

# SARS-CoV-2 Emerging Plus



## Kullanım Talimatı



### 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

İçerik/Kullanım Amacı	İçerik	Miktar (10 µL Reaksiyon)			Birim Reaksiyon Tüketim
		250 Reaksiyon	500 Reaksiyon	1000 Reaksiyon	
SARS-CoV-2, ORF1ab+N (FAM) İnsan RNase-P mRNA (IC) (HEX) Spike (S) E484K mutasyonu (ROX) Nucleocapsid (N) D3L mutasyonu (CYS) Spike (S) L452R mutasyonu (CYS.5)	Emerging Oligo Mix	1 x 625 µL	1 x 1250 µL	2 x 1250 µL	2.5 µL
DNA polimeraz, dNTP miks, ters transkriptaz enzimi, ribonükleaz inhibitörü ve reaksiyon tamponu	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 çözdürmeden sonra +2-8°C'de saklayınız.					
Negatif Kontrol Template (Nükleaz içermeyen su) <b>Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	NTC	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	2.5 µL
Pozitif Kontrol Template: "Emerging Oligo Mix" deki hedeflerin sentetik RNA fragman karışımı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-Emerging	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: 5 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 tüp/stripleri için) 10. Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

### 2. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipli

Bulaşma hızında, hastalık şiddetinde ve bağışıklık sistemine yanıtta değişikliğe yol açan mutasyonlara uğramış SARS-CoV-2 varyantları Dünya Sağlık Örgütü tarafından "İlgi Varyantı" (Variant of Interest – VOI) olarak adlandırılmaktadır. İlgi Varyantları arasında küresel tehdit oluşturanlar, "Endişe Varyantı" (Variant of Concern – VOC) listesine taşınmakta ve yaklaşan tehlike konusunda ülkeler uyarılmaktadır. En güncel listeye <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> adresinden ulaşılabilmektedir.

Ağustos ve Eylül 2021 tarihleri arasında GISAID veri tabanından alınmış global VOI ve VOC istatistikleri Tablo 2'de verilmiştir. Bu verilere göre, sekanslanmış SARS-CoV-2 genomlarının % 97,28'i S L452R mutasyonu taşımaktadır. S L452R mutasyonunu içeren varyantların tamamına yakını Delta varyantıdır. S E484K ve N D3L mutasyonlarını içeren varyantların prevalansı % 0,4'den düşüktür. Bu mutasyonlardan N D3L mutasyonunu içeren varyantların tamamına yakını Alfa varyantıdır. S E484K mutasyonu sırasıyla en çok Gama varyantında, sonrasında ise Mu varyantında görülmektedir.

Tablo 2. Tüm SARS-CoV-2 varyantları arasında "Bio-Speedy®SARS-CoV-2 Emerging Plus" kiti ile hedeflenen mutasyonu taşıyan VOC ve VOI yüzdesi. GISAID veri tabanından 13 Ağustos 2021 ve 13 Eylül 2021 tarihleri arasında alınmıştır.

Tüm SARS-CoV-2 varyantlarındaki mutasyonlar (%)	Mutasyon	VOC ve VOI'lerin SARS-CoV-2 varyantları arasındaki mutasyon frekansları (%)								
		Endişe Varyantı (VOC)				İlgi Varyantı (VOI)				
		Delta	Alfa	Beta	Gama	Eta	Iota	Kappa	Lamda	Mu
0,34	S E484K	6,492	6,492	0,624	69,164	0	0,499	0	0	16,729
0,26	N D3L	0,309	99,691	0	0	0	0	0	0	0
97,28	S L452R	99,998	0	0	0,001	0	0	0,001	0	0

“Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Emerging Plus” kiti, **tek bir multipleks RT-qPCR reaksiyonunda 30 dakikadan daha kısa bir sürede** SARS-CoV-2, Alfa varyantı, Delta varyantı ve E484K mutasyonunu içeren varyantları test ve ayırt eder. Kit, sağlık hizmeti sağlayıcıları tarafından COVID-19 şüpheli bireylerden alınan nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü ve oral sürüntü (tükürük) örneklerine uygulanır.

“Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Emerging Plus” kiti, rutin tarama için tüm SARS-CoV-2’lerde bulunan **Orf1ab** ve **N** gen bölgelerinin yanı sıra **Alfa** varyantı tespiti için **N D3L** mutasyonunu, **Delta** varyantlarının tespiti için **S L452R** mutasyonunu ve çoğunlukla **Gama** ve **Mu** varyantlarında görülen **S E484K** mutasyonunu hedeflemektedir. İnsan RNase-P oligo seti, mRNA’daki ekzom-ekzom birleşimini hedefleyip insan genomunu hedeflememektedir. Bu nedenle örneklem, RNA stabilitesi, nükleik asit ekstraksiyonu ve hem qPCR hem de ters transkripsiyonun inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılır. Kit ayrıca kontaminasyonu ve qPCR reaktif stabilitesini test etmek için negatif ve pozitif kontrol templateleri içerir.

Alfa ve Delta varyantları yüksek yayılma hızına sahipken, E484K mutasyonunu içeren varyantlar ve Delta varyantı yeniden enfeksiyon riskine işaret etmektedir. Bu varyantların RT-qPCR yoluyla test edilmesi, DNA dizilimi yoluyla genotipleme yapılması ihtiyacını azaltmaktadır.

### 3. Kitin Analitik Özellikleri

“Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Emerging Plus” Kiti, “vNAT® Viral Nükleik Asit Tamponu (BS-NA-510)”, “vNAT® Transfer Tüpü (BS-NA-513s-100)” ve “Bio-Speedy® vNAT® Transfer Tüpü (BS-NA-513-100)” ile nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, nazal sürüntü ve oral sürüntü (tükürük) örnekleri için valide edilmiştir. Kit, Bio-Rad CFX96 Touch™ cihazı ile 10 µL qPCR hacmi için valide edilmiştir.

Kit, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR sistemine özgü beyaz reaksiyon tüpleriyle validedir:

- Kat #: 1845098; CFX Kalifikasyon Plate ve Seal (96 kuyu)
- Kat #: BS2001 Ultra optik yarı etekli qPCR plate ve seal (96 kuyu)
- Kat #: TLS0851; Beyaz Strip (8 kuyu)
- Kat #: TCS0803; Ultra Clear Strip Kapak (8 kuyu)
- Kat #: BS1001; Ultra Optik qPCR Strip ve Kapak (8 kuyu)

Bio-Rad CFX 96 cihazında şeffaf reaksiyon tüplerinin, beyaz tüplere kıyasla 5-10 kat daha düşük floresans sinyali ile sonuç verdiği tespit edilmiştir. Kitin belirtilen analitik performansı yalnızca valide beyaz tüpler kullanılarak elde edilebilir.

SARS-CoV-2 genomları için tasarlanan oligonükleotidler, tüm ana soyları ve son zamanlarda ortaya çıkan önemli varyantları kapsamaktadır. Tasarlanan oligonükleotid sekansları, GISAID veri tabanındaki bütün hedeflerle %100 eşleşmektedir. Kitin tespit limiti (LOD) tüm örnek tiplerinde SARS-CoV-2 için 500 kopya/mL ve N D3L, S E484K ve S L452R mutasyonları için 10000 kopya/mL’dir. Kitin dışlayıcılık testleri 43 farklı viral ve bakteriyel suş ve farklı sağlıklı insanlardan alınan nazal yıkama havuzu örnekleri üzerinde test edilmiştir. In-silico analizler, aynı zamanda testin oligonükleotid setlerinin veri tabanındaki herhangi bir nükleotid dizisi ile çapraz reaksiyona girmediklerini de ortaya çıkarmıştır. Kapsayıcılık testleri arşivlenmiş 107 farklı SARS-CoV-2 soyundan pozitif klinik nazal sürüntü örnekleriyle test edilmiştir. Test edilen numuneler, Yeni Nesil Dizileme (NGS) yoluyla dizilenmiştir ve RT-qPCR test sonuçları, dizileme sonuçlarıyla %100 uyum içerisinde. “Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Emerging Plus”, FDA EUA onaylı bir kitle eş zamanlı olarak 500 klinik örneğe (129 pozitif + 371 Negatif) uygulanmıştır ve rölatif sensitivite ve spesifitesi 100% olarak bulunmuştur. Pozitif olduğu belirlenen 129 klinik örneğe ayrıca Yeni Nesil Dizileme (NGS) uygulanmış ve kitin, NGS sonuçlarına rölatif spesifitesi %100 olarak tespit edilmiştir.

### 4. Nükleik Asit Ekstraktlarının Toplanması, Saklanması ve Transferi

Sürüntü örnekleri Dacron veya Polyester swablar kullanılarak toplanmalıdır. Taşıma aşamasında, Viral Taşıma Ortamı (VTM) (Viral taşıma ortamının hazırlanması, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, SOP #: DSR-052-01), vNAT® Transfer Tüpü (BS-NA-513s-100) ve Bio-Speedy® vNAT® Transfer Tüpü (Kat No: BS-NA -513-100) kullanılmalıdır. Örnekler laboratuvara gelene kadar +2-8°C’de saklanmalı ve taşınmalıdır. Sürüntü örnekleri 5 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 amplikonlarından 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, tezgâh ve cihazların silinebilir yüzeylerini %10 NaClO ile düzenli olarak temizleyiniz.
9. qPCR’i tamamlanmış reaksiyon tüplerini laboratuvarı 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. **Kit ile valide olmayan qPCR plate/ strip kullanmayın!** Valide qPCR plate/strip türleri bu kılavuzun “Kitin Analitik Özellikleri” bölümünde verilmiştir.
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
Emerging Oligo Mix	2.5 µL	5	95°C	1 sn
			60°C	12 sn
Template Nükleik Asit	2.5 µL	35	85°C	1 sn
			60°C	1 sn
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	10 µL	FAM / HEX / ROX / CY5 / CY5.5 Okuma		

## 7. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold döngü sayısını (Cq) hesaplamak için önerilen threshold seviyesi 200 RFU'dur. Amplifikasyon eğrilerinin şekli incelenmelidir. Cihazın yazılımı tarafından bir numuneye bir Cq değeri atanmışsa ve eğri sigmoidal ise, Cq değeri son değerlendirilmede kullanılabilir. **Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak kaydedilmelidir.** Bir numuneye bir Cq değeri atanmışsa, ancak eğri sigmoidal değilse, **sonuç negatif olarak kaydedilmelidir.**

**Eşik değerinin altında şüpheli sigmoidal eğriye sahip örnekler için FAM, ROX, CY5 veya CY5.5 kanalları, Cq-HEX (IC) değeri incelenmelidir. Cq-HEX≤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.**



**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 4. Kit kontrollerinin beklenen performansı.

Kontrol Türü	İsmi	Kontrol Amacı	Beklenen Sonuç	
			IC (HEX)	SARS-CoV-2 (FAM), Varyantlar (ROX/CY5/CY5.5)
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≤32.0 (Geçerli)	Cq-HEX > 32.0 Cq-FAM/ ROX/ CY5/ CY5.5 ≤ 32.0 = Geçerli

Herhangi bir kontrol Tablo 4'te 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 3'teki 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. FAM, ROX, CY5 ve CY5.5 kanallarındaki hedeflerin Cq'sunu kontrol ediniz.

- Cq-FAM ≤ 33 ise, **pozitif olarak sonuçlandırılır.** Aksi halde, **sonuç negatif olarak sonuçlandırılır.**
- Cq-ROX ≤ 33 ise, **pozitif olarak sonuçlandırılır.** Aksi halde, **sonuç negatif olarak sonuçlandırılır.**
- Cq-Cy5 ≤ 33 ise, **pozitif olarak sonuçlandırılır.** Aksi halde, **sonuç negatif olarak sonuçlandırılır.**
- Cq-Cy5.5 ≤ 33 ise, **pozitif olarak sonuçlandırılır.** Aksi halde, **sonuç negatif olarak sonuçlandırılır.**

Tüm hedeflerin pozitif veya negatif olduğuna karar verdikten sonra, sonuçların Tablo 5'te açıklanan şekilde yorumlanmasına devam ediniz. Tablo 5'teki yorumların daha iyi anlaşılması için Tablo 2b'deki bilgileri inceleyiniz.

Tablo 5. Hasta Örneklerinin Yorumlanması

Durum	FAM	ROX	CY5	CY5.5	Sonuç
Durum 1	-	-	-	-	1) SARS-CoV-2 negatif
Durum 2	+	-	-	-	1) SARS-CoV-2 pozitif. 2) Alfa ve Delta varyantları ile S E484K mutasyonunu içeren varyantlar negatif.
Durum 3	+	+	-	-	1) SARS-CoV-2 pozitif. 2) S E484K mutasyonunu içeren varyantlardan biri (bknz. Tablo 2) pozitif. 3) Alfa ve Delta varyantları negatif.
Durum 4	+	+	+	-	1) SARS-CoV-2 pozitif. 2) S E484K mutasyonunu içeren Alfa varyantı pozitif. 3) Delta varyantı negatif.
Durum 5	+	+	-	+	1) SARS-CoV-2 pozitif. 2) S E484K mutasyonunu içeren Delta varyantı pozitif. 3) Alfa varyantı negatif.
Durum 6	+	-	+	-	1) SARS-CoV-2 pozitif. 2) Alfa varyantı pozitif. 3) S E484K mutasyonunu içeren varyantlar ve Delta varyantı negatif.
Durum 7	+	-	-	+	1) SARS-CoV-2 pozitif. 2) Delta varyantı pozitif. 3) Alfa varyantı ve S E484K mutasyonunu içeren varyantlar negatif.
Durum 8	+	-	+	+	1) SARS-CoV-2 pozitif. 2) N D3L mutasyonunu içeren Delta varyantı pozitif. 3) S E484K mutasyonunu içeren varyantlar negatif.

## 8. Sınırlamalar

- Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Emerging Plus performansı sadece nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, nazal sürüntü ve oral sürüntü (tükürük) örneklerinde belirlenmiştir.
- Kiti 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. Sembollerin Açıklaması

Sembol	Anlam	Sembol	Anlam	Sembol	Anlam
	Avrupa Uygunluğu CE işareti		In Vitro Teşhis Kullanımı için		Güneş ışığından uzak tutun
	Üretici		Lot numarası		Isı ve radyoaktif kaynaklardan koruyun
	Son Kullanım Tarihi YYYY-AA		Katalog Numarası		Paket hasarlıysa kullanmayınız ve kullanım talimatlarına bakınız.
	Negatif Kontrol		Steril Değil		Su/ Nem uzak tutun
	Pozitif Kontrol		Kullanım Talimatlarına bakın veya elektronik kullanım talimatlarına bakın		Kırılabılır dikkatli taşıyınız
	Sıcaklık sınırı (Saklama sıcaklığı)		Dikkat		Dik tutun

## 10. Üretici ve Teknik Destek



### Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Anonim Şirketi

Adres: Reşitpaşa Mh., Katar Cd., 4/B-105, 34469, Sarıyer, İstanbul, TÜRKİYE

Tel: +90 (212) 285 10 17, Faks: +90 (212) 285 10 18

Web: [www.bioeksen.com.tr](http://www.bioeksen.com.tr), E-posta: [info@bioeksen.com.tr](mailto:info@bioeksen.com.tr),

Teknik destek: [support@bioeksen.com.tr](mailto:support@bioeksen.com.tr)

**Kullanıcıya Bildirim:** Ürün ile ilişkili olumsuz olayları 24 saat içerisinde "[vigilance@bioeksen.com.tr](mailto:vigilance@bioeksen.com.tr)" adresinden tarafımıza iletiniz.

TÜM HAKKI SAKLIDIR