

COVID-19/Flu RT-qPCR

Kullanma Kılavuzu

Kat. No: BS-SY-SI-100
BS-SY-SI-500
BS-SY-SI-1000

Kılavuz Versiyon.: 201110-1
Kullanım Onay Tarihi: 10.11.2020

Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.
Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.

Tablo 1. Kit içeriği [Raf ömrü 18 ay: Depolama sıcaklığında saklanan her bir reaktif, **tüp üzerinde belirtilen** son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Kit kutusu üzerinde belirtilen son kullanma tarihi, reaktiflerin son kullanma tarihine göre belirlenmektedir.]

Saklama koşulu -20°C; Transfer koşulu +2-8°C					
İçerik/Kullanım Amacı	Bileşen İsmi	Miktar (20 µl Reaksiyon)			Birim Reaksiyon Tüketim
		100	500	1000	
Influenza A (FAM)	CVD19/FLU Oligo Mix	1 x 500 µL	2 x 1250 µL	4 x 1250 µL	5 µL
Internal Kontrol (IC) (RNase P Geni) (HEX)					
SARS-CoV-2 N (Nükleokapsid) Geni (ROX)					
Influenza B (Cy5)	2X Prime Script Mix	1x 1000 µL	4 x 1250 µL	8 x 1250 µL	10 µL
DNA polimeraz, dNTP miks, Ters transkriptaz enzim, Ribonükleaz inhibitör ve reaksiyon tamponu karışımı					
Saklama koşulu +2-8°C/-20°C; Transfer koşulu +2-8°C/-20°C Bileşenler donuk ise, ilk defa çözüldükten sonra bir daha dondurulmadan 2-8°C' de saklanmalıdır.					
Negatif Kontrol Template Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.	NTC	1 x 200 µL	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: Sentetik SARS-CoV-2, Influenza A/B, insan RNase P genom bölgesi Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz	PC-CVD19/FLU	1 x 200 µL	1 x 500 µL	2 x 500 µL	5 µL
Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Olan Cihaz ve Ekipmanlar					
1) Real-Time PCR Cihazı: FAM/HEX/ROX/Cy5 (Green/Yellow/Orange/Red) kanallı, Ramp rate ≥3 °C/sec. 2) 1-10 µL, 10-100 µL ve 100-1000 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve RNaz içermeyen) 3) Spin Santrifüj: min. 3000 rpm 4) Vorteks 5) Nükleaz-içermeyen su / Viral Taşıma Besiyeri / Serum fizyolojik		6) 1.5 veya 2 mL mikrosantrifüj tüpü 7) PCR cihazına uyumlu reaksiyon tüpleri, kapakları, plate ve plate filmi Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar: 8) PCR kurulumu için UV kabini 9) Soğuk Tüp standı (Mikrosantrifüj ve PCR tüpleri için) 10) Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven			

Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipleri:

Kit; Influenza A, Influenza B ve Coronavirus 2019 (COVID-19) hastalığına yol açan pandemik SARS-CoV-2 (2019-nCoV), virüsünün tespiti amacıyla kullanılmaktadır. Kit; nazofaringeal aspirat/lavaj, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü ve balgam örneklerinden vNAT ekstraksiyon tamponu veya robotik ekstraksiyon sistemleri ile elde edilen nükleik asit ekstraktlarına uygulanmaktadır. Kit ile hızlı tanı SARS-CoV-2 spesifik N ve Orf1ab geni, Influenza A spesifik Membran Protein (M) geni, Influenza B spesifik Nükleer export protein (NEP) gen bölgesini hedefleyen tek adımda ters transkripsiyon (RT) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) (RT-qPCR) ile gerçekleştirilmektedir. Kit örneklem, nükleik asit ekstraksiyonu ve inhibisyon kontrolü için insan

RNaseP genini hedeflemektedir. Kit ile **numuneden sonuca 50 dakikadan kısa bir sürede** ulaşılabilmektedir.

Kitin Analitik Özellikleri:

Kit; RINA™ M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Sistemi (Robot Kat No: RINA-M14-01; Sarf malzemeleri Kat No: RN-NA-14-111-100) ve vNAT Ekstraksiyon Sarfları (vNAT Viral Nükleik Asit Tamponu Kat No: BS-NA-510; vNAT Transfer Tüp Kat No: BS-NA-513-100) ile validedir. Kit Roche LightCycler® 96, Bio-Rad CFX96 Touch™, Bio Molecular Systems Magnetic Induction Cyclers (MIC), Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex Real-Time PCR sistemlerinde 20 µL ve 50 µL qPCR reaksiyon hacimleri için valide edilmiştir. Kitin analitik ve klinik performansı T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı (HSGM) tarafından belirlenmiştir. Kitin LOD değerleri Influenza A, Influenza B ve SARS CoV-2 hedefleri için 6.6, 8.8 ve 5.6 genom/reaksiyondur. Kitin dışlayıcılık testleri 40 farklı viral ve bakteriyel suş kullanılarak ve 20 farklı kişiden elde edilen nazal yıkama sıvılarıyla hazırlanan havuz örneği kullanılarak hem laboratuvarında hem de in-siliko olarak test edilmiştir. Kit diğer solunum yolu patojenleri ve insan solunum yolu mikrobiyal florası ile çapraz vermemektedir. In-siliko testler kitin bazı yarasa ilişkili SARS-CoV suşlarıyla çapraz reaksiyon verdiğini göstermiştir.

Kitin duyarlılık ve özgüllük testleri Influenza A-B ve SARS-CoV-2'yi hedefleyen FDA onaylı multipleks RT-qPCR test kiti ile eş zamanlı olarak 100 pozitif klinik örnek (Arşiv klinik örnekler: 27 SARS-CoV-2, 32 Influenza A, 21 Influenza B; Kirlenmiş klinik örnekler: 10 SARS-CoV-2+Influenza A, 10 SARS-CoV-2+Influenza B) ve 50 negatif klinik örnek üzerinde test edilmiştir. Kitin rölatif duyarlılık ve özgüllüğünün her ikisi de %100 olarak belirlenmiştir.

Kitin, yalnızca SARS-CoV-2'yi hedefleyen FDA onaylı RT-qPCR test kitine göre duyarlılığı ve özgüllüğü arşivlenmiş 357 pozitif ve 94 negatif klinik örnek üzerinde test edilmiştir. Kitin rölatif duyarlılık ve özgüllüğü %97.3 ve %100 olarak belirlenmiştir.

Kitin duyarlılık ve özgüllüğü Influenza A ve Influenza B' yi hedefleyen FDA onaylı RT-qPCR test kiti ile eş zamanlı olarak; 251 Influenza A pozitif, 118 Influenza B pozitif ve 637 negatif klinik arşiv örneği ile test edilmiştir. Kitin rölatif duyarlılık ve özgüllüğü Influenza A ve B için sırasıyla %96.8-%98.9 ve %95.7-%99.3 olarak belirlenmiştir.

Klinik Örneklerin Paketlenmesi ve Taşınması:

Sürüntü örnekleri dacron veya polyester swablar kullanılarak toplanmalıdır. Diğer örnek türleri ise steril kaplar ile transfer edilmelidir. Taşıma aşamasında viral taşıma besiyeri (VTM) (Preparation of viral transport medium, Centers for Disease Control and Prevention, SOP#: DSR-052-01) veya Bio-Speedy® vNAT Viral Transfer Tüpü (Kat No:BS-NA-513-100) kullanılmalıdır. Örnekler laboratuvara gelene kadar +2-8 °C saklanmalı ve taşınmalıdır. Sürüntü örnekleri 5 gün içerisinde, diğer örnek türleri ise 2 gün içerisinde transfer edilmelidir. Gönderide bir gecikme bekleniyorsa, VTM ile gelen örnekler -70 °C'de dondurulmalı ve kuru buz ile gönderimi yapılmalıdır. vNAT ile gelen örnekler +2-8 °C saklanmalıdır. Örneklerin sürekli don-çöze maruz kalmaması önemlidir.

Uyarılar:

1. Kit; nükleik asit kaynaklarından ve qPCR amplikonlarından uzak bir yerde muhafaza edilmelidir.
2. Kit içeriğindeki bileşenler farklı lot numaralı bileşenler ile ya da aynı isimli fakat farklı üreticilere ait kimyasal maddeler ile karıştırılmamalıdır.
3. Ana stok reaktifler PCR kurulumu sırasında, mümkünse soğuk blok üzerinde bekletilmelidir ve PCR kurulumu mümkünse soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmelidir.
4. Kit bileşenleri kullanım öncesinde hafifçe çalkalanarak karıştırılmalıdır.
5. qPCR mikserleri ve kalıp nükleik asitleri pipetlemek için kullanılan mikropipetler ayrı olmalıdır.
6. Kalıp nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri, sıvı transferleri dışında sürekli kapalı tutulmalıdır.
7. Analizin gerçekleştirildiği odalar, tezgahlar ve cihazların silinebilir yüzeyleri düzenli olarak %10'luk NaClO ile temizlenmelidir.
8. qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüpleri laboratuvarında açılmadan bertaraf edilmelidir.

RT-qPCR Uygulama Protokolü:

Analize başlamadan önce, aşağıdakileri bilgileri göz önünde bulundurunuz;

- Kit, sadece toplam qPCR hacminin %25'i kadar olan template nükleik asit hacmi için valide edilmiştir.
- Kit, periyodik bakım kayıtları olmayan gerçek zamanlı PCR cihazlarıyla kullanılmamalıdır.
- Bio-Rad CFX96 Touch™ cihazında analiz için hem beyaz hem de şeffaf renkli 0.1 mL'lik qPCR strip/plateleri kullanılabilir. Beyaz renkli strip/plate kullanılarak daha iyi bir performans elde edilebilmektedir.
- Roche LightCycler® 96 cihazında analiz için sadece beyaz 0.1 mL'lik qPCR strip/plateleri kullanılabilir.
- Qiagen Rotor-Gene® cihazında test için 0.1 mL ve 0.2 mL'lik şeffaf qPCR tüpleri kullanılabilir. 0.1 mL'lik şeffaf tüplerin kullanılarak daha iyi bir performans elde edilebilir.

- BMS MIC qPCR™ cihazında, cihaza özgü reaksiyon stripleri kullanılmaktadır.

qPCR cihazını aşağıda belirtilen şekilde programlayınız ve reaktifleri qPCR tüplerine aşağıda belirtildiği sırasıyla ekleyiniz, tüpleri kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve işletimi başlatınız (Tablo 2).

Tablo 2. Reaksiyon kurulumu ve qPCR programı

Reaksiyon Kurulumu			qPCR Programı		
Bileşen	Reaksiyon		Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2X Prime Script Mix	10 µL	25 µL	1	52 °C	5 dk
CVD19/FLU Oligo Mix	5 µL	12.5 µL	1	95 °C	10 sn
Kalıp Nükleik Asit	5 µL	12.5 µL	40	95 °C	1 sn
Toplam Reaksiyon Hacmi	20 µL	50 µL		55 °C	1 sn
			FAM/HEX/ROX/CY5 Okuma Green/Yellow/Orange/Red Okuma		

Test Sonuçlarının Yorumlanması:

Threshold seviyesi Bio-Rad CFX96 Touch™ için 200 RFU, Roche LightCycler® 96 için 0.05 EPF'ye ayarlanmalıdır. QIAGEN Rotor-Gene® cihazlarında çoğalma eğrilerinin sigmoidal olup olmadığı "Raw Data" ekranından değerlendirilmelidir. Rotor-Gene® cihazlarında sigmoidal eğrilerin Ct değerlerini görmek için; analiz ekranında "Dynamic Tube" aktif, "Slope Correct" seçenekleri pasif olmalı, "Outlier Removal" seçeneği "0" olmalı, threshold seviyesi 0.02'ye ayarlanmalıdır. BMS MIC qPCR için "Non-Assay Green / Parameters / Fixed Length" seçenekleri seçilmeli, auto-treshold ayarı aktif olmalıdır. FAM / HEX / ROX / Cy5 (Green / Yellow / Orange / Red) kanallarında elde edilen çoğalma eğrilerinin şekli incelenmelidir. **Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak kaydedilmelidir. Bir örneğe cihaz tarafından Cq değeri atanmış ama eğri sigmoidal değilse, sonuç negatif olarak kaydedilmelidir.** Cq<38 ise Pozitif olarak sonuçlar kaydedilmeli ve analiz sonucu Tablo 3'e göre yorumlanmalıdır. **Negatif kontrolde sigmoidal eğri yok ve örnek Cq≥38 ise -20°C'ye kaldırılan nükleik asit ekstraktı tekrar analiz edilmeli, ikinci analizde de Cq≥38 ise bu kişiden tekrar örnek istenmeli ve analiz tekrarlanmalıdır.**

Tablo 3. Sonuçların Yorumlanması

Template:	NA İzolatı		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		Yorum
Hedef:	Hedef	IC	Hedef	IC	Hedef	IC	
Durum 1	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Pozitif
Durum 2	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg	Hedef Pozitif: Örnek pozitif sonuç verdiği için kitin çalıştığı sonucuna varılır, hasta sonucu rapor edilir. Pozitif kontrolde sorunun devam etmesi durumunda, üretici ile irtibata geçip, yeni bir pozitif kontrol talep edilir.
Durum 3	Poz	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Pozitif
Durum 4	Neg	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Negatif
Durum 5	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Kontaminasyon Problemi: Uyarılar bölümündeki hususlara dikkat edilerek deney tekrarlanır.
Durum 6	Neg	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Hedef Negatif: Hedef negatif çıktığı için kontaminasyon problemi yoktur. Kit içeriğiyle birlikte sağlanan ve negatif kontrol örneğine eklenen NTC kontamine olmuş olabilir. Sorunun devam etmesi durumunda, üretici ile irtibata geçip, yeni bir negatif kontrol talep edilir.
Durum 7	Neg	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	Örnekleme/Ekstraksiyon/İnhibisyon Problemi: Nükleik asit izolatu 1/10 seyreltilip, deney tekrarlanır. Seyreltilen örnek HEX kanalında pozitif sonuç vermezse yeni örnek istenir.

Durum 8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Reaktif Problemi: Üretici ile irtibata geçilerek, reaktifler yenilenir ve reaksiyon tekrarlanır.
Durum 9	Neg	Poz	Poz	Poz	Neg	Poz	Eğer negatif kontrol reaksiyonundaki IC Cq değeri, NA izolatından elde edilen IC Cq değerinden 3 döngü veya daha yüksekse, sonuç değerlendirilir, negatif olarak rapor edilir. Aksi takdirde, örneklem/ekstraksiyon/inhibisyon problemi sonucuna varılır.
Durum 10	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Poz	Hedef Pozitif: Negatif kontrolde hedef negatif, NA izolatında hedef pozitif olduğu için, IC'deki kontaminasyon göz önüne alınmadan, örnek pozitif olarak rapor edilir.

Sınırlamalar

- *Bio-Speedy® COVID-19/Flu RT-qPCR Kiti'nin* performansı sadece nazofaringeal sürüntü, orofaringeal (boğaz) sürüntü, nazofaringeal aspirat veya lavaj, bronkoalveoler lavaj ve balgam örnekleri için belirlenmiştir.
- *Bio-Speedy® COVID-19/Flu RT-qPCR Kiti'nin* hedeflediği bölge içindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyerek virüs varlığının saptanamamasına neden olabilir.
- Numune toplanması, taşınması veya işlenmesi sırasında yapılan hatalar, yanlış negatif sonuçlara yol açabilir.
- İnhibitörler veya diğer enterferans etkenler yanlış negatif sonuç alınmasına neden olabilir. Numunede yetersiz sayıda hedef organizma bulunduğu durumlarda da yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir.
- SARS-CoV-2 RNA'sının saptanması hasta faktörlerinden (örn. semptomların varlığı) ve/veya enfeksiyon evresinden etkilenebilir.
- In-silico testler, kitin SARS-CoV-2 dışındaki bazı SARS-CoV suşlarıyla çapraz reaksiyon verebileceğini göstermiştir.



UYARI: QR kod ile bağlantısı verilen web sayfasında, farklı cihaz tipleri için, sigmoidal ve sigmoidal olmayan eğri örnekleri verilmiştir. Bu örnekler incelenmeden, bu kit ile elde edilen sonuçlar **KESİNLİKLE** yorumlanmamalıdır.