

Kat no: BS-SY-WCOR-402-250/BS-SY-WCOR-402-500/BS-SY-WCOR-402-1000

SARS-CoV-2 Variant Plus

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) Spike(S) E484K mutasyonu (ROX) Nükleokapsid (N) D3L mutasyonu (CYS)	Variant 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: "Variant Oligo Mix" içindeki hedefler için sentetik RNA genom parçası karışımı Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.	PC-Variant	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 ≥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/filmli 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 Prensipli

SARS-CoV-2'nin B.1.1.7 varyantı tüm dünyada hızla yayılmaktadır (COVID-19 Haftalık Epidemiyolojik Güncelleme, WHO, 23 Mart 2021). B.1.1.7'nin, çok yüksek yayılım hızına sahip olması nedeniyle 2021 sonunda dünyanın en baskın SARS-CoV-2 türü olacağı tahmin edilmektedir. Spike E484K mutasyonunu (B.1.351, P.1, B.1.525, B.1.526) içeren varyantlar, antikor aracılı bağışıklıktan kaçma konusundaki endişeleri önemli ölçüde artırmıştır. Spike proteininin reseptör bağlanma alanındaki E484K mutasyonu, antikor nötralizasyonunu > 100 kat azaltabilen bir immünodominant bölge olarak tanımlanmıştır (Greaney ve ark., 2021, Cell host & microbe, 29 [3], 463-476). Özellikle E484K pozitif vakaları, varyantın kökenine bakılmaksızın endişe vericidir.

"Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Variant Plus" kiti, sağlık hizmeti sağlayıcıları tarafından COVID-19 şüphesi olan bireylerden alınan nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, nazal sürüntü, nazofaringeal aspirat, tükürük ve bronkoalveolar lavaj örneklerinde **SARS-CoV-2'nin kalitatif tespiti ve B.1.1.7, ile E484K mutasyonunu içeren varyantların ayırt edilmesi** için tasarlanmış tek adımlı ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR)

testidir. "Bio-Speedy SARS-CoV-2 Variant Plus" kiti, 30 dakikadan kısa sürede hem SARS-CoV-2 tespitini hem de varyantların ayırt edilmesini DNA dizi analizine gerek kalmadan sağlamaktadır.

Tek bir multipleks reaksiyonda, "Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Variant Plus" kiti, rutin tarama için tüm SARS-CoV-2'lerde bulunan Orf1ab ve N gen bölgelerinin yanı sıra B.1.1.7 tespiti için N D3L mutasyonunu ve antikor aracılığıyla bağışıklıktan kaçma olasılığı yüksek olan varyantların tespiti için E484K mutasyonunu hedeflemektedir (Tablo 2). 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.

Tablo 2. Mutasyonu içeren mevcut toplam genomlardaki soynun görülme sıklığı (GISAID veritabanı, 28 Mart 2021'de alındı).

Mutasyon	% Soynun görülme sıklığı						Toplam erişilebilen genom
	B.1.1.7	B.1.351	P.1	B.1.525	B.1.526	Other	
N D3L	99.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	229569
S E484K	0.8%	37.8%	8.8%	6.3%	14.4%	32.0%	14019

3. Kitin Analitik Özellikleri

Kit, Bio-Speedy® vNAT® Viral Nükleik Asit Tamponu (BS-NA-510), Bio-Speedy® vNAT® Transfer Tüpü (BS-NA-513-100), GenNAT Viral RNA Transport Medium (HP0013) ile valide edilmiştir. Kit, Bio-Rad CFX96 Touch™ cihazı ile 10 µL qPCR hacmi için valide edilmiştir.

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 ve N D3L için 1000 kopya/mL, E484K için 10000 kopya/mL'dir. Kitin sonuçları, sağlıklı donörlerden alınan 42 bakteri, viral süşun ve havuzlanmış nasal yıkama örneklerinin tümü için negatiftir. In-silico analizler, aynı zamanda testin oligonükleotid setlerinin veri tabanındaki herhangi bir nükleotid dizisi ile çapraz reaksiyona girmediğini de ortaya çıkarmıştır.

Kit, Yeni Nesil Dizileme (NGS) uygulanmış, 49 farklı soydan 2000 örnek üzerinde uygulanmıştır. (GISAID ID: 811140-811142, 812772-812773, 812778, 894246-894276, 903347, 906049, 935048-935102, 939627, 940633-940682, 940709-940713, 983409-984301, 1008616-1008656, 1020411-1020485, 1034231-1034259, 1063916-1063992, 1073641-1073812, 1082388-1082448, 1095517-1095609, 1096030-1096118, 1096119-1097307, 1169975-1170125, 1171872-1171965, 1225780-1225871, 1229415-1229506, 1263236-1263318, 1272095-1272187, 1278188-1278273, 1293236-1293326, 1358323-1358407, 1379157-1379195). RT-qPCR sonuçları, N D3L pozitif 501 [479(B.1.1.7) +22(B.1, B.1.1, B.1.1.189, B.1.1.419, B.1.170, B.1.177)] örneğin, S E484K pozitif 65 [61 (B.1.351) + 1 (P.1) + (B.1.525) + 2(B.1.1, B.1.313)] örneğin ve N D3L ve S E484K negatif 1434 örneğin NGS sonuçlarıyla %100 eşleşmektedir. Kitin, NGS sonuçlarına rölatif özgüllüğü %100 olarak tespit 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.

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), Bio-Speedy® 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

- Kiti nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampikonlarından uzakta saklayınız.
- Kit bileşenlerini farklı lot numaralarıyla veya aynı adı taşıyan ancak farklı üreticilere ait kimyasallarla karıştırmayınız.
- Ana stok reaktiflerini PCR kurulumu sırasında soğuk blokta tutunuz.
- Mümkünse, PCR'yi soğuk blokta kurunuz.
- Kullanmadan önce kit bileşenlerini yavaşça karıştırınız.

- qPCR karışımlarını ve template nükleik asitleri pipetlemek için ayrı mikropipetler kullanınız.
- Sıvı transferleri dışında template nükleik asit ve pozitif kontrol tüplerini her zaman kapalı tutunuz.
- Testin yapıldığı oda, tezgah ve cihazların silinebilir yüzeylerini %10 NaClO ile düzenli olarak temizleyiniz.
- qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüplerini laboratuvarda açmadan uzaklaştırınız.

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.
- Kit ile valide olmayan qPCR plate/ strip kullanmayın! Valide qPCR plate/strip türleri bu kılavuzun "Analitik Özellikler" bölümünde verilmiştir.**
- 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 işlemi başlatınız (Tablo 4).

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
Variant 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 (Green)/HEX (Yellow)/ROX (Orange)/CY5 (Red) Read		

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 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 IC'nin Cq 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), Varyantlar (ROX/CY5)
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	Örnekleme, 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 ≤ 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 µL'ye yükseltip, analizi tekrarlayınız. Sorun devam ederse, PCR template'i geçersiz olarak kabul ediniz.

Tüm kontroller geçerliyse, sonuçların yorumlanmasına geçiniz. FAM, ROX ve CY5 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, **ROX kanalı negatif olarak sonuçlandırılır**.
- **Cq-Cy5 ≤ 33** ise, **Cq-Cy5 ile Cq-FAM arasındaki fark** hesaplanır. Eğer **aradaki fark <6** ise, örnek **Cy5 pozitif olarak sonuçlandırılır**. Aksi halde, **Cy5 kanalı 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 2'deki bilgileri inceleyiniz.

Tablo 5. Hasta Örneklerinin Yorumlanması

Durum	FAM	ROX	CY5	Sonuç
1	-	-	-	1) SARS-CoV-2 negatif
2	+	-	-	1) SARS-CoV-2 pozitif; 2) B.1.1.7 ve E484K içeren varyantlar (B.1.351, P.1, B.1.525, B.1.526, vb.) negatif
3	+	+	+	1) SARS-CoV-2 pozitif; 2) E484K mutasyonunu taşıyan B.1.1.7 pozitif
4	+	+	-	1) SARS-CoV-2 pozitif; 2) B.1.1.7 negatif, 3) E484K içeren varyantlardan biri (B.1.351, P.1, B.1.525, B.1.526, vb.) pozitif
5	+	-	+	1) SARS-CoV-2 pozitif; 2) B.1.1.7 pozitif

8. Sınırlamalar

- *Bio-Speedy® SARS-CoV-2 Variant Plus* 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