

COVID-19 RT-qPCR Tespit Kiti

100 Test

Tablo 1. Kit içeriği (Raf ömrü: 12 ay)
Saklama Koşulları: -20 °C; Transfer Koşulları :+2-8 °C

| Kullanım Amacı / İçerik / Hedef Etken | Bileşen İsmi | | Miktar | Birim Reaksiyon Tüketim |
|---|----------------|------|-------------|-------------------------|
| | Oligo Mix | | | |
| | Kod | Boya | | |
| SARS-CoV-2 (2019-nCoV) (RdRp geni) | Wuhan-RdRp | ROX | 1 x 500 µL | 5 µL |
| Dahili kontrol (IC) (RNase P geni) | | HEX | | |
| DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu | 2X RT-qPCR Mix | | 1 x 1000 µL | 10 µL |
| Ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitör | RT-RIN Mix | | 1 x 100 µL | 1 µL |
| Negatif Kontrol Template | NC | | 1 x 500 µL | 5 µL |
| Her işletimde, kontaminasyon kontrolü amacıyla test edilir | | | | |
| Pozitif Kontrol Template: Sentetik Wuhan-CoV genom fragmanı | PC | | 1 x 50 µL | 5 µL |
| Ayda bir kere, reaktif kontrolü amacıyla test edilir | | | | |

Kullanım Amacı ve Test Prensipli: Kit, Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) hastalığına yol açan, ilk adlandırması 2019 novel CoV (2019-nCoV), güncel adlandırması SARS-CoV-2 (2019-nCoV) olan, ilk olarak Wuhan (Çin) şehrinde tespit edilen salgın virüsünün tespiti amacıyla kullanılmaktadır. Kit nazofaringeal aspirat/lavaj, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü ve balgam örneklerinden elde edilen nükleik asit izolatlarına uygulanmaktadır. Kit ile hızlı tanı RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) gen fragmanını hedefleyen tek adımda ters transkripsiyon (RT) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) (RT-qPCR) ile gerçekleştirilmektedir. RdRp geni hedefli Wuhan-RdRp oligonükleotid seti sadece SARS-CoV-2 (2019-nCoV) ile pozitif sonuç vermektedir. SARS-CoV-2 (2019-nCoV) rutin taramasında, Wuhan-RdRp oligonükleotid seti uygulanır, sonuç Wuhan-RdRp pozitifse SARS-CoV-2 (2019-nCoV) pozitif, sonuç Wuhan-RdRp negatifse SARS-CoV-2 (2019-nCoV) negatif olarak yorumlanır.

Kitin Analitik Özellikleri: Kit Roche LightCycler® 96, Bio-Rad CFX96 Touch™, Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex Real Time PCR Sistemi ile valide edilmiştir ve tam uyumludur. Kitin tespit limiti (LOD), %95 ihtimalle tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonudur. Kitin içerdiği oligonükleotid setlerinin tespit limiti (LOD), dahil edicilik ve dışlayıcılık çalışmaları, 35 farklı genotip kullanılarak gerçekleştirilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanmıştır (WHO Protocol, 13.01.2020, Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR). Testin RdRp geni için LODsi 3.8 kopya-RNA/reaksiyon'dur. Kit RINA™ M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Cihazı (Kat No: RINA-M14-01) ve Kiti (Kat No: RN-NA-14-111-100) veya Bio-Speedy® Kan ve Dokudan Nükleik Asit İzolasyon Kiti (BS-NA-102-100) ile valide edilmiştir ve tam uyumludur.

Uyarılar: 1) Kit, nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampliconlarından uzak bir yerde muhafaza edilmelidir. 2) Kit içeriğindeki bileşenler farklı lot numaralı bileşenler ile ya da aynı isimli fakat farklı üreticilere ait kimyasal maddeler ile karıştırılmamalıdır. 3) Ana stok reaktifler PCR kurulumu sırasında, mümkünse soğuk blok üzerinde bekletilmelidir ve PCR kurulumu mümkünse soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmelidir. 4) Kit bileşenleri kullanım öncesinde hafifçe çalkalanarak karıştırılmalıdır. 5) qPCR miksleri ve kalıp nükleik asitleri pipetlemek için kullanılan mikropipetler ayrı olmalıdır. 6) Kalıp nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri, sıvı transferleri dışında sürekli kapalı tutulmalıdır. 7) Analizin gerçekleştirildiği odalar, tezgahlar ve cihazların silinebilir yüzeyleri düzenli olarak %10'luk NaClO ile temizlenmelidir. 8) qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüpleri laboratuvarında açılmadan bertaraf edilmelidir.

UYGULAMA PROTOKOLU

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

| Reaksiyon kurulumu | | | qPCR Programı | | |
|------------------------|---------------|-----------|---------------|-------------------|-------|
| Bileşen | Ekleme Sırası | Reaksiyon | Döngü Sayısı | Sıcaklık | Süre |
| 2X RT-qPCR Mix | 1 | 10 µL | 1 | 45 °C | 15 dk |
| RT-RIN Mix | 2 | 1 µL | 1 | 95 °C | 3 dk |
| Oligo Mix | 3 | 5 µL | 40 | 95 °C | 5 sn |
| Kalıp Nükleik Asit | 4 | 5 µL | | 55 °C | 35 sn |
| TOPLAM REAKSİYON HACMİ | | 21 µL | | FAM/HEX/ROX okuma | |

Tablo 3. Sonuçların Yorumlanması: 1) FAM/HEX/ROX kanallarında elde edilen çoğalma eğrilerinin şekli incelenir. Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak kaydedilir. 2) Eşik döngü sayısı (Cq) hesaplanır. 3) 38≤Cq ise Negatif; Cq<38 ise Pozitif olarak sonuçlar kaydedilir ve analiz sonucu Tablo 3'e göre yorumlanır.

| Template → | NA İzolatı | | Pozitif Kontrol | | Negatif Kontrol | | Yorum |
|------------|------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|---|
| Hedef → | Wuhan-RdRp | IC | Wuhan-RdRp | IC | Wuhan-RdRp | IC | |
| Durum 1 | Poz | Poz | Poz | Poz | Neg | Neg | SARS-CoV-2 (2019-nCoV) pozitif → Referans laboratuvara danış |
| Durum 2 | Neg | Poz | Poz | Poz | Neg | Neg | SARS-CoV-2 (2019-nCoV) negatif → Testi Raporlandır |
| Durum 3 | Poz | Poz | Poz | Poz | Poz | Neg | Kontaminasyon Problemi: Uyarılar bölümündeki hususlara dikkat edilerek deney tekrarlanır |
| Durum 4 | Neg | Neg | Poz | Poz | Neg | Neg | Ekstraksiyon/İnhibisyon Problemi: 1) Ekstraksiyon tekrar edilir 2) Nükleik asit izolatu 1/10 seyreltilip, deney tekrarlanır |
| Durum 5 | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg | Reaktif Problemi: Üretici ile irtibata geçilerek, reaktifler yenilenir ve reaksiyon tekrarlanır |