOVITAL N501Y Mutation Detection - Erkennungsgrenze (LoD)-Werte und 95 % Konfidenzbereiche

Zielgen	Erkennungsgrenze (Kopien/ml)	95 % Konfidenz untere Grenze	95 % Konfidenz obere Grenze
N501	4839.214	3429.205	8937.276
501Y	6092.285	4797.293	9125.916

Diagnostische Spezifität

Insgesamt 168 klinische Proben, die von Covid19-Patienten gesammelt wurden, wurden sowohl mit dem DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit als auch mit Next Generation Sequencing analysiert. 109 der Proben waren positiv und 58 davon negativ mit beiden Methoden für die N501Y-Mutation. Eine N501Y-negative Probe ergab aufgrund einer anderen Mutation in der Zielregion keine Verstärkung für keine der Mutanten- und Wildtyp-Ziels, so dass das Ergebnis nicht schlüssig war. Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) des DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit in Bezug auf NGS beträgt 100 % und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) beträgt 98,31 %. Alle internen Kontrollen (RNaseP) wurden positiv getestet.

		Komparator (NGS und qPCR)	
NP-Tupfer		Mutant	Wildtyp
DIAGNOVITAL SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit	Y501	109	0
	N501	0	58
	Nicht definiert	0	1*
	Gesamt	109	59

Tabelle 3: DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit – NGS qPCR Korrelationsstudie



Kreuzreaktivität

Um die Spezifität eines Assays zu untersuchen, sollten Kreuzreaktivitätsstudien für potenzielle kreuzreaktive Marker durchgeführt werden. In dieser Studie wurde die Spezifität des Assays durch Tests bewertet. 20 Referenzorganismen.

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit zeigt keine Kreuzreaktivität mit anderen potenziellen kreuzreaktiven Markern, die in Tabelle 3 unten aufgeführt sind:

Tabelle 3: In der Studie getestete potenzielle kreuzreaktive Marker

Stichprobe	Quelle
Humanes Adenovirus	NIBSC (Kat. No: 16/324)
Parainfluenza-Virus	ATCC VR-93
Grippe A	ATCC VR-95
Grippe A H5N1	ATCC VR-1609
Influenza A H1N1	ATCC VR-1672
Influenza A H3N2	ATCC VR-822
Influenza A H7N7	ATCC VR-1641
Grippe B	ATCC VR-101
Parainfluenza 1	ATCC VR-94
Parainfluenza 2	ATCC VR-92

Stichprobe	Quelle
Parainfluenza 3	ATCC VR-93
Parainfluenza 4	ATCC VR-579
Humanes Metapneumovirus (hMPV)	ATCC VR-3250SD
Humanes Enterovirus V71	ATCC VR-1432
Humanes Respiratorische Synzytial-Virus	ATCC VR-154
Humanes Coronavirus NL63	ATCC VR-3263SD
Humanes Coronavirus HKU1	ATCC VR-3262SD
Humanes Coronavirus 229E	ATCC VR-740
Betacoronavirus 1 OC43	ATCC VR-1558D
MERS Coronavirus	ATCC VR-3248SD

Überlegungen vor dem Start

BIO-SICHERHEIT

- Tragen Sie bei der Arbeit mit klinischen Proben geeignete persönliche Schutzausrüstung (z. B. Kittel, puderfreie Handschuhe, Augenschutz).
- Die Probenverarbeitung sollte in einer zertifizierten biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II nach den Richtlinien der biologischen Sicherheitsstufe 2 oder höher erfolgen.
- Weitere Informationen finden Sie unter:
- Vorläufige Richtlinien für die Entnahme, Handhabung und Prüfung klinischer Proben von untersuchten Patienten (PUIs) für das neuartige Coronavirus 2019 (SARS-COV-2) [https:// www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html)



- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 6. Auflage erhältlich unter <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>.
- Die Verwendung des DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit und die Datenauswertung sind ausschließlich geschultem Laborpersonal vorbehalten.
- Eine gute Laborpraxis ist für die optimale Leistung dieses Assays unerlässlich. Besondere Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination der Komponenten des Kits zu vermeiden. Alle Reagenzien müssen engmaschig auf Verunreinigungen und Kontamination überwacht werden. Entsorgen Sie verdächtige Reagenzien gemäß den örtlichen Richtlinien und Vorschriften.

PROBEN

Verwenden Sie zum Testen nur geeignete Proben, wie zum Beispiel:

- Atemproben einschließlich nasopharyngealer/oropharyngealer Abstriche und bronchoalveolärer Lavage.
- Abstrichproben sollten nur auf Tupfern mit einer synthetischen Spitze (wie Polyester oder Dacron®) mit Kunststoffschachtel entnommen werden. Tupfer mit Calciumalginat oder Wattestäbchen mit Holzschachtel sind nicht akzeptabel.

PROBEN - HANDHABUNG UND LAGERUNG

- Die Proben können nach der Entnahme bis zu 72 Stunden bei 2-8°C gelagert werden.
- Wenn eine Verzögerung der Extraktion erwartet wird, lagern Sie Proben bei -20°C oder niedriger.
- Extrahierte Nukleinsäuren sollten bei -20°C oder niedriger gelagert werden.

Verwenden Sie keine Proben, wenn

- sie wurden nicht bei 2–8°C (≤ 4 Tage) aufbewahrt oder bei -20°C oder darunter eingefroren.
- sie sind unzureichend gekennzeichnet oder weisen keine Dokumentation auf.
- sie sind hierfür nicht geeignet (geeignetes Probenmaterial siehe oben).
- das Probenvolumen ist nicht ausreichend.

Probenvorbereitung

- Die Leistung von RT-PCR-Assays hängt stark von der Menge und Qualität der Proben-Templat-RNA ab. Es wird dringend empfohlen, RNA-Extraktionsverfahren für die Gewinnung und Reinheit zu qualifizieren und zu validieren, bevor Proben getestet werden.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-Kit** wird mit dem RTA Viral RNA Isolation Kit validiert.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-Kit** ist kompatibel mit dem Tianlong Genotex96 Extraction System und dem QIAamp® MinElute Virus Spin Kit, VERSANT® Sample Preparation 1.0 Reagents.
- *Validierte Real-Time PCR-Systeme* : Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx.
- *Kompatible Real-Time PCR-Systeme* : BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 Real-Time PCR Systems
- Lagern und bewahren Sie Restproben und extrahierte Nukleinsäuren bei -20°C oder -80°C auf.
- Tauen Sie nur die Anzahl der Probenextrakte auf, die an einem einzigen Tag getestet werden.
- Extrakt vor dem Test nicht mehr als einmal einfrieren/auftauen, da jedes Einfrieren/Auftauen die RNA-Qualität verringert.
- Je nach Probentyp kann es möglich sein, Patientenproben direkt zu verwenden. Dies kann jedoch einen vorherigen Lyse-schritt und eine Titration der Probenmenge erfordern, die ohne Hemmung der Reaktion verwendet werden kann. Dieses Verfahren wurde nicht validiert, die Verwendung von isolierter RNA wird empfohlen.



Reaktions-Setup

1. Stellen Sie sicher, dass alle notwendigen Ausrüstung und Geräte geeignet, kalibriert und funktionsfähig sind, bevor Sie mit den Experimenten beginnen.
2. Dekontaminieren Sie Ausrüstung und Arbeitsbereich und bereiten Sie alles vor, was für das folgende Experiment benötigt wird, um den Arbeitsablauf kurz und wiederholbar zu halten.
3. Schalten Sie das PCR-Detektionssystem ein und programmieren Sie es, um Verzögerungen nach dem Einrichten der Reaktionen zu vermeiden.
4. Tauen Sie alle Komponenten des **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit** auf Eis auf und mischen Sie sie vorsichtig, aber gründlich, um eine gleichmäßige Verteilung der Komponenten zu gewährleisten. Sammeln Sie Flüssigkeit am Boden des Röhrchens mit einer schnellen Drehung (über Mikrozentrifuge).
5. Der mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit** gelieferte **PCR Master Mix** ist gebrauchsfertig. Für jede Probe wird eine Reaktion vorbereitet. Für Negativkontrolle (NTC) und Positivkontrolle (PC) sollte eine separate Reaktion vorbereitet werden.

Komponente	Volumen (µl)
PCR-Mastermix	15
RNA-Isolat/ PC/ NTC	5
Gesamt	20


6. Verteilen Sie **15 µl** PCR Master Mix auf Ihre Streifen/Platte und fügen Sie **5 µl Ihrer Proben hinzu**. (Ein Beispiel-Setup finden Sie in **Abb. 1**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	PC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S89
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S90
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S91
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S92
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S93
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S94
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	NTC

Abbildung 1: Beispiel-Pipettierschema für die Verteilung von Mastermischen mit den einzelnen Assay-Mixes

7. Übertragen Sie die Reaktionen auf das PCR-Gerät und gehen Sie dann gemäß diesen Richtlinien vor:



Schritt	Kreisläufe	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	1	50°C	10 Minuten
Anfängliche Denaturierung	1	95°C	2 Minuten
Verstärkung	40	95°C	5 Sekunden
		60°C* 	30 Sekunden



*Aktivieren Sie die Datenerfassung für **FAM™** (501N SARS-CoV-2), **HEX/ VIC** (N501Y SARS-CoV-2 Variant) und **Cy5** (HEC).

- Öffnen Sie nach Abschluss des Laufs die Reaktionsgefäße nicht, um eine Kontamination zu vermeiden, und entsorgen Sie sie gemäß den örtlichen Richtlinien und Vorschriften. Nicht autoklavieren, da dadurch Laborgeräte mit Amplikons kontaminiert werden können.

Analyse & Fehlerbehebung

BEISPIELHAFTE ERGEBNISSE

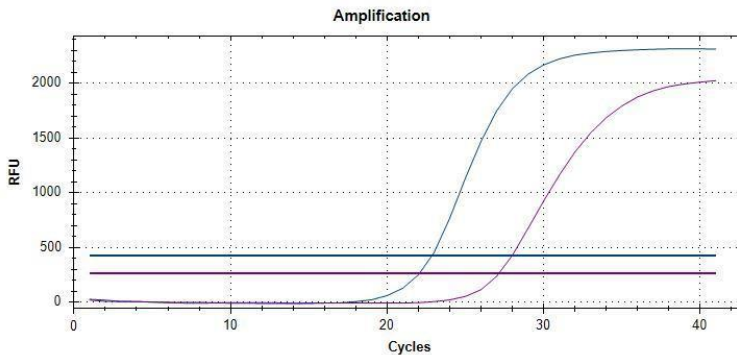


Abbildung 2: Blau Kurven: *N501 Wildtyp-Probe* am **FAM**-Kanal, Violette Kurven: interne Kontrolle am **Cy5**-Kanal.



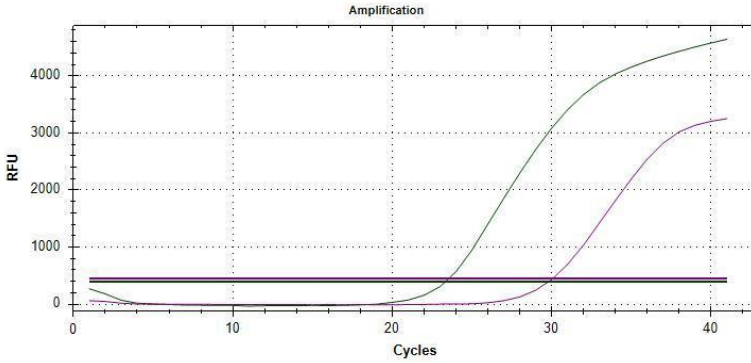


Abbildung 3: Grüne Kurven: Y5 0 1 Mutante positive Probe am HEX -Kanal, Violette Kurven: interne Kontrolle am Cy5 -Kanal.

Für Kontrollen

- Bei der **Positivkontrolle** muss ein positiver Ct an den FAM- und HEX/VIC-Kanälen beobachtet werden. Der Ct-Wert für die Positivkontrolle sollte 20 ± 3 sein. Entspricht der Ct-Wert nicht dem erwarteten Wert oder wurde die Positivkontrolle nicht positiv getestet, war die PCR kompromittiert. Überprüfen Sie das Reaktionssetup und die PCR-Geräteeinstellungen und wiederholen Sie die Reaktionen. Wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen der Positivkontrolle können deren Qualität beeinträchtigen, was zu späten Ct-Werten führt.
- Sowohl im FAM- als auch im HEX-Kanal sollte für die **Negativkontrolle (NTC)** keine Verstärkung beobachtet werden. Eine Verstärkung in der Negativkontrolle zeigt an, dass die Reaktion mit einer Proben-RNA/ DNA verunreinigt ist. Ausrüstung(en) und Arbeitsplatz(e) sollten dekontaminiert und Reaktionen wiederholt werden.

Ergebnisinterpretation

- Alle Reaktionen, die RNA-Isolat enthalten, müssen positive Ct-Werte für den internen Kontrollassay ergeben. Die Ct-Werte sollten < 38 Zyklen betragen. Wenn die interne Kontrolle nicht verstärkt wird, weist dies auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion oder einen Verlust des RNA-Isolats aufgrund einer RNase-Kontamination hin. Die Probe ist nicht ausreichend, Ergebnisse können nicht interpretiert werden.
- Damit eine Probe als **positiv für den Wildtyp N501 SARS-CoV-2** angesehen wird, muss der **FAM™-Kanal einen positiven Ct-Wert aufweisen**. Eine Verstärkung der HEC im **Cy5-Kanal** wird um Ct 20-38 erwartet. Wenn der HEC nicht verstärkt, muss die Probe dennoch als positiv betrachtet werden. Eine Hemmung der internen Kontrolle ist beispielsweise möglich, wenn diese eine hohe Viruslast aufweist oder wenn die Probe aus Zellkulturen stammt und nicht menschlichen Ursprungs ist. Ist der Ct-Wert der Probe > 38 , kann die Probe als negativ bewertet werden.
- Damit eine Probe als **positiv für die Mutante Y5 0 1 SARS-Co V-2 Variante** angesehen wird, muss der **HEX/VIC-Kanal einen positiven Ct-Wert ergeben**.



- Wenn Ct für jeden der FAM-, HEX- und CY5-Kanäle <38 ist, sollte das Ergebnis im jeweiligen Kanal als **POSITIV** betrachtet werden, wenn Ct > 38 ist oder kein Wert empfangen wird, sollte das Ergebnis im entsprechenden Kanal berücksichtigt werden als **NEGATIV**.

FAM	HEX/VIC	Cy5	Ergebnis
-	-	+	Die Probe ist negativ für SARS-CoV-2. Dieses Kit wurde nur für Proben entwickelt, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben. - Stellen Sie sicher, dass die Probe SARS-CoV-2-positiv ist. - Variationen in der Sondenbindungsregionen-Sequenzanalyse mit einer anderen Methode werden empfohlen.
+	-	+	Die Probe ist positiv für Wildtyp N501 SARS-CoV-2.
-	+	+	Die Probe ist positiv für die Y501-Variante SARS-CoV-2.
-	-	-	Keine Verstärkung in irgendeinem Kanal weist auf fehlerhafte RNA-Isolierung, Probenabbau oder PCR-Hemmung hin. Ergebnisse können nicht interpretiert werden. -RNA kann während des Transports, der Extraktion oder Lagerung abgebaut werden.
+	+	-	Erwartetes Ergebnis für die Positivkontrolle (TPC) .
-	-	-	Erwartetes Ergebnis für die Negativkontrolle (NTC) .

Geräteeinstellung

Für **QUANTSTUDIO5DX**, erstellen oder öffnen Sie auf dem Startbildschirm eine Vorlage. Klicken Sie im Bereich Neues Experiment auf die Schaltfläche Neues Experiment erstellen, um eine neue Vorlage zu erstellen. Geben Sie auf der Registerkarte Eigenschaften die Vorlageninformationen ein. Passen Sie auf der Registerkarte Methode das Reaktionsvolumen an und richten Sie ein geeignetes thermisches Profil ein. Weisen Sie auf der Registerkarte Platte (Schnelleinrichtung) Plattenattribute zu, indem Sie die Passive Referenz aus der Dropdown-Liste auswählen. Definieren und weisen Sie auf der Registerkarte Platte (Schnelleinrichtung) Well-Attribute zu und wählen Sie Wells im Platten-Layout oder der Well-Tabelle aus. Weisen Sie dann den ausgewählten Wells Proben und Ziele zu.

Hinweis: Neue Proben- oder Zielnamen, die in der Unterregister Quick Setup eingegeben werden, werden automatisch mit Standardwerten für Reporter als FAM, für Quencher als NFQ-MGB und für Task als Unbekannt gefüllt. Bearbeiten Sie diese Werte im Unterregister Advanced Setup. Für TaqMan-Sonden muss die Option NFQ-MGB als Quencher verwendet werden. Starten Sie dann den Lauf.

Öffnen Sie für **BIORAD CFX 96** in der Software-Anwendung das Protokoll über den Menüpunkt Datei. Erstellen Sie das entsprechende Protokoll für das zu verwendende Kit. Definieren und weisen Sie auf der Registerkarte Platte Well-Attribute zu und wählen Sie Wells im Platten-Layout oder der Well-Tabelle aus. Weisen Sie dann den ausgewählten Wells Proben und Ziele zu. Starten Sie dann den Lauf.

Baseline- und Schwellenwerteinstellungen

Nach dem Lauf,

Für **QUANTSTUDIO5DX**, klicken Sie auf die Schaltfläche Diagrammeinstellungen anzeigen, um den Diagrammtyp von der logarithmischen Skala in die lineare Skala zu ändern. Das Ziel kann im Abschnitt Ziel geändert werden. Klicken Sie dann auf die Schaltfläche Analyseeinstellung, um den Basislinien-Schwellenwert anzupassen. Deaktivieren Sie den automatischen Schwellenwert und deaktivieren Sie die automatische Baseline. Setzen Sie den Basislinien-Startzyklus auf 7-8 und den Basislinien-Endzyklus auf 20, um die Grafik zu normalisieren.

Für **BIORAD CFX 96** kann der Schwellenwert entsprechend dem Verhältnis von FAM zu HEX-Signalhöhe eingestellt werden.

Die Basislinie der Verstärkungskurve ist einer der Parameter, die die PCR-Ergebnisse beeinflussen können. Falls die Basislinie falsch eingestellt ist, kann ein Ct-Wert angezeigt werden, auch wenn keine echte Verstärkung aufgetreten ist. Auto Threshold wird mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Mutationsnachweis-kit** für PCR-Detektionssysteme verwendet. Wenn der Anstieg einer Probe in einem Kanal **weniger als 10 %** des Anstiegs der am stärksten ansteigenden Probe im selben Kanal beträgt, wird dieser Anstieg als **NEGATIV betrachtet**. In einigen Fällen sollte der Schwellenwert manuell eingestellt werden, um Hintergrundfluoreszenz zu vermeiden. Für jede Probe sollte das Verhältnis von FAM zu HEX-Signalhöhe überprüft werden; das Signal, das das andere um das 3-fache oder mehr überwiegt, sollte als positiv angesehen werden, da sich nur eines von ihnen verstärken sollte.



Fehlerbehebung

PROBLEM	MÖGLICHE GRÜNDE	LÖSUNG
Negatives Ergebnis für interne Kontrolle	Der PCR Master Mix war möglicherweise nicht homogen.	Das Pipettieren sollte für den PCR Master Mix durchgeführt werden.
	Die RNA-Isolierung kann möglicherweise nicht richtig durchgeführt werden.	Die Studie sollte aus der Isolation wiederholt werden.
	Das Isolat kann einen Inhibitor enthalten.	Die Real-Time-PCR-Phase sollte wiederholt werden, indem das Isolat 1/10 verdünnt wird.
Positive Zunahmen von NTC-Proben wurden beobachtet	Möglicherweise ist eine Kontamination aufgetreten.	Vom Arbeitsbereich bis zu den Verbrauchsmaterialien, an denen gearbeitet wird, kann eine Kontamination aufgetreten sein. Es wird empfohlen, Verbrauchsmaterialien zu entsorgen und neue zu öffnen und die Umgebung zuerst mit 10 % NaClO-Lösung und dann mit 70 % Alkohol zu reinigen.

Einschränkungen










- Dieses Kit wurde entwickelt, um nur Proben zu testen, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.
- Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, müssen die Richtlinien in diesem Handbuch unbedingt eingehalten werden. Änderungen des Reaktionsaufbaus oder des Kreislaufprotokolls können zu fehlgeschlagenen Experimenten führen.
- Abhängig von der Probenmatrix können Inhibitoren in der isolierten RNA vorhanden sein und die reverse Transkription und/oder PCR-Verstärkung deaktivieren. In diesem Fall kann ein anderer Probentyp oder eine andere Isolierungsmethode von Vorteil sein.
- Spontane Mutationen innerhalb der Zielsequenz können dazu führen, dass die Zielsequenz nicht erkannt wird.
- Ergebnisse müssen immer unter Berücksichtigung aller anderen Daten aus einer Probe interpretiert werden. Die Interpretation muss von Personal durchgeführt werden, das mit dieser Art von Experimenten geschult und erfahren ist.

Warenzeichen

QIAamp® (QIAGEN), DNAZap™ (Life Technologies), DNA Away™, RNase Away™

Eingetragene Namen, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten nicht als rechtlich ungeschützt.

Symbole

	Verfallsdatum
	Chargen
	Katalognummer
	Temperaturbegrenzung
	Vorsicht
	Hersteller
	Nur für Forschungszwecke.
	Konsultieren Sie die Gebrauchsanweisung oder konsultieren Sie die elektronische
	Enthält ausreichend für (n) Mengentests



RTA LABORATUVARLARI
BİYOLOJİK ÜRÜNLER İLAÇ VE
MAKİNE SAN. TİC. A.Ş.
GEPOSB Cumhuriyet Cad. Nr:3
41400 Gebze / Kocaeli / Türkiye

Tel: +90 262 648 5300
E-mail: rta@rtalabs.com.tr
Web: www.rtalabs.com.tr

