

gb SARS-CoV-2 Variant E484K, L452R

Kat. č.: 3236-100
3236-500



generi biotech

ÚČEL POUŽITÍ

Souprava gb SARS-CoV-2 Variant E484K, L452R umožňuje multiplexní stanovení přítomnosti RNA viru SARS-CoV-2 (Wuhan coronavirus 2019) a zároveň jeho mutací E484K a L452R v genu S. E484K je klíčovou tzv. „escape“ mutací, která způsobuje sníženou vazbu neutralizačních protilátek a nachází se ve variantách Beta (B.1.351) a Gamma (P.1). L452R se nachází ve variantách Delta (B.1.617.2), Kappa (B.1.617.1), Epsilon (B.1.427, B.1.429). Falešná negativita je kontrolována pomocí exogenní pozitivní kontroly s arteficiální sekvencí.

PRINCIP VYŠETŘENÍ

Vyšetření je založeno na metodice **jednokrokové (one-step) RT-qPCR**. Souprava obsahuje všechny potřebné komponenty pro provedení stanovení.

PRACOVNÍ POSTUP

- 1) Před každým použitím nechte reagentie kompletně rozmrznout, důkladně je promíchejte a krátce stočte.

Provedení izolace RNA

- 2) Přidejte **10 µl EPC Template RNA** (zkumavka se žlutým víčkem) do každé izolace.
- 3) Je doporučeno připravit samostatnou negativní kontrolu izolace s **Deionized Water** jako vzorkem a s **10 µl EPC Template RNA**.
- 4) Provedte izolaci RNA podle standardního izolačního protokolu vaší laboratoře.

Provedení RT-qPCR

- 5) Přeneste **10 µl** (* počet vzorků) ze zkumavky **Master Mix OneStep Multi** (zkumavka s modrým víčkem) a **5 µl** (* počet vzorků) **Assay CoV-2 E484K, L452R** (zkumavka se zeleným víčkem) do nové zkumavky, řádně promíchejte, stočte a označte datem přípravy. Takto připravíte **kompletní assay**. Se směsí zacházejte dle instrukcí uvedených v kapitole Podmínky skladování a manipulace.

Alternativní krok: Pokud nebyl **EPC Template RNA** přidán do izolace, lze jej použít jako interní pozitivní kontrolu v PCR. V takovém případě pipetujte **0,25 µl** (* počet vzorků) do **kompletní assaye**.

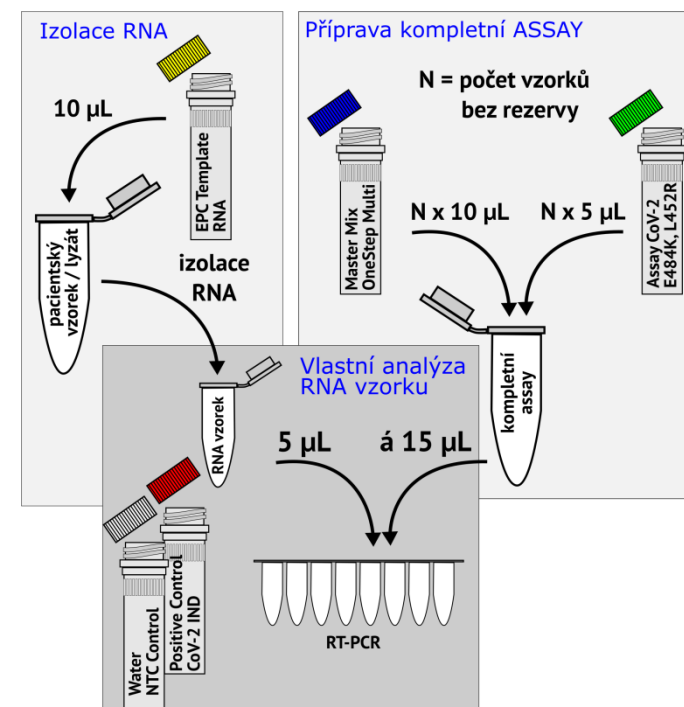
- 6) Připravenou kompletní assay rozpipetujte po **15 µl** do zkumavek určených pro cyklér nebo do jamek plata.
- 7) K assayi přidejte **5 µl** vzorku templátu RNA a krátce stočte.
 - V jednotlivých runech je pro správné vyhodnocení nutná analýza **Positive Control CoV-2 IND** a **Deionized Water** jako NTC kontroly.
 - Jako templát použijte RNA připravenou podle kroků uvedených výše.
 - RNA analyzujte co nejdříve po izolaci.
- 8) Analýzu vzorků v real-time PCR cykléru proveďte bezprostředně po přípravě reakcí.

Amplifikační protokol a sběr dat

- Na real-time PCR cykléru nastavte následující teplotní profil:

reverzní transkripce	42 °C	10 min	45 cyklů
počáteční denaturace	95 °C	3 min	
denaturace	95 °C	10 s	
annealing + elongace (+ snímání fluorescence)	60 °C	30 s	

- Celkový objem PCR reakce je **20 µl**, zohledněte tuto skutečnost při nastavení cykléru.
- Při použití přístroje Rotor-Gene je nutné nastavit **Gain** tak, aby základní fluorescence byla **v rozsahu 5–10 RFU**. **Pozor** – pokud je Gain nastavován před analýzou, teplota optimalizace Gain **nesmí přesáhnout 42 °C**.
- Snímání fluorescence musí být aktivní pro kanály FAM/SYBR, HEX/JOE/VIC, ROX a Cy5.
- Návod pro nastavení cykléru před spuštěním analýzy naleznete na adrese: <https://www.generi-biotech.com> v sekci „Ke stažení“ a řiďte se manuálem výrobce daného přístroje.



ANALÝZA VÝSLEDKŮ

Vyhodnocení přítomnosti viru SARS-CoV-2 v testovaném vzorku proveďte na základě analýzy Ct hodnot, které získáte pomocí softwaru vašeho real-time PCR cykléru. Limit detekce soupravy (LOD)* je 5,11 kopii/rxn pro gen RdRP, 25,46 kopii/rxn pro mutaci L452R a 22,4 kopii/rxn pro mutaci E484K.

*LOD byl stanoven probit analýzou na hladině spolehlivosti 95 %.

Signál v daném fluorescenčním kanálu odečtete jako hodnotu Ct (threshold cycle, prahový cyklus) v módu kvantifikace. **Hodnotu prahové fluorescence (threshold)** nastavte na úroveň přibližně 5 % fluorescence pozitivní kontroly v posledním cyklu amplifikace v kanálu ROX. Prahové fluorescence ostatních kanálů nastavte na stejnou hodnotu jako v kanálu ROX. **Ct hodnoty pro virové geny odečtete v kanálech FAM, HEX a ROX. Ct hodnoty pro exogenní pozitivní kontrolu v kanálu Cy5.** U silně pozitivních vzorků nemusí být exogenní kontrola amplifikována. Dodržujte instrukce od výrobce cykléru.

Nejprve ověřte validitu analýzy. Zobrazte signály reakcí kontrolních vzorků.

Upozornění: Primery a sondy byly navrženy tak, aby mutace E484K a L452R byly detekovány zejména ve variantách **Beta, Gamma, Delta, Kappa a Epsilon**. Výkonnost analýzy může být negativně ovlivněna přítomností dalších mutací v regionu genu S, zejména poblíž cílových mutací, a může dojít ke zvýšení limitu detekce případně kompletnímu potlačení detekce mutací E484K a L452R.

Validita analýzy

Analýza je považována za validní, pokud signály kontrol odpovídají následujícímu rozdělení:

- Positive Control CoV-2 IND – signály v kanálech HEX, ROX a Cy5
- Deionized Water jako negativní kontrola izolace – signál v kanálu Cy5
- Deionized Water jako NTC – žádný signál

Pokud je analýza potvrzena jako validní, pokračujte s hodnocením vzorků. V opačném případě postupujte dle doporučení uvedených v kapitole Řešení potíží.

Interpretace výsledků

Konečným výstupem analýzy dat je určení přítomnosti RNA viru SARS-CoV-2 (tj. pozitivita vzorku) a přítomnosti mutací E484K a L452R.

V prvním fázi analýzy dat nejprve stanovte přítomnost SARS-CoV-2 na základě hodnocení kanálů ROX a Cy5:

Výsledek VALIDNÍ	ROX	Cy5
Pozitivní	+	+/-
Negativní	-	+
Nízká pozitivita *	Ct ≥ 35	+

Výsledek NEVALIDNÍ	ROX	Cy5
Selhání izolace nebo inhibice RT-PCR, zopakujte analýzu	-	-

* Slabě pozitivní vzorek musí mít patrný signál exogenní kontroly v kanálu Cy5, jinak je výsledek nevalidní.

V druhé fázi stanovte u pozitivních vzorků přítomnost mutací na základě signálů v kanálech FAM, HEX a ROX. Signál v kanálu ROX slouží jako referenční signál. Přítomnost mutací je stanovena na základě signálů FAM a HEX. **Pozitivní signál v kanálu FAM nebo HEX představuje amplifikační křivka, která je posunutá maximálně o 7 cyklů doprava od křivky v kanálu ROX. Negativní signál buď amplifikační křivku neobsahuje vůbec, nebo je křivka od signálu ROX posunuta o více než 7 cyklů doprava.** Aby bylo možné stanovení na základě Ct hodnot, je zapotřebí nastavit prahové fluorescence (threshold) všech kanálů na stejné hodnoty.

	FAM	HEX	ROX
E484K pozitivní Beta (B.1.351) Gamma (P.1)	Ct _{FAM} < Ct _{ROX} +7	-	+
L452R pozitivní Delta (B.1.617.2) Kappa (B.1.617.1) Epsilon (B.1.427, B.1.429)	-	Ct _{HEX} < Ct _{ROX} +7	+
L452R a E484K negativní	-	-	+

Pro vyhodnocení výsledků lze použít také hodnotící tabulku. Tabulka je dostupná na internetových stránkách výrobce v sekci ke stažení.

Vyhodnocovací tabulka je určena pro program Microsoft Excel 2010 a novější.

ŘEŠENÍ POTÍŽÍ

Výsledky testování mohou být považovány za správné pouze v případě dodržení instrukcí uváděných v příloženém manuálu. V případě nesprávných výsledků kontrolních vzorků zkontrolujte:

- datum expirace soupravy
- podmínky skladování a manipulace
- nastavení pipet a cykléru

Zjištění:	Návrh řešení:
V reakci negativní kontroly (Deionized Water) je detekován signál v kanálu ROX, FAM nebo HEX.	Pravděpodobně došlo ke kontaminaci reakcí templátem. Zopakujte analýzu.
Standard Positive Control nebyl detekován nebo byl detekován pouze v jednom/ve dvou kanálech.	Pravděpodobně došlo k pipetovací chybě. Zopakujte analýzu.
V negativní kontrole izolace byl detekován signál v kanálu ROX, ale v negativní kontrole PCR (NTC) žádný signál detekován nebyl.	Pravděpodobně došlo ke vzájemné kontaminaci mezi vzorky. Připravte nové izoláty RNA.
U vyšetřovaného vzorku nebyl naměřen signál ani v jednom z kanálů, ačkoliv analýza je vyhodnocena jako validní.	Selhání analýzy bylo pravděpodobně způsobeno inhibicí PCR. Provedte analýzu s novým izolátem RNA.

SLOŽENÍ A POPIS KOMPONENT SOUPRAVY

Komponenta ¹⁾	Objem	Počet ²⁾	Koncentrace
● Assay CoV-2 E484K, L452R	0,5 ml ³⁾	1 5	4×
● Master Mix OneStep Multi	1,0 ml ³⁾	1 5	2×
● Positive Control CoV-2 IND	0,2 ml	1 1	4×
● EPC Template RNA	1,0 ml	1 5	
○ Deionized Water	1,0 ml	1 1	

¹⁾ Barva víčka na zkumavce odpovídá typu reagentie.

²⁾ Počet uveden pro balení po 100 a 500 reakcích.

³⁾ Objem odpovídá 100 PCR reakcím o objemu 20 µl.

Assay CoV-2 E484K, L452R

Assay CoV-2 E484K, L452R je směs amplifikačních primerů a fluorescenčně značených sond. Sondy umožňují detekci **virového genu RdRP v kanálu ROX** ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 575$, $\lambda_{\text{EMISE}} = 602$ nm) a **exogenní kontroly v kanálu Cy5** ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 650$ nm, $\lambda_{\text{EMISE}} = 670$ nm), **mutace E484K ve virovém genu S v kanálu FAM** ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 495$ nm, $\lambda_{\text{EMISE}} = 520$ nm) a **mutace L452R ve virovém genu S v kanálu HEX** ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 535$ nm, $\lambda_{\text{EMISE}} = 556$ nm). Assay je dodána ve zkumavce se zeleným víčkem. Smícháním s Master Mix OneStep Multi získáte kompletní assay určenou k okamžitému použití.

Master Mix OneStep Multi

Master Mix OneStep ve zkumavce s modrým víčkem je optimalizovaná směs pufry, reverzní transkriptázy, polymerázy a nukleotidů, která je nezbytná pro průběh RT-qPCR.

Positive Control CoV-2 IND

Positive Control CoV-2 IND slouží jako pozitivní kontrola (standard) k ověření validity analýzy. Kontrola je pozitivní pro kanál ROX (RdRP), Cy5 (EPC) a HEX (CoV-2 L452R). Je dodána ve zkumavce s červeným víčkem. Při manipulaci s pozitivní kontrolou pracujte tak, aby nedošlo ke kontaminaci jiných částí soupravy a analyzovaných vzorků.

EPC Template RNA

EPC Template RNA představuje exogenní pozitivní kontrolu pro ověření izolačního procesu. Je dodána ve zkumavce se žlutým víčkem.

Deionized Water

Deionizovaná voda slouží jako negativní kontrola do izolace a jako kontrola bez templátu (NTC – no-template control) v PCR. Je dodána ve zkumavce s transparentním víčkem.

Reagentie a vybavení, které nejsou součástí soupravy

- souprava či reagentie na izolaci virové RNA
- jednorázové plastové zkumavky, stripy nebo plata vhodná pro real-time PCR cyklér
- nastavitelné mikropipety s odpovídajícím rozsahem
- jednorázové pipetovací špičky s filtrem
- laboratorní vortex a centrifuga
- real-time PCR cyklér se softwarem

VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

Podmínky skladování a manipulace

- Po obdržení skladujte všechny komponenty soupravy při teplotě pod **-20 °C**.
- Assay je citlivá na světlo, omezte manipulaci na světle na nejkratší možnou dobu.
- Reagentie jsou určeny pro práci při laboratorní teplotě.
- Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazte a znovu zmrazte **maximálně 5×**. Kompletní assay vzniklou po smíchání Master Mix OneStep Multi a Assay CoV-2 E484K, L452R již nezmrazujte. Takto vzniklá směs je určena na **jedno použití**.
- Při dodržení uvedených podmínek je souprava stabilní až do data expirace, které je uvedeno na **štítku krabičky**.

Bezpečnostní opatření

- Souprava je určena pouze pro profesionální použití.
- Při práci s RT-qPCR reagentiemi a materiálem noste vždy laboratorní oděv a ochranné rukavice.
- V případě potřísnění pokožky nebo zasažení očí reagentiemi opláchněte postižené místo pod tekoucí vodou.







Instrukce pro použití

- Vždy používejte verzi manuálu, která je součástí soupravy. Číslo odpovídající verze je vyznačeno na štítku uvnitř krabičky.
- Nevhodné zacházení s reagentiemi či úpravy pracovního postupu mohou negativně ovlivnit výsledky, proto je třeba striktně dodržovat pipetované objemy, inkubační doby a teplotní podmínky dle uvedených instrukcí.
- Dodržujte expirační dobu soupravy uvedenou na štítku krabičky.
- Nekombinujte komponenty z různých šarží souprav.
- V případě, že je po doručení některá z komponent soupravy poškozená, nepoužívejte ji a neprodleně kontaktujte výrobce. Uschovejte pro případnou reklamaci.
- Používejte kalibrované pipety a přístroje.
- Likvidaci veškerého odpadu provádějte dle platných právních předpisů. Vnější obal je vyroben z papíru, vnitřní výsek z polyuretanu a zkumavky z polypropylénu. S reagentiemi lze zacházet jako s běžným odpadem. Konečný produkt PCR analýzy likvidujte způsobem zohledňujícím riziko kontaminace prostor.

Opatření k předcházení kontaminace

- Vyhraďte prostory, vybavení, materiál a ochranné pomůcky pro izolaci DNA/RNA z klinického materiálu a jiné pro přípravu RT-qPCR reakcí.
- Vyměňte si rukavice a laboratorní oděv, kdykoli máte podezření, že jsou kontaminovány.
- Nikdy neotvírejte amplifikovaný PCR produkt v místě přípravy PCR reakcí.
- Reagentie nechávejte otevřené jen po dobu nezbytnou k přípravě PCR reakcí.
- Při pipetování použijte špičky s filtrem.
- Při přípravě reakce je třeba věnovat pozornost tomu, aby standardy nekontaminovaly žádnou další součást soupravy nebo ostatní vzorky. Tomu se lze vyhnout uzavřením všech zkumavek před manipulací se standardy.
- Pro ředění vzorků používejte ultračistou vodu. Za tímto účelem je možno využít Deionized Water, která je součástí soupravy.

SYMBOLY POUŽITÉ NA NÁLEPKÁCH

	Číslo šarže
	Datum expirace
	Skladování při doporučené teplotě
	Obsahuje
	Výrobce
	Počet testů

PRODUKTOVÁ ŘADA

gb SARS-CoV-2 Multiplex	Kat. č. 3231
gb SARS-CoV-2 Multiplex EndoC	Kat. č. 3234
gb SARS-CoV-2 Variant SA/BR, UK	Kat. č. 3239

REFERENCE

Při použití soupravy se řiďte manuálem výrobce daného cykléru. Seznam cyklérů, na kterých byly testovány výkonnostní parametry soupravy, je dostupný na webových stránkách výrobce.

Pokud potřebujete doplňující informace, kontaktujte nás na e-mailové adrese info@generi-biotech.com nebo na telefonním čísle +420 495 056 314. Další informace získáte také na našich webových stránkách www.generi-biotech.com.



GENERI BIOTECH s.r.o.
Machkova 587/42
CZ-500 11, Hradec Králové 11 – Třebeš
CZECH REPUBLIC

www.generi-biotech.com

tel.: +420 495 056 314

e-mail: info@generi-biotech.com

Verze manuálu: 2.0

Datum poslední revize: 26. 7. 2021