

Kat no: BS-SY-WCOR-401-250/BS-SY-WCOR-401-500/BS-SY-WCOR-401-1000

SARS-CoV-2 + VOC202012/01 RT-qPCR



Kullanım Kılavuzu

1. Kit İçeriği

Raf ömrü 12 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, Transfer Sıcaklığı: +2-8°C					
İçerik/Kullanım Amacı	İçerik	Miktar (10 µL Reaksiyon)			Birim Reaksiyon Tüketimi
		250 Reaksiyon	500 Reaksiyon	1000 Reaksiyon	
Genel SARS-CoV-2, ORF1ab+N (FAM) İnsan RNase-P mRNA (IC) (HEX) VOC-202012/01 (CY5)	VOC Oligo Mix	1 x 625 µL	1 x 1250 µL	2 x 1250 µL	2.5 µL
DNA polimeraz, dNTP karışımı, ters transkriptaz enzimi, ribonükleaz inhibitörü ve reaksiyon tamponu karışımı	2X Prime Script Mix	1 x 1250 µL	2 x 1250 µL	4 x 1250 µL	5 µL

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

Saklama Sıcaklığı: +2-8°C/-20°C; Transfer Sıcaklığı:+2-8°C/-20°C Bileşenler donmuşsa -20°C'de saklayınız. İlk çözündürmeden sonra 2-8°C'de saklayınız.					
Negatif Kontrol Template Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.	NTC	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	2.5 µL
Pozitif Kontrol Template: Sentetik SARS-CoV-2 ve VOC-202012/01 genom parçası Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.	PC-VOC	1 x 250 µL	1 x 500 µL	2 x 500 µL	2.5 µL

Tablo 1c. Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar

Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar	
1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate ≥ 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 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

2. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensibi

VOC-202012/01, B.1.1.7 soyundaki SARS-CoV-2'nin bir varyantıdır. VOC-202012/01, tek bir kümede, özellikle spike (S) proteininde meydana gelen olağandışı çok sayıda mutasyon nedeniyle önceki varyantlardan daha fazla bulaşabilmektedir. **“Bio-Speedy® SARS-CoV-2 + VOC202012/01 RT-qPCR”** kiti, sağlık hizmeti sağlayıcısı tarafından COVID-19 şüphesi olan bireylerden alınan nazofaringeal sürüntüler, orofaringeal sürüntüler, nazal sürüntüler, nazofaringeal aspiratlar, tükürük ve bronkoalveolar lavaj örneklerinde SARS-CoV-2'nin kalitatif tespiti ve VOC202012/01 'den ayrımı için tasarlanmış tek adımlı bir ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) testidir. Kiti kullanarak numuneden sonuca 30 dakikadan daha kısa sürede gitmek mümkündür.

“Bio-Speedy® SARS-CoV-2 + VOC202012/01 RT-qPCR” kiti, rutin tarama için **tek bir mültipleks reaksiyonda** tüm SARS-CoV-2'de bulunan Orf1ab ve N gen bölgelerinin yanı sıra yalnızca VOC-202012/01'nda bulunan N genini de hedeflemektedir. İnsan RNase-P oligo seti, mRNA'daki ekzom-ekzom bağlantısını hedefleyip insan genomunu hedeflemez. Bu nedenle, örneklemeyi, RNA bütünlüğünü,

nükleik asit ekstraksiyonunu ve hem ters transkripsiyon hem de qPCR'nin inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılır. Kit ayrıca sırasıyla kontaminasyonu ve qPCR reaktif stabilitesini test etmek için negatif ve pozitif kontrol templateleri içerir.

3. Kitin Analitik Özellikleri

Kit, Bio-Speedy® vNAT® Ekstraksiyon Sarf Malzemeleri (Bio-Speedy® vNAT® Viral Nükleik Asit Tamponu Kat No: BS-NA-510; Bio-Speedy® vNAT® Transfer Tüp Kat No: BS-NA-513-100) ve GenNAT Viral RNA Transport Medium (Kat No: HP0013) ile doğrulanmıştır. Kit, Bio-Rad CFX96 Touch™, Bio Molecular Systems Magnetic Induction Cycler (MIC), Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex, HiMedia Insta Q96® Plus Real-Time PCR cihazları ile 10 µL qPCR hacmi için doğrulanmıştır.

Kit içindeki oligonükleotid dizileri, GISAID veri tabanındaki tüm hedefleriyle % 100 eşleşmektedir. "Bio-Speedy® SARS-CoV-2 + VOC202012 / 01 RT-qPCR" nin tespit limiti (LOD) tüm örnek türleri ve hedefler için 500 kopya/mL'dir. Kitin sonuçları, sağlıklı donörlerde alınan 42 farklı bakteriyel, viral suşlar ve havuzlanmış nazal yıkama sıvıları için negatiftir. In-silico testleri, aynı zamanda, testin oligonükleotid setlerinin veri tabanındaki herhangi bir nükleotid dizisini çapraz reaksiyona girmedikçe de ortaya çıkarmıştır.

Kit, Yeni Nesil Dizileme (NGS) ile tespit edilmiş 49 farklı soydan SARS-CoV-2 içeren 976 klinik örneğe uygulanmıştır (GISAID ID: 428712-428723, 429861-429873, 437304-437335, 811136-811143, 812761-812781, 812873-812921, 814062-814091, 894246-894276, 903347, 906049, 935048-935102, 939627, 940633-940682, 940709-940713, 983409-983437, 984301, 1008616-1008656, 1020411-1020485, 1034231-1034259, 1063916-1063992, 1073641-1073812, 1082388-1082448, 1095517-1095609, 1096030-1096119). RT-qPCR sonuçları, 370 numunenin VOC202012 / 01 için pozitif ve 606 numunenin VOC202012 / 01 için negatif olduğu NGS sonuçlarıyla % 100 uyumludur. "Bio-Speedy® SARS-CoV-2 + VOC202012 / 01 RT-qPCR" kitinin dizileme tabanlı teknolojilere rölâtif özgüllüğü % 100'dür.

Kit, gerçek zamanlı (RT-qPCR) PCR cihazına özgü reaksiyon tüpleriyle doğrulanmıştır. **Kitin belirtilen analitik performansı yalnızca Tablo 2'deki cihaza özgü reaksiyon tüpleri kullanılarak elde edilebilir. Örneğin, Bio-Rad CFX 96 cihazında şeffaf platelerin, beyaz platelere kıyasla en az 10 kat daha düşük floresans sinyali verdiği tespit edilmiştir.**

Tablo 2. Valide qPCR cihazına özgü plastik sarf malzemeleri

CFX96 Touch*	Rotor-Gene® Q	MIC-4 qPCR	Insta Q96® Plus
Kat#: 1845098; CFX Kalifikasyon plate ve filmi (96 kuyu) Kat#: BS2001 Ultra optik yarı etekli qPCR plate ve filmi (96 kuyu)	Kat#: 981103; Qiagen Strip Tüpü ve Kapağı 0.1 mL (4 kuyu)	Kat#: 71-107C; BMS MIC qPCR Tüpü ve Kapağı 0.1 mL (4 kuyu)	Kat#: PR19-1x25NO; Hi-media plate (96 kuyu) Kat#: PR18-1x100NO; Hi-media film (96 kuyu) Kat#: ANT-MB0096; Plate (96 kuyu) Kat#: ANT-MB11096; Film (96 kuyu)
Kat#: TLS0851; Beyaz Strip (8 kuyu) Kat#: TCS0803; Ultra Şeffaf Strip ve Kapağı (8 kuyu) Kat#: BS1001; Ultra Optik qPCR Strip ve Kapağı (8 kuyu)			Kat#: PR17-1x200NO; Hi-media Strip ve kapağı (8 kuyu) Kat#: ANT-MB02; Strip ve kapağı (8 kuyu)

***Bio-Rad CFX96 qPCR cihazıyla yalnızca beyaz plate/beyaz strip kullanın!**

4. Nükleik Asit Ekstraktlarının Toplanması, Saklanması ve Transferi

Swab örnekleri Dacron veya Polyester swablar kullanılarak toplanmalıdır. Diğer örnek türleri steril kaplarda aktarılmalıdır. Taşıma aşamasında, Viral Taşıma Ortamı (VTM) (Viral taşıma ortamının hazırlanması, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, SOP #: DSR-052-01), vNAT® Viral Transfer Tüpleri (Kat No: BS-NA -513-100) veya GenNAT Viral RNA Transport Medium (Kat No: HP0013) kullanılmalıdır. Örnekler laboratuvara gelene kadar 2-8°C'de saklanmalı ve taşınmalıdır. Swab örnekleri 5 gün içinde, diğer örnek türleri 2 gün içinde aktarılmalıdır. Sevkiyatta bir gecikme bekleniyorsa, numuneler -70°C'de dondurulmalı ve kuru buz ile gönderilmelidir. Örneklerin tekrarlanan dondurma-çözdürmeye maruz bırakılmaması önemlidir.

5. Uyarılar

1. Kiti nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampikonlarından 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. **Tablo 2' de yer almayan qPCR plate/strip kullanmayın!**
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 3).

Tablo 3. Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları

Reaksiyon Kurulumu		qPCR Programı*		
İçerik	Reaksiyon	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2X Prime Script Mix	5 µL	1	52°C	3 dk
		1	95°C	10 sn
VOC Oligo Mix	2.5 µL	5	95°C	1 sn
			60°C	12 sn
Template Nucleic Acid	2.5 µL	35	85°C	1 sn
			60°C	1 sn
TOTAL REACTION VOLUME	10 µL		FAM (Green)/HEX (Yellow)/Cy5 (Red) Okuma	

* qPCR çalışma süresi cihazlar arasında farklılık gösterebilir: **Bio-Rad CFX96 Touch™ için 29 dakika**, BMS MIC qPCR için 30 dakika, Insta Q96® için 35 dakika ve Rotor-Gene® Q cihazı için 43 dakika.

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		
			IC (HEX)	VOC-202012/01 (CY5)	SARS-CoV-2 (FAM)
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 < 33.0 = Geçerli

İnsan mRNA	IC	Örneklem, RNA bütünlüğü, nükleik asit ekstraksiyonu, ve ters transkripsiyon ve qPCR inhibisyonu kontrolü	Cq-HEX \leq 32.0 = Geçerli	Cq-HEX > 32.0 Cq-FAM/CY5 \leq 32.0 = 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 3'teki reaksiyon bileşenlerinin oranlarını koruyarak reaksiyon hacmini 50 μ L'ye yükseltip, analizi tekrarlayınız. Sorun devam ederse, PCR template'i geçersiz olarak kabul ediniz.

Tüm kontroller geçerliyse, sonuçların yorumlanmasına geçiniz. FAM ve CY5 kanallarındaki hedeflerin Cq'sunu kontrol ediniz.

- **Cq-FAM \leq 33** ise, **pozitif olarak sonuçlandırılır**. Aksi halde, **sonuç negatif olarak sonuçlandırılır**.
- **Cq-CY5 \leq 33** ise, **Cq-CY5 ile Cq-FAM arasındaki fark** hesaplanır. Eğer **aradaki fark <6** ise, **örnek CY5 kanalı için pozitif olarak sonuçlandırılır**. Aksi halde, **CY5 kanalı negatif olarak sonuçlandırılır**.

FAM ve CY5 kanallarında, eşik değer altında şüpheli sigmoidal eğriye sahip örnekler için Cq-HEX(IC) değeri incelenmelidir. Cq-HEX \leq 30 ise, numune negatif olarak rapor edilmelidir. Cq-HEX>30 ise, numune dondurulup çözüldükten sonra test tekrarlanmalıdır. Dondurma ve çözme işleminden sonra problem devam ederse yeni bir numune istenmelidir.

Tüm hedeflerin pozitif veya negatif olduğuna karar verdikten sonra, sonuçların Tablo 4'te açıklanan şekilde yorumlanmasına devam ediniz.

Tablo 4. Hasta Örneklerinin Yorumlanması

Durum 1	CY5	FAM	Sonuç
Durum 1	-	-	1) SARS-CoV-2 Negatif; 2) VOC-202012/01 Negatif
Durum 2	+	+	1) SARS-CoV-2 Pozitif; 2) VOC-202012/01 Pozitif
Durum 3	-	+	1) SARS-CoV-2 Pozitif; 2) VOC-202012/01 Negatif
Durum 4	+	-	1) SARS-CoV-2 Negatif; 2) VOC-202012/01 Negatif

8. Sınırlamalar

- *Bio-Speedy*[®] SARS-CoV-2 + VOC202012/01 RT-qPCR performansı sadece nazofaringeal swablarda, orofaringeal swablarda, nazal swablarda, nazofaringeal aspiratlarda, tükürük ve bronkoalveolar lavaj örneklerinde belirlenmiştir.
- *Kitin* hedef bölgelerindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyebilir ve virüsün varlığının tespit edilememesine neden olabilir.
- Bir örnek uygunsuz bir şekilde toplanırsa, taşınırsa veya işlenirse yanlış negatif sonuç oluşabilir.
- İnhibitörler veya diğer interferans türleri yanlış negatif sonuç üretebilir. Numunede yetersiz sayıda organizma varsa da yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir.
- SARS-CoV-2 RNA tespiti hasta faktörlerinden (örn. Semptomların varlığı) ve/veya enfeksiyon aşamasından etkilenebilir.
- In-siliko analizine göre, SARS-CoV-2 ile aynı alt cins (Sarbecovirus) içindeki diğer SARS benzeri koronavirüsler kit ile çapraz reaksiyona girebilir. SARS-CoV-2 ile aynı alt cinsteki (Sarbecovirus) diğer SARS benzeri koronavirüslerin şu anda insan popülasyonunda dolaştığı bilinmemektedir, bu nedenle hasta örneklerinde mevcut olma olasılığı çok düşüktür.

9. Üretici ve Teknik Destek



Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Anonim 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