

## 1. Ürün Açıklaması

TÜSEB DiaKit SARS-CoV-2 RT-qPCR tanı kiti, COVID-19 etkeni olan SARS-CoV-2 koronavirüsünün genomik RNA'sının kalitatif tespiti için hazırlanmış, spesifik Taqman prob sisteminin kullanıldığı tek basamaklı bir in-vitro tanı kitidir.

## 2. Kitin Tanımı

Koronavirüsler (CoV), memeli sınıfına ait hayvanları ve kuşları enfekte ederek hastalığa neden olabilen RNA virüs ailesine ait virüslerdir.

Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan SARS-CoV-2 virüsü ise vakaların yaklaşık %2'sinin ölümlerine sonuçlandığı solunum sistemi enfeksiyonuna (COVID-19) sebep olan yeni bir koronavirüstür.

Kit, hastalık için belirlenen klinik semptomları gösteren bireylerde alınan alt solunum yolu örnekleri (balgam, bronkoalveolar lavaj) ve üst solunum yolu örnekleri (nazofaringeal-orofaringeal sürüntü) ile çalışmaktadır.

Kit ile SARS-CoV-2 genomunda bulunan nükleokapsid proteini kodlayan "N" geni hedef olarak belirlenmiştir. Nazofaringeal veya orofaringeal sürüntü ile alınan örneklerin kalite ve inhibisyon kontrolü için "RNaseP" geni internal kontrol geni olarak seçilmiştir.

## 3. Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Olan Cihaz ve Ekipmanlar

1. Real-Time PCR Cihazı Minimum 2 Kanallı (FAM/HEX)
2. 1-10 µL, 10-100 µL ve 100-1000 µL mikropipet ve mikropipet uçları (steril, Rnase-Dnase içermeyen)
3. Spin Santrifüj - min. 3000 rpm
4. Vorteks karıştırıcı
5. 0.5, 1.5 veya 2 mL eppendorf tip mikrosantrifüj tüpü
6. qPCR reaksiyon kurulumu için steril laminar flow kabin
7. Tek kullanımlık nitril eldiven
8. qPCR cihazı ile uyumlu reaksiyon strip veya plate
9. Plate için kapatıcı film (plate sealing film)

## 6. Kitin İçeriği

Kit içerikleri	Kapak	Miktar	
		500 reaksiyon	1000 reaksiyon
Prime Script	Yeşil	2 x 1000 µL	4 x 1000 µL
Oligo Mix	Mavi	2 x 1000 µL	4 x 1000 µL
Pozitif Kontrol	Kırmızı	1 x 300 µL	2 x 300 µL
Negatif Kontrol	Beyaz	1 x 500 µL	2 x 500 µL

Tablo 1. Kit içeriği

Oligo Mix içeriğinde viral hedef gen ve internal kontrol genine ait primer ve floresan işaretli problemler bulunmaktadır.

Prime Script ise RT-PCR reaksiyonun temel bileşenlerinden olan Taq polimeraz ve ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimleri ile birlikte DNA nükleotid bazları (dNTPs) ve reaksiyon için gerekli tamponları ihtiva etmektedir.

Pozitif kontrol içeriğinde sentetik olarak sentezlenmiş hedef viral ve insan gen oligonükleotid dizilerini ihtiva etmektedir.

Negatif kontrol ise "Rnase-Dnase Free Pcr grade" su içermektedir.

## 7. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon karışımı hazırlamadan önce çalışılan kabinin sterilitesine dikkat edilmelidir. İşlemlerden önce ve tamamlandıktan sonra çalışma alanı yüzeyi ve alet yüzeyi yeni hazırlanmış %10 sodyum hipoklorit solüsyonu ile dezenfekte edilmeli ve ardından %75 etanol veya saf su ile temizlenmelidir. Bu işlemin ardından laboratuvara gelen numune başına **Tablo 2**'de belirtilen miktarlara göre reaksiyon kurulmalıdır.

Bileşen	Reaksiyon (µL) (tek numune için)
Prime Script	4
Oligo Mix	4
Numune	2
Toplam Hacim	10

Tablo 2. Reaksiyon kurulumu

Kitin içerisinde bulunan tüpler -20° C'den çıkarıldıktan sonra kabin içerisinde tüp standında çözülmeye bırakılmalıdır. Çözülme işlemi gerçekleştiikten sonra tüpler spin santrifüj cihazında 3-5 saniye santrifüjlenmelidir. Bu işlemden sonra boş 1.5 – 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine **Tablo 2**'de bir numune için belirtilen miktarlar dikkate alınıp numune sayısına göre önce Prime Script daha sonra Oligo Mix eklenmelidir. Elde edilen karışıma kesinlikle vorteks işlemi uygulanmamalıdır. Sadece pipetaj işlemi uygulanmalıdır. Bu işlemin ardından hazırlanan karışım plate veya striplere her numune için 8 µL olacak şekilde mikropipet yardımıyla aktarılmalıdır.

Numune aktarım işleminden önce numunelerin bulunduğu tüplere 3-5 saniye vorteks işlemi uygulanmalıdır. İşlemin ardından numunelerden 2 µL olacak şekilde mikropipet yardımıyla plate veya striplere aktarılmalıdır. Bu işlemi yaparken her bir numunede yeni pipet ucuna geçilmelidir. Numune aktarım işleminin tamamlanmasının ardından plate üzerine seal (kapatıcı) veya strip kullanıyorsa kapakları kapatılıp; plate için plate-santrifüj, stripler için strip-santrifüj cihazı kullanılarak çepelerde karışımları indirmek ve plate veya strip içerisinde var olan kabarcıkları gidermek için 5 saniye santrifüj işlemi uygulanmalıdır.

## 8. Reaksiyon Protokolü

Reaksiyon kurulum işleminin ardından plate veya strip cihaza yerleştirildikten sonra **Tablo 3**'teki basamaklar cihaza uygun bir şekilde ayarlanmalıdır.

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	50°C	3 dk
1	95°C	10 sn
40	95°C	1 sn
	60°C	1 sn

**Tablo 3.** Reaksiyon protokolü

Protokol basamakları ayarlandıktan sonra cihazın teknik altyapısına elverişli ise "ramp rate" basamakları **Tablo 4**'deki gibi ayarlanmalıdır.

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	50°C	3 dk
Ramp rate 5°C saniye		
1	95°C	10 sn
Ramp rate 5°C saniye		
40	95°C	1 sn
	60°C	1 sn
Ramp rate 5°C saniye		

**Tablo 4.** Reaksiyon protokolü (Ramp Rate eklenmiş)

Protokol kurulumundan sonra cihazlarda hedef florofor boya ve ait olduğu kanallar **Tablo 5**'teki gibi seçilmelidir.

Florofor	Hedef
HEX	N geni
FAM	RNASE-P geni

**Tablo 5.** Floresan Tanımlama Profili

TÜSEB DiaKit SARS-CoV-2 RT-qPCR tanı kiti HEX kanalında viral geni, FAM kanalında ise internal kontrol RNASEP genini tespit etmektedir.

## 9. Sonuçların Yorumlanması

Real-Time PCR cihazında çalışma tamamlandıktan sonra amplifikasyon değerleri ve eğrilerine göre yorumlanmalıdır.

**Bio-Rad CFX96 Touch™ cihazı için threshold (eşik değeri) 200 RFU'dur.**

**Rotor Gene Q cihazında yorumlama yapmadan önce:**

- Dynamic Tube seçeneği etkin,
- Slope Correct seçeneği pasif,
- Outlier Removal seçeneği 0 olmalıdır,
- Eşik seviyesi 0,02 olarak ayarlanmalıdır.

N Geni	RnaseP	Değerlendirme
+	+	Kişi SARS-CoV-2 pozitif
-	+	Kişi SARS-CoV-2 negatif
+	-	IC Kontrol problemi. Test tekrar edilmeli.
-	-	

**Tablo 6.** Reaksiyon sonuçlarının değerlendirilmesi

- ✓ Fam ve HEX kanalı için yorumlama yaparken **Cq < 37 geçerli** kabul edilmelidir.
- ✓ **Cq > 37** üzerinde olanlar ise geçersiz kabul edilmelidir.