

SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit

Kit-Komponenten:

SARS-CoV-2 1-Tube RT-qPCR Master Mix (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0430-01	Artikel Nr. E0430-02
	100 Reaktionen, je 25 µl, 2,5 ml (1x) Endvolumen	500 Reaktionen, je 25 µl, 12,5 ml (1x) Endvolumen
Cov Puffer-Mix (2x) Braunes Reaktionsgefäß	5 x 250 µl	5 x 1.250 µl
Cov Enzym-Mix Orangefarbener Deckel des Reaktionsgefäßes	100 µl	5 x 100 µl
Positivkontrolle * Schwarzer Deckel des Reaktionsgefäßes	20 µl	100 µl
Wasser, nukleasefrei Farbloser Deckel des Reaktionsgefäßes	3 x 500 µl	5 x 500 µl

- Die Positivkontrolle sollte separat von allen anderen Komponenten des Kits gelagert werden.

SARS-CoV-2 1-Tube RT-qPCR Master Mix (2x) plus ROX Solution

Komponente	Artikel Nr. E0431-01	Artikel Nr. E0431-02
	25 Reaktionen, je 25 µl, 625 µl (1x) Endvolumen	100 Reaktionen, je 25 µl, 2,5 ml (1x) Endvolumen
CoV Puffer-Mix (2x) Braunes Reaktionsgefäß	5 x 250 µl	5 x 1.250 µl
ROX Lösung, 25 µM	15 µl	60 µl
CoV Enzym-Mix Orangefarbener Deckel des Reaktionsgefäßes	100 µl	5 x 100 µl
Positivkontrolle * Schwarzer Deckel des Reaktionsgefäßes	20 µl	100 µl
Wasser, nukleasefrei Farbloser Deckel des Reaktionsgefäßes	3 x 500 µl	5 x 500 µl

- * Die Positivkontrolle sollte separat von allen anderen Komponenten des Kits gelagert werden.

Lagerung:

Lagerung aller Komponenten bei -20°C im Dunklen.

Das SARS-CoV-2 qRT-PCR Kit ist ein Dual-Target-System mit interner Positivkontrolle. Es wurde entwickelt für den Nachweis von SARS-CoV-2 Coronavirus in Probenmaterial von Patienten mit Symptomen einer COVID-19 Infektion. Geeignetes Probenmaterial sind RNA-Präparationen aus Hals und Nase sowie aus Speichelproben.

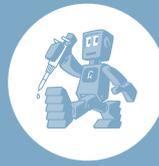
Virale RNA wird mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die Amplifikation wird durch den Abbau fluoreszenzmarkierter, SARS-CoV-2-spezifischer Sonden quantitativ gemessen, wobei die Sonden spezifisch zu konservierten Regionen in den Genen ORF1ab und NP sind.

Als interne Positivkontrolle dienen Sonde und Primer, die spezifisch an das humane ACTB-Gen binden (Beta-Actin codierendes Gen). Mit der internen Positivkontrolle wird überprüft, (1) ob Probenmaterial auf dem Abstrich vorhanden ist und (2) mit welcher Qualität die Nukleinsäurereinigung erfolgt ist.

Der Test erfüllt die Anforderungen, die in der WHO-Empfehlung "Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases" vom 2. März 2020 niedergelegt wurden. Dieser RT-qPCR Test zeigt keine Kreuzreaktionen gegen andere Erreger respiratorischer Krankheiten.

Eigenschaften:

- Der Master Mix ist mit den meisten marktüblichen Real-Time PCR-Geräten kompatibel.
- Der Enzymmix enthält Reverse Transkriptase, "Hot Start" DNA Polymerase, und RNase Inhibitor.
- Die Reverse Transkriptase arbeitet bei einer erhöhten Temperatur von 50°C, um Spezifität und Stringenz zu maximieren. Sie eignet sich damit hervorragend zur reversen Transkription auch von RNA mit Abschnitten starker Sekundärstrukturen, ohne an Spezifität und Sensitivität einzubüßen.
- cDNA Synthese und die anschließende PCR-Amplifikation werden in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt, unter Verwendung genspezifischer Primer und wahlweise entweder totaler RNA oder isolierter mRNA.
- Die Polymeraseaktivität wird durch irreversible Denaturierung des chemischen Inhibitors während des einleitenden Denaturierungsschrittes wieder hergestellt.
- Werden qPCR Apparate von der Fa. Applied Biosystems eingesetzt, muss der passive Referenzfarbstoff ROX zwingend verwendet werden. Für manche Geräte der Fa. Stratagene kann ROX optional eingesetzt werden. Der Probe RT-qPCR Master Mix ist, je nach Bedarf, in zwei Varianten erhältlich, (1) ohne ROX und (2) mit ROX in einem separaten Reaktionsgefäß. Die unten aufgeführte Tabelle zeigt die empfohlenen Mengen an ROX für verschiedene qPCR Apparate.



SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit

REAL TIME qPCR PROTOKOLL

qPCR- Protokoll

Für bestimmte Echtzeit-PCR-Geräte benötigte ROX-Volumina:

Instrument	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Endgültige ROX-Konzentration
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 und 7700	0,5 µl	500 nM
Applied Biosystems: 7500, ViiA 7 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0,5 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	50 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte: Bio-Rad, Roche, Corbett, Eppendorf, Cepheid, etc.	Nicht benötigt	-

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	RNA aus Patientenprobe	Negativkontrolle	Positivkontrolle
CoV Buffer Mix	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
CoV Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Positivkontrolle	-l	-	5 µl
Gereinigte RNA aus Patientenproben	5 µl	-	-
Wasser, nukleasefrei	6,5 µl	11,5 µl	6,5 µl
Endvolumen	25 µl	25 µl	25 µl

Programm für das Echtzeit-PCR-Gerät:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Reverse Transkription	50 °C	15 min	1
Einleitende Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung Primer-Bindung, Verlängerung, Datenerfassung	95 °C 60 °C	10 s 40 s	40-45

Hinweise zur Durchführung des RT-qPCR Protokolls:

Probenvorbereitung

RNA von Probenmaterial auf Wattetupfern, aus Speichel oder anderen Körperflüssigkeiten sollte mit geeigneten Kits zur Aufreinigung viraler RNA extrahiert werden. Befolgen Sie die Anleitungen des Kit-Herstellers.

- Berechnen Sie das benötigte Gesamtvolumen, indem Sie das benötigte Volumen jeder Komponente mit der gewünschten Anzahl an Reaktionen multiplizieren. Die Reaktionen können bei Raumtemperatur vorbereitet werden. Der Enzym-Mix sollte bis zu seiner Verwendung auf Eis gelagert werden.
- Bereiten Sie einen Reaktions-Master Mix vor, in dem für jede der drei Reaktionskomponenten (CoV-Puffer-Mix [2x], CoV-Enzym-Mix, RNase freies Wasser) jeweils das benötigte Gesamtvolumen zusammengefügt und gemischt wird - mit Ausnahme der RNA aus Patientenproben! Vor der Entnahme des CoV-Puffer-Mix soll der Puffer durch mehrmaliges Pipettieren schonend gemischt werden.
- Die Komponenten des Reaktions-Master-Mixes sollten schonend gemischt werden, z.B. durch Pipettieren, keinesfalls aber durch Vortexen.
- Jeweils 20µl des Reaktions-Master-Mixes wird nun in die einzelnen Reaktionsgefäße vorgelegt (Ber-Streifen oder 96er Platten).
- Nun werden die einzelnen Nachweis-Reaktionen angesetzt, in der folgenden Reihenfolge:
 - 5a: Negativkontrolle: 5 µl Wasser werden in die vorgesehenen Reaktionsgefäße gefüllt. Die Tubes werden verschlossen, um eine Kontamination mit Patienten-RNA zu vermeiden.
 - 5b: Proben von Patienten-RNA: Je 5 µl gereinigter RNA werden in die vorgesehenen Reaktionsgefäße gefüllt.
 - 5c: Positivkontrolle: 5 µl der Positivkontrolle werden in die vorgesehenen Reaktionsgefäße gefüllt.
- Mindestens je eine Positiv- und Negativkontrolle sollten in jedem PCR-Lauf zur Qualitätssicherung eingesetzt werden.
- Die vorbereiteten Reaktionen werden in einen qPCR-Thermozykler überführt und mit folgendem Programm amplifiziert. factor" - Platte gemäß den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.

Die Fluoreszenz wird während des kombinierten Annealing- / Extensions-schrittes auf drei Kanälen gemessen:

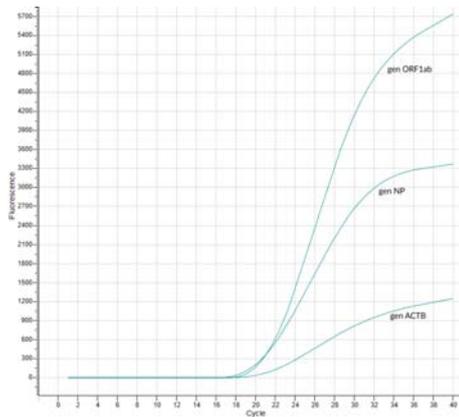
- FAM für das ORF1ab - Gen,
- JOE für das ACTB - Gen und
- ROX für das NP - Gen.



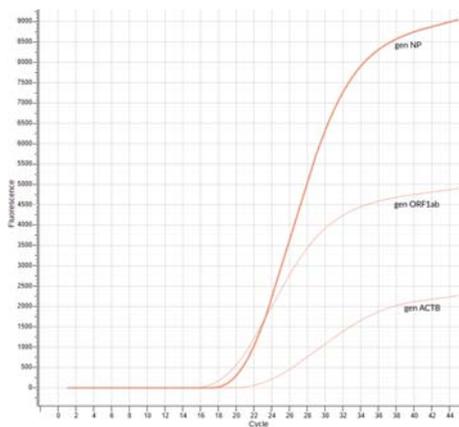
SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit

EVALUATION

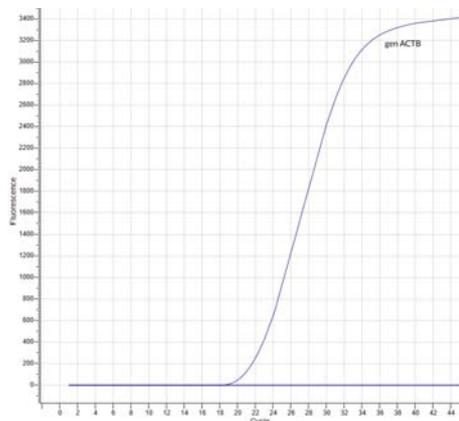
Positivkontrolle:



Positiv auf SARS-CoV-2:



Negativ auf SARS-CoV-2:



Probentyp	FAM Kanal, ORF1ab (CoV)	JOE Kanal, ACTB (human)	ROX Kanal, NP (CoV)	Ergebnis
Negativ- kontrolle	-	-	-	Korrekt
Positiv- kontrolle	+	+	+	Korrekt
1	-	+	-	SARS-CoV- 2-Negativ
2	+	+	+	SARS-CoV- 2-Positiv
3	+	+	-	SARS-CoV- 2-Positiv
4	-	+	+	SARS-CoV- 2-Positiv
5	-	-	-	Inkorrekt, Test wieder- holen
6	+	-	+	Inkorrekt, Test wieder- holen

Hinweise:

Wird ein inkorrektes oder uneindeutiges Testresultat erhalten, sollte der Test wiederholt werden.

Alle Tests sollen durch geschulte, qualifizierte Mitarbeiter gemäß guter Laborpraxis durchgeführt werden. Die Ergebnisse des Tests sind stets im Kontext akuter, klinischer Symptome und der individuellen Krankheitsgeschichte zu beurteilen.

Es ist für ein korrektes Testergebnis erforderlich, dass die Proben korrekt entnommen wurden und dass Qualität wie Reinheit der isolierten RNA hoch ist.