

Kat no: BS-SY-WCOR-304-100

SARS-CoV-2 (2019-nCoV) RT-qPCR Tespit Kiti

Kullanım Kılavuzu



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
HALK SAĞLIĞI
GENEL MÜDÜRLÜĞÜ



1. Kit İçeriği

Raf Ömrü 18 ay: kutudaki son kullanma tarihine bakınız. Saklama sıcaklığında saklanan her reaktif, tüp üzerinde belirtilen son kullanım tarihine kadar kullanılabilir. Kitin son kullanma tarihi, reaktiflerin son kullanma tarihine göre belirlenmektedir.

Tablo 1a. Kit içeriği

Saklama Sıcaklığı: -20°C; Taşıma Sıcaklığı: +2-8°C			
Kullanım Amacı	İçerik	Miktar (20 µL Reaksiyon)	Birim Reaksiyon Tüketimi
		100 Reaksiyon	
SARS-CoV-2 Tespiti (RdRp geni) (FAM)	Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL
Dahili Kontrol (IC) (RNase P geni) (HEX)			
DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu, Ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitör	2X Prime Script Mix	1 x 1000 µL	10 µL

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

Saklama sıcaklığı +2-8°C/-20°C; Transfer koşulları +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 1000 µL	5 µL
Pozitif Kontrol Template: Sentetik SARS-CoV-2 ve RnaseP genom fragmanı Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.	PC	1 x 250 µL	5 µL

Tablo 1c. Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar

Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar	
1. Real-Time PCR Cihazı: FAM/HEX kanallı, Ramp rate $\geq 3^{\circ}\text{C}/\text{sn}$.	6. 1.5 veya 2 mL mikrosantrifüj tüpü
2. 1-10 µL, 10-100 µL ve 100-1000 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve RNaz içermeyen)	7. qPCR cihazı ve reaksiyon hacmi ile uyumlu reaksiyon tüpleri ve kapakları/filmleri
3. Spin Santrifüj: min. 3000 rpm	Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:
4. Vorteks	8. PCR kurulumu için UV kabini
5. Nükleaz içermeyen su/Viral Taşıma Besiyeri/Serum fizyolojik	9. Soğuk Tüp standı (Mikrosantrifüj ve PCR tüpleri için)
	10. Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

2. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipli

Kit, 2019 Koronavirüs Hastalığına (COVID-19) neden olan salgın virüs SARS-CoV-2'yi tespit etmek için kullanılır. **Kit, 50 dakikadan daha kısa sürede RT-qPCR sonucuna ulaşılmasını sağlar.** Kit, nazofaringeal aspirat/lavaj, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal swab, orofaringeal swab ve balgam örneklerinden vNAT® ekstraksiyon tamponu veya robotik ekstraksiyon sistemleri ile elde edilen nükleik asit ekstraktlarına uygulanır. Kitle hızlı tanı, SARS-CoV-2'ye özgü RdRp (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz) gen fragmanını hedefleyen tek adımlı ters transkripsiyon (RT) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) (RT-qPCR) yoluyla elde edilir. İnsan RNaz P genini hedefleyen oligonükleotid seti, örnekleme, nükleik asit ekstraksiyonu ve inhibisyonun bir kontrolü olarak işlev görür.

COVID-19 virüs dolaşımı olmayan bir alanda, COVID-19 virüs genomundaki en az iki farklı hedef (bunlardan en az biri tercihen COVID-19 virüsüne özgü) için pozitif bir RT-qPCR sonucu önerilmektedir. **COVID-19 virüsünün yaygın olarak yayıldığı bölgelerde**, RdRp geni gibi tek bir ayırt edici hedefin RT-qPCR'si yeterli kabul edilmektedir (Laboratory testing for 2019 novel coronavirus 2019-nCoV in suspected human cases, World Health Organization, published on March 2, 2020).

3. Analitik Özellikler

Kit, RINA™ M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Robotu (Kat No: RINA-M14-01) ve sarf malzemeleri (Kat No: RN-NA-14-111 100) (tüm örnek türleri için LOD 20 genom/mL'dir) ve nazofaringeal aspirat / lavaj (LOD = 200 genom/mL), bronkoalveolar lavaj (LOD = 281 genom/mL), nazofaringeal sürüntü (LOD = 89-200 genom/mL), orofaringeal sürüntü (LOD = 562 genom/mL) ve balgam (LOD = 200 genom / mL) örnekleri için *manuel ekstraksiyon kiti BS-NA-109 ve BS-NA-511 (BS-NA 510 içerir)* ile validedir. Kit, 10 ve 20 µL qPCR hacimleri için Roche LightCycler® 96, Bio-Rad CFX96 Touch™, Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex Gerçek Zamanlı PCR cihazları ile validedir. Kitin analitik ve klinik performansı, "TC Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler (HSGM) Daire Başkanlığı" tarafından belirlenmiştir. Dahil edicilik testleri, DNA dizi analizi ile SARS-CoV-2 pozitifliği doğrulanmış 38 farklı klinik örnek kullanılarak deneysel yöntem ile ve 42 farklı coğrafi bölgede tespit edilmiş SARS-CoV-2 tüm genom dizileri kullanılarak in siliko yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Dışlayıcılık testleri 44 farklı viral/bakteriyel/fungal solunum yolu patojenleri ve 20 farklı kişiden alınmış nazal yıkama havuz örneği ile test edilmiştir. Deneysel çalışmalar, kitin diğer solunum patojenleri veya insan solunum yolundaki mikrobiyal flora ile çapraz reaksiyona girmediğini göstermiştir. In-siliko testleri, kitin SARS-CoV-2 dışındaki bazı SARS-CoV suşları ile çapraz reaksiyona girebileceğini göstermiştir.

Kitin tekrarlanabilirliği %100'dür. Robotik ekstraksiyon ile birleştirilen tekrarlanabilirlik, LOD üzerindeki konsantrasyonlarda %100 ve LOD'nin altındaki konsantrasyonlarda %83'tür. Manuel ekstraksiyon ile birleştirilen tekrar üretilebilirlik, LOD üzerindeki konsantrasyonlarda %100 ve LOD'nin altındaki konsantrasyonlarda %67-83'tür. >%10 (w/v) konsantrasyonundaki müsin, kan ve burun spreylere, >%1 (v/v) konsantrasyonundaki nazal kortikosteroidler ve jeller, >%0.1 (w/v) konsantrasyonundaki boğaz pastilleri ve anti-viraller ve de >%0.01 (w/v) konsantrasyonundaki antibiyotikler kit ile girişim (enterferans) gösterebilir. Kit, DirectDetect™ SARS-COV-2 Detection Kit (Coyote Bioscience Co., Ltd) ve Cobas® SARS-CoV-2 Qualitative Assay (Roche Molecular Systems, Inc.) ile eş zamanlı olarak 500 klinik numuneye uygulanmıştır. Testler arasındaki uyumsuzluk durumlarında DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Testlerin tümü 383 gerçek pozitif ve 117 gerçek negatif ile sonuçlanmıştır. Bio-Speedy®, DirectDetect™ ve Cobas® kitlerinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 98,7 -% 100, % 95,1 -% 95,7, % 100 -% 96,6'dır.

4. Klinik Örneklerin Toplanması, Saklanması ve Paketlenmesi

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 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.

5. Uyarılar

1. Kit, nükleik asit kaynaklarından ve qPCR amplikonlarından uzakta saklanmalıdır.
2. Kit bileşenlerini farklı lot numaralarıyla veya aynı adı taşıyan ancak farklı üreticilere ait kimyasallarla karıştırmayınız.
3. Ana stok reaktifleri PCR kurulumu sırasında soğuk blokta tutulmalıdır; Mümkünse, PCR kurulumu soğuk blokta gerçekleştirilmelidir.
4. Kit bileşenleri kullanılmadan önce hafifçe çalkalanarak karıştırılmalıdır.
5. qPCR karışımlarını ve şablon nükleik asitleri pipetlemek için kullanılan mikropipetler ayrı olmalıdır.
6. Template nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri, sıvı transferleri dışında her zaman kapalı tutulmalıdır.
7. Analizin yapıldığı oda, tezgah ve cihazların silinebilir yüzeyleri düzenli olarak % 10 NaClO ile temizlenmelidir.
8. qPCR ile tamamlanmış reaksiyon tüpleri laboratuvarda açılmadan önce atılmalıdır.
9. Kitle birlikte kullanılan tüm alet ve ekipmanlar için bakım / kalibrasyon aralığı belirlenmelidir.
10. Örnekleme, yeterli bilgi ve deneyime sahip personel tarafından yapılmalıdır.
11. Örnekleme sırasında kontaminasyonu önlemek için kırılabilir uçlu swabların kullanılması önerilir.
12. Pamuklu çubuklar inhibisyona neden olabilir ve numune almak için kullanılmamalıdır.
13. Kuru sürüntü numuneleri, numune alımından sonra maksimum 1 saat içinde analiz edilmelidir; aksi takdirde bu numuneler laboratuvar tarafından kabul edilmemelidir.

- Gerçek Zamanlı PCR analizinin etkinliği ve sonuçların güvenilirliği için nükleik asit konsantrasyonunun 50-200 ng / µL aralığında olması önerilir. Nükleik asit izolatinin konsantrasyonu çok yüksekse, moleküler kalitede suyla 10 veya 100 kat seyreltilmesi önerilir.
- Kitin, gerçek zamanlı PCR tekniklerinde eğitimli personel tarafından laboratuvar ortamında kullanılması önerilir.

6. RT-qPCR Uygulama Protokolü

Analize başlamadan önce aşağıdaki bilgileri göz önünde bulundurunuz.

- Kit, sadece toplam qPCR hacminin %25'i kadar olan kalıp nükleik asit hacmi için valide edilmiştir.
- Kit, periyodik bakım kayıtları olmayan real time PCR cihazlarıyla kullanılmamalıdır.
- qPCR cihazının üreticisi tarafından tavsiye edilmeyen qPCR plakalarını/striplerini kullanmayınız.
- Kontaminasyonu test etmek için, 1) template ekmeden reaktif kontrolü (NRC) ve 2) NTC ilavesiyle ortam kontrolü amacıyla iki farklı reaksiyon kurunuz.**

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

Table 2. Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları

Reaksiyon Kurulumu			qPCR Programı		
İçerik	Reaksiyon		Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2X Prime Script Mix	5 µL	10 µL	1	52°C	5 dk
Oligo Mix	2.5 µL	5 µL	1	95°C	10 sn
			40	95°C	1 sn
55°C	1 sn				
FAM/HEX Okuma*					
Template Nükleik Asit	2.5 µL	5 µL			
TOTAL REACTION VOLUME	10 µL	20 µL			

* Okuma için farklı cihazlardaki alternatif boylar: FAM: GREEN, HEX: YELLOW/VIC, ROX: ORANGE/TEXAS RED, CYS: RED

7. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold döngü sayısını (Cq) hesaplamak için önerilen threshold seviyesi *Insta Q96® Plus* ve *CFX96 Touch™* cihazları için 200 RFU'dur. Threshold seviyesi *Roche LightCycler® 96* için 0,05'tir. *Rotor-Gene® Q'da* Cq hesaplamak için; "Dynamic Tube" etkin olmalı, "Slope Correct" pasif, "Outlier Removal" seçeneği "0" olmalı ve eşik seviyesi 0,02 olarak ayarlanmalıdır. *BMS MIC* qPCR için, "Non-Assay Green/Parameters/Dynamic" seçenekleri seçilmeli, auto-threshold ayarı etkin olmalıdır.

Amplifikasyon eğrilerinin şekli incelenmelidir. Cihazın yazılımı tarafından bir numuneye bir Cq değeri atanmışsa ve eğri sigmoidal ise, Cq değeri son değerlendirmede kullanılabilir. **Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak kaydedilmelidir.** Bir numuneye bir Cq değeri atanmışsa, ancak eğri sigmoidal değilse, **sonuç negatif olarak kaydedilmelidir.**



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.

Tablo 3. Kit kontrollerinin beklenen performansı

Kontrol Türü	İsmi	Kontrol Amacı	Beklenen Sonuç	
NTC eklenmesi	NTC	Kontaminasyon kontrol	Cq Yok = Geçerli	
Template ekleme yok	NRC	Reaktif kontaminasyon kontrol	Cq Yok = Geçerli	
PC eklenmesi	PC	Pozitif reaktif kontrol	Cq<38.0 = Geçerli	
RNase-P	IC	Örnekleme, RNA bütünlüğü, nükleik asit ekstraksiyonu, ve ters transkripsiyon ve qPCR inhibisyonu kontrolü	Cq≤34.0 (Geçerli)	IC Cq≥34.0 ise fakat SARS CoV-2 Cq≤34.0 ise, IC geçerli

Herhangi bir kontrol yukarıda açıklandığı gibi çalışmazsa, çalışma geçersiz sayılır ve test tekrarlanır.

1. Geçersiz PC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
2. Geçersiz NRC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
3. Geçersiz NTC: “**Uyarılar**” bölümüne dikkat ederek analizi tekrarlayınız.
4. Geçersiz IC: Tablo 2'deki reaksiyon bileşenlerinin oranlarını koruyarak reaksiyon hacmini 50 µL'ye yükseltip, analizi tekrarlayınız. Sorun devam ederse, PCR template'i geçersiz olarak kabul ediniz.

Tüm kontroller geçerliyse, sonuçların yorumlanmasına geçiniz.

- SARS-CoV-2 RdRp geni hedefi (FAM) ≤ 38 ise, **SARS-CoV-2 pozitif** olarak sonuçlandırınız.
- SARS-CoV-2 RdRp geni hedefi (FAM) ≥ 38 ise, **SARS-CoV-2 negatif** olarak sonuçlandırınız.

FAM kanalında, eşik seviyesinin altında şüpheli bir sigmoidal eğri gözlemleniyorsa, IC'nin Cq değeri incelenmelidir. IC Cq ≤ 34 ise, numune negatif olarak rapor edilir. Cq ≥ 34 ise, numune dondurulup çözüldükten sonra test tekrarlanmalıdır. Dondur-çözden sonra problem devam ederse yeni bir numune istenmelidir.

8. Sınırlamalar

- *Bio-Speedy® SARS-CoV-2 (2019-nCoV) RT-qPCR Tespit Kiti'nin* performansı sadece nazofaringeal sürüntü, orofaringeal (boğaz) sürüntü, nazofaringeal aspirat veya lavaj, bronkoalveoler lavaj ve balgam örnekleri için belirlenmiştir.
- *Bio-Speedy® SARS-CoV-2 (2019-nCoV) RT-qPCR Tespit 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 (örneğin, semptomların varlığı vb.) ve/veya enfeksiyon evresinden etkilenebilir.
- In-siliko testlere göre, kit SARS-CoV-2 dışındaki bazı SARS-CoV suşlarıyla çapraz reaksiyon verebilmektedir. Diğer SARS benzeri koronavirüslerin şu anda insan popülasyonunda dolaştığı bilinmediğinden, hasta örneklerinde bulunması pek olası değildir.

9. Üretici ve Teknik Destek



Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Limitet Şirketi

Adres: İTÜ ARI Teknokent 3, 4/B-105, 34467. Sarıyer, İstanbul, TÜRKİYE

Tel: +90 (212) 285 10 17

Faks: +90 (212) 285 10 18

Web: www.bioeksen.com.tr

e-mail: info@bioeksen.com.tr, support@bioeksen.com.tr