

COVID-19/Flu RT-qPCR



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

Saklama Sıcaklığı: -20°C; Transfer Koşulları: +2-8°C						
İçerik/Kullanım Amacı	İçerik	Miktar (10 µL Reaksiyon)				Birim Reaksiyon Tüketim
		100 Reaksiyon	250 Reaksiyon	500 Reaksiyon	1000 Reaksiyon	
DNA polimeraz, dNTP miks, ters transkriptaz enzimi, ribonükleaz inhibitörü ve reaksiyon tamponu	2X Prime Script Mix	1 x 500 µL	1 x 1250 µL	2 x 1250 µL	4 x 1250 µL	5 µL
SARS-CoV-2, <i>Orf1ab</i> + <i>N</i> (FAM) İnsan <i>RNase P</i> mRNA (IC) (HEX) Influenza B (ROX) Influenza A (CYS)	CVD19/FLU Oligo Mix	1 x 250 µL	1 x 625 µL	1 x 1250 µL	2 x 1250 µL	2.5 µL

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

Saklama Sıcaklığı: +2-8°C/-20°C; Transfer Sıcaklığı: +2-8°C/-20°C Bileşenler donmuş -20°C'de saklayınız. İlk çözündürmeden sonra +2-8°C'de saklayınız.						
Negatif Kontrol Template (Nükleaz içermeyen Su) Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz	NTC	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	2.5 µL
Pozitif Kontrol Template: "CVD19/FLU Oligo Mix"deki hedeflerin sentetik RNA fragman karışımı Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz	PC-CVD19/FLU	1 x 250 µL	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.	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/filmli
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 tüp/stripleri için)
	10. Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

2. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipli

"Bio-Speedy® COVID-19/Flu RT-qPCR" Kiti; Influenza A, Influenza B ve Coronavirus 2019 (COVID-19) hastalığına yol açan pandemik SARS-CoV-2 (2019-nCoV) virüsünün tespiti amacıyla kullanılmaktadır. "Bio-Speedy® COVID-19/Flu RT-qPCR", **tek multipleks reaksiyonda, 30 dakikadan kısa bir sürede** SARS-CoV-2, Influenza A ve Influenza B'yi test ve ayırt eden RT-qPCR temelli bir kittir. Kit, sağlık hizmeti sağlayıcıları tarafından hastalık şüphesi olan bireylerden alınan solunum yolu örneklerine uygulanır.

"Bio-Speedy® COVID-19/Flu RT-qPCR" kiti, rutin tarama için tüm SARS-CoV-2'lerde bulunan *Orf1ab* ve *N* gen bölgelerinin yanı sıra Influenza A spesifik *Membran Protein (M)* gen bölgesini ve Influenza B spesifik *Nüklear Export Protein (NEP)* gen bölgesini hedeflemektedir. İnsan *RNase P* oligo seti, mRNA'daki ekzon-ekzon birleşimini hedefleyip insan genomunu hedeflememektedir. Bu nedenle örneklem, RNA stabilitesi, nükleik asit ekstraksiyonu ve hem qPCR hem de ters transkripsiyonun inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılmaktadır. Kit ayrıca kontaminasyonu ve qPCR reaktif stabilitesini test etmek için negatif ve pozitif kontrol templateleri içermektedir.

3. Kitin Analitik Özellikleri

"Bio-Speedy® COVID-19/Flu RT-qPCR" Kiti, "vNAT® Viral Nükleik Asit Tamponu (BS-NA-510)", "vNAT® Transfer Tüpü (BS-NA-513s-100)", "Bio-Speedy® vNAT® Transfer Tüpü (BS-NA-513-100)" ve "RINA™ M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Robotu (RINA-M14-01)" ile nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, bronkoalveolar lavaj (BAL), nazofaringeal aspirat (NPA), tükürük, oral/saliva sürüntü ve balgam örnekleri için valide edilmiştir. Kit, *Bio-Rad CFX96 Touch™*, *Bio Molecular Systems Magnetic Induction Cycler (MIC-4)*, *HiMedia Insta Q96® Plus* ve *Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex* Real-Time PCR sistemlerinde 10 µL qPCR reaksiyon hacmi 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 ve Influenza B için 100 kopya/mL ve SARS CoV-2 için 500 kopya/ mL'dir. Kitin dışlayıcılık testleri 44

Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.

Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.

farklı viral 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.

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 105 pozitif klinik örnek (Arşiv klinik örnekler: 89 SARS-CoV-2, 11 Influenza A, 5 Influenza B) ve 85 negatif klinik örnek üzerinde test edilmiştir. Kitin FDA onaylı RT-qPCR test kitine rölatif duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir.

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 platalere 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® Transfer Tüpü (BS-NA-513s-100) veya "Bio-Speedy® vNAT® Transfer Tüpü (BS-NA-513-100)" 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

- Numune işleme ulusal biyolojik güvenlik tavsiyelerine uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
- Potansiyel enfekte materyalleri hemen %0,5-1 (w/v) sodyum hipoklorit (%10-20 v/v çamaşır suyu) ile temizlenmeli ve temizlik malzemeleri biyolojik olarak tehlikeli atık deposuna atılmalıdır.
- Test prosedürlerini uygulayan tüm personel PCR ve mikrobiyoloji ile çalışmak üzere eğitilmelidir. Örneklem yeterli bilgi ve deneyime sahip personel tarafından yapılmalıdır.
- Kit nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampikonlarından uzakta saklanmalıdır.
- Sıvı transferleri dışında nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri daima kapalı tutulmalıdır.
- Reaksiyon karışımının önceden amplifiye edilmiş hedef diziler tarafından kontaminasyonunu önlemek için ayrı çalışma alanları ve özel ekipmanlar sağlanmalıdır.
- PCR öncesi ve sonrası farklı laboratuvar önlükleri giyilmelidir.
- PCR mikslerini ve template nükleik asitleri pipetlemek için kullanılan pipetler ayrı olmalıdır. Filtreli ve nükleaz içermeyen uçlar kullanılmalıdır.
- Nazofarengeal/orofarengeal swabların toplanması için polyester veya dakron swablar tercih edilmelidir. Pamuklu veya kalsiyum aljinatlı swablar veya tahta çubuklu swablar bazı virüsleri inaktive eden veya PCR'yi inhibe eden maddeler içerebileceğinden kullanılmamalıdır.
- Örnek alma sırasında kontaminasyonu önlemek için kırılabilir şaftlı swabların kullanılması tavsiye edilmektedir.
- Kit içindeki bileşenler farklı lot numaraları veya aynı adı taşıyan ancak farklı üreticilerin kimyasalları ile karıştırılmamalıdır.
- PCR kurulumu esnasında ana stok reaktifleri soğuk blokta tutulmalıdır.
- Kit bileşenleri kullanımdan önce yavaşça karıştırılmalıdır.
- Kit ile kullanılan tüm alet ve ekipmanlar için bakım/kalibrasyon aralığı belirlenmelidir.
- Amplifiye materyalden kaynaklanan yanlış pozitifleri önlemek için PCR'ı tamamlanan reaksiyon tüpleri laboratuvarında açılmadan atılmalıdır.
- Odaların, bankların ve cihazların silinebilir yüzeyleri taze seyreltilmiş %10'luk çamaşır suyu (%0,5 NaClO) ile düzenli olarak temizlenmelidir.
- Yerel, bölgesel ve federal düzenlemelere uygun olarak atıkların imhası gerçekleştirilmelidir.

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.

Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.

Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.

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	Bio-Rad CFX96 Touch™	1	52°C	3 dk	
			1	95°C	10 sn	
			5	95°C	1 sn	
55°C	12 sn					
CVD19/FLU Oligo Mix	2.5 µL		35	85°C	1 sn	
				55°C	1 sn	
Template Nükleik Asit	2.5 µL	Diğer qPCR Cihazları	1	52°C	5 dk	
			1	95°C	10 sn	
			40	95°C	1 sn	
55°C	12 sn					
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	10 µL				FAM/HEX/ROX/CY5 Okuma	

7. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold döngü sayısını (Cq) hesaplamak için önerilen threshold seviyesi *Insta Q96® Plus* ve *CFX96 Touch™* cihazları için 200 RFU'dur. *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.**

Eşik değerinin altında şüpheli sigmoidal eğriye sahip örnekler için FAM, ROX veya CY5 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 çözündürme 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), Influenza A (CY5), Influenza B (ROX)
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 ≤ 33.0 = Geçerli

*İnternal kontrolün bulunduğu multiplex reaksiyonda herhangi bir etken pozitif çıktığında internal kontrol (IC) negatif çıksa dahi hedef pozitif olarak yorumlanır. İnternal kontrolün bulunduğu multiplex reaksiyonda herhangi bir etken pozitif değil ise internal control (IC) pozitif sonuç vermemelidir.

**Bio-Rad CFX cihazı dışındaki tüm cihazlar için uygulanan 40 döngü PCR reaksiyonunun sonucu; Tablo 4'te verilen Cq değerlerine 5 döngü eklenerek yorumlanmalıdır.

Herhangi bir kontrol Tablo 4'te 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 µL'ye yükseltip, analizi tekrarlayınız. Sorun devam ederse, PCR template'i geçersiz olarak kabul ediniz.

Sadece *in vitro* diagnostik kullanım içindir.

Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.

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

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

8. Sınırlamalar

- *Bio-Speedy*[®] COVID-19/Flu, RT-qPCR teknikleri ve *in vitro* tanı prosedürleri konusunda özel eğitim almış klinik laboratuvar personeli tarafından laboratuvar ortamında kullanılmak üzere tasarlanmıştır.
- Klinik örnekler, bir sağlık hizmeti sağlayıcısı tarafından, COVID-19 için Klinik Örneklerin Toplanması, İşlenmesi ve Test Edilmesine İlişkin CDC Geçici Kılavuz İlkeleri'nin güncellenmiş versiyonuna uygun olarak alınmalıdır (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>). Eğer bir numune uygunsuz şekilde alınır, taşınır veya işlenirse yanlış negatif sonuçların alınmasına neden olabilir.
- *Bio-Speedy*[®] COVID-19/Flu'nun performansı yalnızca nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, bronkoalveolar lavaj (BAL), nazofaringeal aspirat (NPA), tükürük, oral/saliva sürüntü ve balgam örneklerinde belirlenmiştir. Kombine nazofaringeal/orofaringeal sürüntüler ve mid-turbinate nazal sürüntüler de kabul edilebilir numune türleridir fakat performansları belirlenmemiştir.
- Pamuklu veya kalsiyum aljinatlı swablar veya tahta çubuklu swablar bazı virüsleri inaktive eden veya PCR'ı inhibe eden maddeler içerebileceğinden yanlış negatif sonuç alınmasına neden olabilir. *Bio-Speedy*[®] COVID-19/Flu'nun performansı yalnızca dakron ve polyester floklu swablar kullanılarak değerlendirilmiştir.
- *Bio-Speedy*[®] COVID-19/Flu'nun hedef bölgelerindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyebilir ve virüsün varlığının tespit edilememesine neden olabilir.
- İnhibitörler veya diğer ajanlar yanlış negatif sonuç alınmasına neden olabilir. Numunede yetersiz sayıda organizma olması da yanlış negatif alınmasına neden olabilir.
- SARS-CoV-2 RNA'sının saptanması, hasta faktörlerinden (örn. semptomların varlığı) ve/veya enfeksiyon evresinden 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.
- Klinik performans, dolaşımdaki tüm varyantlarda oluşturulmamıştır, ancak klinik değerlendirmenin yapıldığı zaman ve yerde dolaşımdaki yaygın varyantları yansıtmaması beklenmektedir.

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		Kırılabilir 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, **E-posta:** info@bioeksen.com.tr,

Teknik destek: support@bioeksen.com.tr

Kullanıcıya Bildirim: Ürün ile ilişkili olumsuz olayları 24 saat içerisinde "vigilance@bioeksen.com.tr" adresinden tarafımıza iletiniz.

TÜM HAKKI SAKLIDIR