

DIAGNOVITAL

SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit

Qualitativer RT-PCR-basierter Erkennung von SARS-CoV-2 delH69V70 Mutation

Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

RUO

REF



090R02025 25 Tests

090R02050 50 Tests

090R02100 100 Tests

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	3
Produktbeschreibung	3
Mitgelieferte Materialien	4
Zusätzliche Materialien Erforderlich	4
Lagerung	4
Leistungsmerkmale	5
Überlegungen vor dem Start	6
Probenvorbereitung	7
Reaktions-Setup	7
Analyse & Fehlerbehebung	9
Einschränkungen	12
Warenzeichen	12
Symbole	13

Verwendungszweck

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit** ist ein Echtzeit-RT-PCR-basierter Test zur Erkennung und zur Unterscheidung von SARS-CoV-2 delH69V70-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 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit weist delH69V70-Mutations-RNA in nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichproben während einer Infektion nach. Die B.1.1.7-Linie, 69-70del, wird durch den Verlust von zwei Aminosäuren definiert und kann bei immungeschwächten Menschen das Ausweichen einer Immunantwort bewirken. Dies kann die Wirksamkeit des Impfstoffs beeinträchtigen, da die Mutation die Proteinspitzen beeinflusst. Das mutierte $\Delta 69/70$ -Virus enthält zwei zusätzliche Veränderungen, die in den UK-Mutationen vorhanden sind: Aminosäure-69- und -70-Deletion ($\Delta 69/70$). Die Aminosäuren 69 und 70 befinden sich in der N-terminalen Domäne des Spike-S1-Fragments; Deletion dieser Reste könnte die S1-Konformation allosterisch verändern. Die S-Gen-Deletion an den Genompositionen 21765-21770, die den Resten 69-70 im Spike-Protein in der Mutation VOC 20212/01 entspricht, und andere Mutationen, die diese Mutation tragen, wie z. Assays, die auf das S-Gen abzielen, um ein negatives Ergebnis zu erzielen (S-Gen-Drop-out).

Produktbeschreibung

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit** ist ein Echtzeit-RT-PCR-basiertes Erkennungs- und Unterscheidungssystem für die SARS-CoV-2 delH69V70 Mutation. **Dieses Kit wurde entwickelt, um nur Proben zu testen, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.**

DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit weist das Vorhandensein von sequenzspezifischem humanem Ziel (RNaseP) nach, das als humane Extraktionskontrolle (HEC) zusätzlich zur Wildtypsequenz (21765-21770) und (delH69V70) Deletionsmutation in verschiedenen Kanälen dient.

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

Der erste Schritt bei der Erkennung der Mutation SARS-CoV-2 delH69V70 ist die Umwandlung von viraler RNA in cDNA. Anschließend werden die viralen Zielsequenzen und die RNaseP (HEC) gleichzeitig in einer Reaktion verstärkt, wobei die Verstärkung mit fluoreszenzmarkierten Sonden in Echtzeit überwacht wird: Beim Einbau in die neu verstärkten DNA-Stränge wird das Fluorophor freigesetzt und eine Zunahme des Fluoreszenzsignals kann beobachtet.

Mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit** wird die Unterscheidung zwischen den viralen Erregern unter Verwendung von zwei verschiedenen Fluorophoren erreicht, die in zwei verschiedenen Kanälen erkannt werden: FAM™ für Wildtyp-SARS-CoV-2, HEX/VIC für die delH69V70-Mutation und Cy5 für RNaseP (HEC).

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 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit** ist 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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rtat@rta labs.com.tr
Web: www.rta labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



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



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, Mastermischen usw.
- 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.: TLS0851), 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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rta@rta-labs.com.tr
Web: www.rta-labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze für Assays auf Nukleinsäurebasis 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 durch 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 (MBC138-R) RNA CONTROL für Mutante-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 Amplifikation, 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 2: DIAGNOVITAL delH69V70 Mutationsnachweis - Grenzwerte der Nachweisgrenze (LoD) und 95 % Konfidenzbereiche

Zielgen	Nachweisgrenze (Kopien/ml)	95 % Konfidenz untere Grenze	95 % Konfidenz obere Grenze
WT 6970	1507.816	1137.769	2674.922
M 6970	3207.529	2010.433	13727.424

Diagnostische Spezifität

Insgesamt 192 klinische Proben, die von Patienten mit Covid-Symptomen gesammelt wurden, wurden mit dem DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit und der Next-Generation-Sequenzierungsanalyse für First-Line-Tests analysiert, um die positiven Proben zu bestimmen und 96 von ihnen waren delH69V70 mutationspositiv und 95 von ihnen waren mutationsnegativ. Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) des DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit in Bezug auf NGS beträgt 98,96 % und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) beträgt 100 %. Alle internen Kontrollen (RNAseP) wurden positiv getestet.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rta@rta-labs.com.tr
Web: www.rta-labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



NP-Tupfer		Komparator (NGS und qPCR)	
		Mutant	Wildtyp
DIAGNOVITAL SARS- CoV-2 delH69V70 Mutation Detection Kit	delH69V70 mutant	96	0
	delH69V70 wildtyp	0	95
	Nicht definiert	1*	0
	Gesamt	97	95

Tabelle 1. DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit –NGS qPCR Korrelationsstudie

*Es gibt eine weitere Mutation in der Zielregion

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>
- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 6. Ausgabe verfügbar unter <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>.
- Die Verwendung des **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
 Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
 Gebze /Kocaeli /Türkei
 Telefon: +90 262 648 5300
 Fax: +90 262 751 0677
 E-mail: rta@rta-labs.com.tr
 Web: www.rta-labs.com.tr
 Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



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 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit** wird mit dem RTA Viral RNA Isolation Kit validiert.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit** ist kompatibel mit dem Tianlong Generotex96 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 Lyseschritt 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 **® SARS-CoV-2 delH69V70 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 delH69V70 Mutationsnachweis-Kit** gelieferte **PCR Master Mix** ist gebrauchsfertig. Für jede Probe wird eine Reaktion vorbereitet. Für Negativkontrolle (NTC) und Positivkontrolle



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rtal@rta-labs.com.tr
Web: www.rta-labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



(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 Mastermixen 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 Datensammlung für **FAM™** (Wildtyp SARS-CoV-2), **HEX/VIC** (delH69V70 SARS-CoV-2 Mutation) und **Cy5** (HEC).

8. 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



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
 Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
 Gebze /Kocaeli /Türkei
 Telefon: +90 262 648 5300
 Fax: +90 262 751 0677
 E-mail: rtal@rta-labs.com.tr
 Web: www.rta-labs.com.tr
 Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



Analyse & Fehlerbehebung

BEISPIELHAFTE ERGEBNISSE

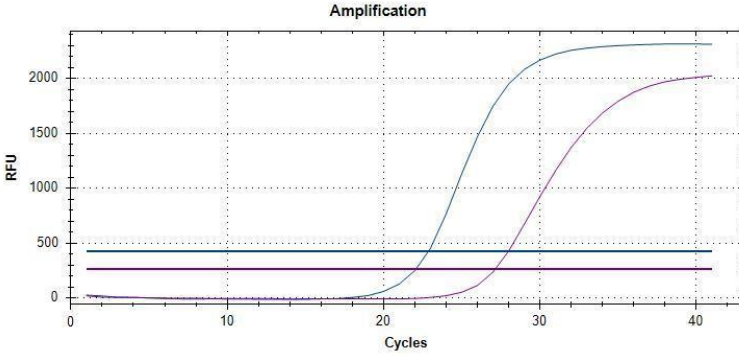


Abbildung 2: Blaue Kurven: delH69V70 Wildtyp-Probe am FAM -Kanal, Violette Kurven: interne Kontrolle am Cy5-Kanal.

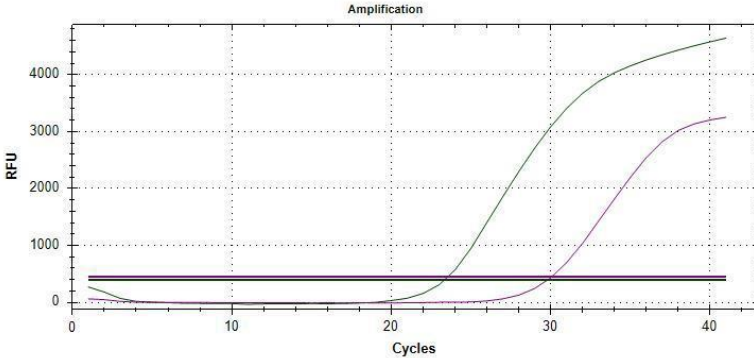


Abbildung 3: Grüne Kurven: delH69V70 Mutante positive Probe am HEX-Kanal, Violette Kurven: interne Kontrolle am Cy5 -Kanal.

- **dH₂O-Kontrollen (NTC) dürfen bei keinem Assay einen positiven Ct-Wert ergeben.** Wenn dies der Fall ist, war die Reaktion mit Proben-RNA/DNA verunreinigt. Dekontaminieren Sie Geräte und Arbeitsbereich und wiederholen Sie die Reaktionen.
- **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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rtal@rta-labs.com.tr
Web: www.rta-labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



- **Damit eine Probe als negativ für die delH69V70-Mutation angesehen wird, muss der FAM™-Kanal einen positiven Ct-Wert aufweisen.** Eine Verstärkung der HEC im Cy5-Kanal wird um Ct 20-38 erwartet.
- **Damit eine Probe als positiv für die mutierte delH69V70-Mutation angesehen wird, muss der HEX/VIC -Kanal einen positiven Ct-Wert aufweisen.** Sollte sich der HEC nicht verstärken, muss die Probe dennoch als positiv betrachtet werden. Dieses Ergebnis ist möglich, wenn ein ungewöhnlich hoher Virustiter vorliegt oder die Probe nicht menschlichen Ursprungs ist, sondern aus Zellkulturen gewonnen wurde oder eine Oberflächenkontamination analysiert wurde.
- **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.
- Wenn Ct für jeden der FAM-, HEX/VIC- 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 den Sondenbindungsregionen - Sequenz-Analyse mit einer anderen Methode wird empfohlen.
+	-	+	Die Probe ist negativ für die delH69V70-Mutation.
-	+	+	Die Probe ist positiv für die delH69V70-Mutation.
-	-	-	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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rta@rta-labs.com.tr
Web: www.rta-labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



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-Signalthöhe 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 delH69V70 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-Signalthöhe 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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rta@rta labs.com.tr
Web: www.rta labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



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

DIAGNOVITAL[®], NucliSens[®] (bioMérieux), QIAamp[®], RNeasy[®] (QIAGEN), ChargeSwitch[®] (Invitrogen), ROX[™], FAM[™] (Life Technologies), DNAZap[™], 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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rta@rta-labs.com.tr
Web: www.rta-labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-



Symbole



Verfallsdatum



Chargen



Katalognummer



Temperaturbegrenzung



Achtung



Hersteller



Konsultieren Sie die
Gebrauchsanweisung oder
konsultieren Sie die elektronische
Gebrauchsanweisung



Enthält ausreichend für (n) Mengentests



Nur für Forschungszwecke



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



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400
Gebze /Kocaeli /Türkei
Telefon: +90 262 648 5300
Fax: +90 262 751 0677
E-mail: rta@rtalabs.com.tr
Web: www.rta labs.com.tr
Revisionsdatum/ Revisionsnummer: -/-

