

SARS-CoV-2 Analyse mit der ultraSBMS24

Das PCR-Reaktionskit „**RT PCR Application Set SARS-CoV-2**“ (Artikelnummer: T03048) kann entweder gemäß Packungsbeilage mittels Tropfer verwendet oder alternativ pipettiert werden. Hierzu folgen Sie bitte der nachfolgenden Anleitung zur Durchführung und Auswertung.

1. PCR Reagenzien und Mastermix Herstellung

- Planen Sie die PCR – eine Reaktionenpackung reicht jeweils für 48 Reaktionen.
- Lassen Sie die Reagenzien auftauen, bis diese flüssig vorliegen.
- Überführen Sie den gesamten RT-PCR-Puffer (grüner Deckel) in das Röhrchen mit der Enzymmischung (lilafarbener Deckel), mischen Sie mindestens 3- bis 5-mal auf und ab, und klopfen Sie die Flüssigkeit anschließend auf den Boden des Röhrchens.
- Der Mastermix ist nun fertig zur Verwendung und kann aus dem Röhrchen direkt pipettiert werden.
- *Sobald der Mastermix hergestellt ist, wird empfohlen, ihn innerhalb von 24 Stunden zu verbrauchen.*

2. Mastermix und Proben in PCR Tubes pipettieren:

- Der Mastermix wird in die PCR-Probengefäße vorgelegt. Geben Sie hierzu jeweils 25 µL in jedes PCR-Tube (je Probe plus Positiv- und Negativkontrolle). Bei Bedarf können Sie hierfür eine Multipette verwenden.
- Geben Sie 25 µL zu dem mit Mastermix gefüllten PCR Tube der Negativkontrolle hinzu (Negativkontrolle: blauer Deckel) und verschließen Sie das PCR Tube.
- Nun geben Sie je Probe 25 µL zu dem mit Mastermix gefüllten PCR Tube hinzu. Verschließen Sie jedes PCR Tube direkt nach dem pipettieren der Probe.
- Als letztes geben Sie 25 µL zu dem mit Mastermix gefüllten PCR Tube der Positivkontrolle hinzu (Positivkontrolle: roter Deckel). Verschließen Sie nun auch dieses PCR Tube.

Anmerkung zum Pipettieren:

Bei Zugabe der Kontrollen / Proben jeweils 3mal auf- und ab pipettieren um eine gute Durchmischung der Proben/Kontrollen mit dem Mastermix zu gewährleisten.

Bitte prüfen Sie vor Durchführung, ob die Protokolleinstellungen auf Ihrem Gerät passend zur Packungsbeilage des PCR-Reaktionskit „**RT PCR Application Set SARS-CoV-2**“ sind.

SARS-CoV-2 Analyse mit der ultraSBMS24

3. Grundsätzliche Validierung des PCR Laufes:

- *RNase P*/HEX:

Ist die Positivkontrolle (PC) = positiv
(*sigmoidaler Kurvenverlauf und Ct-Wert < 39.0?*)

Ist die Negativkontrolle (NC) = negativ
(*„Strich, keine Ct Werte bzw. nicht sigmoidaler Kurvenverlauf“?*)

Sind alle Proben mit menschlichem Gen = positiv
(*sigmoidaler Kurvenverlauf und Ct-Wert < 39.0?*)

Ist eine Probe ohne Signal im HEX-Kanal, so ist diese zu wiederholen.

Sollte auch beim wiederholten Lauf das Ergebnis gleich sein, ist ein neuer Abstrich zu nehmen.

- *ORF1ab* (FAM-Kanal) und *E Gene* (CY5-Kanal)

Ist die Positivkontrolle (PC) in beiden Kanälen = positiv
(*sigmoidaler Kurvenverlauf und Ct-Wert < 39.0?*)

Ist die Negativkontrollen (NC) in beiden Kanälen = negativ
(*„Strich, keine Ct Werte bzw. nicht sigmoidaler Kurvenverlauf“?*)

4. Welche Proben sind SARS-CoV-2 positiv?

- Gibt es Proben mit einem positivem Signal in beiden Kanälen (FAM und CY5)?

Nein: keine Proben positiv; alle negativ

Ja: Sind alle davon mit **sigmoidalem Kurvenverlauf und Ct-Wert ≤ 39.0 in FAM und CY5**, dann sind diese als positiv zu werten. Der Ct-Wert kann direkt je Kanal entnommen werden. Somit gibt es einen Ct Wert für FAM und einen Ct Wert für CY5.

Sind Proben dabei, die nur in einem der beiden Kanäle (**FAM oder CY5**) einen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigen?

→ diese Probe(n) muss/müssen wiederholt werden.

Sollte auch beim wiederholten Lauf das Ergebnis gleich sein, ist ein neuer Abstrich zu nehmen.