

## 1. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipli

TÜSEB DiaKit Multiplex-RSV SARS-CoV-2/İnfluenza A&B/RSV RT-qPCR Tanı Kiti, SARS-CoV-2, İnfluenza A, İnfluenza B, Respiratuvar Sinsitiyal Virüs A/B etkenlerin klinik örneklerde hızlı ve doğru tanısı amacıyla kullanılmaktadır. Kit, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal aspirat ve balgam numunelerinden elde edilen nükleik asit izolatlarına uygulanmaktadır. Kit ile hızlı tanı, hedef etkene özgü genomik RNA ve DNA bölgelerini hedefleyecek adımlı ters transkripsiyon (RT) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) (qRT-PCR) ile gerçekleştirilmektedir. Kit ile tanı **45 dakikadan kısa bir sürede\*** gerçekleştirilebilmektedir. \*Bio-Rad CFX96 Touch ile “TÜSEB DiaKit Multiplex-RSV SARS-CoV-2/İnfluenza A&B/RSV RT-qPCR Tanı Kiti” “TÜSEB DiaVnat Ekstraksiyon ve Transfer Tüpü (SBTvNAT2022-100)” ile valide edilmiştir. Kit, sağlık hizmeti sunucuları tarafından hastalık şüphesi olan bireylerden alınan nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal aspirat ve balgam örneklerine uygulanır.

## 2. Raf Ömrü

12 ay; kutunun üzerindeki son kullanma tarihine bakınız. Depolama sıcaklığında saklanan her bir reaktif, tüp üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Kitin son kullanma tarihi reaktiflerin son kullanma tarihine göre belirlenmektedir.

## 5. Kitin İçeriği

Saklama Sıcaklığı: -20 °C; Transfer Koşulları: 2-8 °C				
İçerik/Kullanım Amacı	Kanal	İçerik	Miktar (10 µL Reaksiyon)	Birim Reaksiyon Tüketim
DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu, ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitörü	-	2X Master Mix	6 x 1670 µL (1000) 4 x 1250 µL (500)	10 µL
SARS CoV-2	FAM	Primer Mix	4 x 1250 µL (1000) 2 x 1250 µL (500)	5 µL
IC; Internal Kontrol, (İnsan RNase P geni)	HEX			
Respiratuvar Sinsitiyal Virüs A/B	ROX			
İnfluenza A&B	Cy5			

Tablo1. Kit içeriği

Saklama Sıcaklığı: 2-8 °C; Transfer Sıcaklığı: 2-8 °C Bileşenler donmuşsa -20 °C'de saklayınız. İlk çözdürmeden sonra 2-8 °C'de saklayınız.			
Negatif Kontrol (Nükleaz İçermeyen Su) Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.	NTC	1 x 1000 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: Hedef gen bölgelerini içeren plazmit Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.	PC	1 x 500 µL	5 µL

Tablo 2. Kit içeriği-Kontroller

## 3. Uyarılar

- Kiti nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampliconlarından 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, tezgâh ve cihazların silinebilir yüzeylerini %10 NaClO ile düzenli olarak temizleyiniz.
- qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüplerini laboratuvarda açmadan uzaklaştırınız.

## 4. Saklama Koşulları

Kit, saklama sıcaklığı (-15°C ile -25 °C arasında) korunduğu sürece, ambalaj üzerinde yazılı olan son kullanma tarihine kadar stabil kalabilmektedir.

## 6. Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar

Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar	
1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate $\geq 3$ °C/sec. 2. 1-10 $\mu$ L mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve Rnaz içermeyen) 3. Spin Santrifüj: min.3000 rpm (8'li strip ve 2 mL mikrosantrifüj tüpü ile uyumlu) 4. Vorteks	5. PCR kurulumu için UV kabini 6. Soğuk Tüp standı (mikrosantrifüj tüpleri ve PCR tüp/stripi için) 7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.

Tablo 3. Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar

## 7. Valide qPCR Cihazları

TÜSEB DiaKit Multiplex-RSV SARS-CoV-2/İnfluenza A&B/RSV RT-qPCR Tanı Kiti Tablo 4'te verilen cihazlar ile valide edilmiştir.

CFX96 Touch*	Rotor-Gene® Q	MIC-4 qPCR	QuantStudio
Kat#: 1845098; CFX Kalifikasyon plate ve filmi (96 kuyu)	Kat#: 981103; Qiagen Strip Tüpü ve Kapağı 0.1 mL (4 kuyu)	Kat#: 71-107C; BSMIC qPCR Tüpü ve Kapağı 0.1 mL (4kuyu)	Kat#: AB-2800/W; ABgene96 beyaz plate
Kat#: BS2001 Ultra optik yarı qPCR plate ve filmi (96 kuyu)			Kat#: AB-1170 AbsoluteqPCR seal
Kat#: TLS0851; Beyaz Strip (8 kuyu)			Kat#: AB-1502/W; beyaz PCR tüp

\*Bio-Rad CFX96 qPCR cihazıyla yalnızca beyaz plate/beyazstrip kullanın!

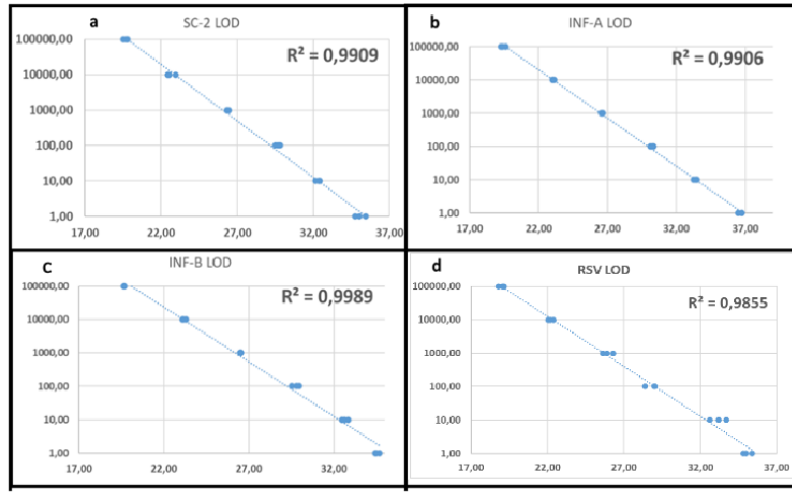
Tablo 4. Valide qPCR cihazına özgü plastik sarf malzemeleri

## 8. 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) veya TÜSEB DiaVnat Ekstraksiyon ve Transfer Tüpü (SBTVNAT2022-100) 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. Laboratuvara VTM içerisinde gelen örneklerin Nükleik Asit Saflaştırma işlemine tabi tutulması gerekmektedir. TÜSEB DiaVnat Ekstraksiyon ve Transfer Tüpü içerisinde gelen örnekler doğrudan PCR reaksiyonuna dahil edilebilir.

## 9. Analitik Performans

Bahsi geçen patojenlerin analitik performans çalışmaları, patojenlerin hedef gen bölgelerini içeren sentetik pUC57 plazmiti ile gerçekleştirilmiştir. (Şekil 1.)



Şekil 1. Gözlemlenebilirlik sınırı (LOD) a. SC-2, b. INF-A, c. INF-B, d. RSV, yatay eksen CT temsil eder dikey eksen Konsantrasyon Gc/μL temsil eder. İlgili patojenler  $10^5$  Gc/μL ile  $10^0$  Gc/μL konsantrasyonları aralığında üçer tekrarlı çalışılmıştır.

## 10. 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!
- qPCR cihazını aşağıda belirtilen şekilde programlayınız ve reaktifleri qPCR tüplerine aşağıda belirtildiği sırasıyla ekleyiniz, tüpleri kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve işletimi başlatınız (Tablo 5-6)

Reaksiyon Kurulumu		qPCR Programı (BIO-RAD CFX96)		
İçerik	Hacim	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2 x Master Mix	10 µL	1	50°C	5 dk
		1	95°C	3 dk
Primer Mix	5 µL	40	95°C	5 sn
Template Nükleik Asit	5 µL		60°C	10 sn
Total Reaksiyon Hacmi	20 µL	FAM / HEX / ROX / CY5 Okuma		

**Tablo 5. Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları (Bio-Rad CFX96)**

Reaksiyon Kurulumu		qPCR Programı (ROTOR-GENE Q)		
İçerik	Hacim	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2 x Master Mix	10 µL	1 (Hold)	50°C	8 dk
		1 (Hold-2)	95°C	3 dk
Primer Mix	5 µL	45 (Cycling)	95°C	15 sn
Template Nükleik Asit	5 µL		60°C	15 sn
Total Reaksiyon Hacmi	20 µL	GREEN / YELLOW / ORANGE / RED Okuma		

**Tablo 6. Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları (Rotor-Gene Q\*\*)**

\*\* Analiz yapılırken ilgili kanalın seçiminden sonra *Dynamic Tube* ve *Slope Correct* aktif edilmelidir. Threshold değeri 0,02 olarak ayarlanmalıdır.

## 11. Test Sonuçlarının Yorumlanması

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.

Hedeflerin kanalında eşğin altında şüpheli bir sigmoidal eğri paternine sahip numuneler için IC'nin Cq değeri incelenmelidir. IC Cq≤34 ise (Rotor-Gene için Ct ≤ 40.0), numune negatif olarak rapor edilmelidir. Cq>34 (Rotor-Gene için Ct > 40.0) ise, numune dondurulup çözüldükten sonra test tekrarlanmalıdır. Dondur- çözen sonra problem devam ederse yeni bir numune istenmelidir.

Kontrol Türü	İsmi	Kontrol Amacı	Beklenen Sonuç	
NTC eklenmesi	NTC	Kontaminasyon kontrol	Cq Yok = Geçerli	
Template ekleme yok	NRC	Reaktif kontaminasyon kontrol	Cq Yok = Geçerli	
PC eklemesi	PC	Pozitif reaktif kontrol	Cq ≤ 38.0 = Geçerli (Rotor-Gene için Ct ≤ 43.0 = Geçerli)	
İnsan RNase P*	IC	Örneklem, RNA bütünlüğü, nükleik asit ekstraksiyonu ve ters transkripsiyon ve qPCR İnhibisyonu kontrolü	Cq≤34.0 = Geçerli (Rotor-Gene için Ct ≤ 40.0 = Geçerli)	IC Cq ≥ 34.0, ise fakat hedef Cq ≤ 38.0 ise, IC geçerli (Rotor-Gene için Ct ≤ 43.0)

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

**Tablo 7. Kit kontrollerinin beklenen performansı**

Herhangi bir kontrol Tablo 7'de açıklandığı gibi çalışmazsa, çalışma geçersiz sayılır ve test tekrarlanır.

### 1. Geçersiz PC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.



**TÜSEB DiaKit Multiplex-RSV  
SARS-CoV-2/İnfluenza A&B/RSV  
RT-qPCR Tanı Kiti Kullanım  
Kılavuzu**



- Geçersiz NRC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
- Geçersiz NTC: “Uyarılar” bölümüne dikkat ederek analizi tekrarlayınız.

Tüm kontroller geçerliyse, sonuçların yorumlanmasına geçiniz.

- Gen hedeflerinin Cq değeri  $\leq 38$  ise, **pozitif** olarak sonuçlandırınız.
- Gen hedeflerinin Cq değeri  $> 38$  ise, **negatif** olarak sonuçlandırınız.

## 12. Sınırlamalar

- TÜSEB DiaKit Multiplex-RSV SARS-CoV-2/İnfluenza A&B/RSV RT-qPCR Tanı Kiti performansı nazofaringeal aspirat, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü ve balgam örneklerinde belirlenmiştir.
- Kitin hedef bölgelerindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyebilir ve virüsün varlığının tespit edilememesine neden olabilir.
- Numune toplanması, taşınması veya işlenmesi sırasında yapılan hatalar, yanlış negatif sonuçlara yol açabilir.
- İnhibitörler veya diğer enterferans etkenler yanlış negatif sonuç alınmasına neden olabilir. Numunede yetersiz sayıda hedef organizma bulunduğu durumlarda da yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir.