

Kat no: BS-SY-SI-100/BS-SY-SI-250/BS-SY-SI-500/BS-SY-SI-1000

# COVID-19/Flu RT-qPCR

## Kullanım Kılavuzu



### 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 Tüketim
		100	250	500	1000	
Influenza A (FAM)	CVD19/FLU Oligo Mix	1 x 500 µL	1 x 1250 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)						
DNA polimeraz, dNTP miqs, reaksiyon tamponu, ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitör	2X Prime Script Mix	1 x 1000 µL	2 x 1250 µL	4 x 1250 µL	8 x 1250 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 <b>Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	NTC	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	5 µL
Pozitif Kontrol Template: Sentetik SARS-CoV-2, InfluenzaA/B, insan RnaseP genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-CVD19/FLU	1 x 250 µL	1 x 250 µL	1 x 500 µL	2 x 500 µL	5 µL

Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar	
1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate $\geq 3$ °C/sn. 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. qPCR cihazı ve reaksiyon hacmi ile uyumlu reaksiyon tüpleri ve kapakları/filmleri <b>Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:</b> 8. PCR kurulumu için UV kabini 9. Soğuk Tüp standı (Mikrosantrifüj ve PCR tüpleri için) 10. Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

### 2. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipli

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.

### 3. 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 Tüpü 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 laboratuvarda 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; Kirletilmiş 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.

### 4. 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.

### 5. Uyarılar

1. Kiti nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampliconlarından uzakta saklayınız.
2. Kit bileşenlerini farklı lot numaralarıyla veya aynı adı taşıyan ancak farklı üreticilere ait kimyasallarla karıştırmayınız.
3. Ana stok reaktiflerini PCR kurulumu sırasında soğuk blokta tutunuz.
4. Mümkünse, PCR'yi soğuk blokta kurunuz.
5. Kullanmadan önce kit bileşenlerini yavaşça karıştırınız.
6. qPCR karışımlarını ve template nükleik asitleri pipetlemek için ayrı mikropipetler kullanınız.
7. Sıvı transferleri dışında template nükleik asit ve pozitif kontrol tüplerini her zaman kapalı tutunuz.
8. Testin yapıldığı oda, tezgah ve cihazların silinebilir yüzeylerini %10 NaClO ile düzenli olarak temizleyiniz.
9. qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüplerini laboratuvarda açmadan uzaklaştırınız.

### 6. RT-qPCR Uygulama Protokolü

Analize başlamadan önce aşağıdaki bilgileri göz önünde bulundurunuz.

1. Kit, sadece toplam qPCR hacminin %25'i kadar olan kalıp nükleik asit hacmi için valide edilmiştir.
2. Kit, periyodik bakım kayıtları olmayan real time PCR cihazlarıyla kullanılmamalıdır.
3. qPCR cihazının üreticisi tarafından tavsiye edilmeyen qPCR plakalarını/striplerini kullanmayınız.
4. **Kontaminasyonu test etmek için, 1) template eklemeyen 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).

**Tablo 2.** Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları

Reaksiyon Kurulumu			qPCR Programı		
İçerik	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
Template Nükleik Asit	5 µL	12.5 µL	40	95°C	1 sn
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	20 µL	50 µL		55°C	1 sn
			FAM/HEX/ROX/CY5 Okuma*		

\* Okuma için farklı cihazlardaki alternatif boyalar: FAM: GREEN, HEX: YELLOW/VIC, ROX: ORANGE/TEXAS RED, CY5: 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	Örneklem, RNA bütünlüğü, nükleik asit ekstraksiyonu, ve ters transkripsiyon ve qPCR inhibisyonu kontrolü	Cq≤34.0 (Geçerli)	IC Cq≥34.0 ise fakat hedef Cq≤38.0 ise, IC geçerli

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

- Geçersiz PC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
- Geçersiz NRC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
- Geçersiz NTC: "Uyarılar" bölümüne dikkat ederek analizi tekrarlayınız.
- 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.

- Gen hedeflerinin Cq değeri <38 ise, **pozitif** olarak sonuçlandırınız.
- Gen hedeflerinin Cq değeri ≥38 ise, **negatif** olarak sonuçlandırınız.

**Hedeflerin kanalında eşğin altında şüpheli bir sigmoidal eğri paternine sahip numuneler için IC'nin Cq değeri incelenmelidir. IC Cq≤34 ise, numune negatif olarak rapor edilmelidir. Cq>34 ise, numune dondurulup çözüldükten sonra test tekrarlanmalıdır. Dondur- çözden sonra problem devam ederse yeni bir numune istenmelidir.**

## 8. 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 (örneğin, semptomların varlığı vb.) ve/veya enfeksiyon evresinden etkilenebilir.
- In-silico 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

TÜM HAKLARI SAKLIDIR