

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