

1. Ürün Açıklaması

TÜSEB DiaKit SARS-CoV-2 V01 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 Real Time PCR 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 sonuclandırıldığı 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 'ORF1ab' ve 'N' genleri hedef olarak belirlenmiştir. Nazofaringeal veya orofaringeal sürüntü ile alınan örneklerin kalite ve inhibisyon kontrolü için "RNaseP" geni internal kontrol geni olarak seçilmiştir.

5. Kitin İçeriği

Kit içerikleri	Miktar		
	100 reaksiyon	500 reaksiyon	1000 reaksiyon
2X Master Mix	1 x 500 µL	2 x 1250 µL	4 x 1250 µL
Primer Mix	1 x 250 µL	2 x 625 µL	2 x 1250 µL
Negatif kontrol	1 x 500 µL	1 x 500 µL	1 x 1000 µL
Pozitif kontrol	1 x 100 µL	1 x 200 µL	1 x 250 µL

Tablo1. Kit içeriği

TÜSEB DiaKit SARS-CoV-2 V01 RT-qPCR Tanı Kiti ile birlikte verilen pozitif kontrol örneği sentetik olarak üretilmiş hedef gen bölgeleri içeren fragmenttir ve manuel metod ile ekstrate edilmiştir. Negatif Kontrol olarak rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılan nükleaz içermeyen su (NFW) kullanılır.

6. RT-qPCR Uygulama Protokolü

Analize başlamadan önce aşağıdaki bilgileri göz önünde bulundurunuz:

1. Kit, sadece toplam qPCR hacminin %25'i kadar olan kalıp nükleik asit hacmi için valide edilmiştir.
2. Kit, periyodik bakım kayıtları olmayan real time PCR cihazlarıyla kullanılmamalıdır.
3. qPCR cihazını aşağıda belirtilen şekilde programlayınız ve reaktifleri qPCR tüplerine aşağıda belirtildiği sırasıyla ekleyiniz, tüpleri kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve işlemini başlatınız (Tablo 2-3)

Reaksiyon Kurulumu		qPCR Programı (BIO-RAD CFX96)*		
İçerik	Hacim	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2 x Master Mix	5 µL	1	42°C	5 dk
		1	95°C	1 dk
Primer Mix	2,5 µL	39	95°C	1 sn
Örnek Nükleik Asit	2,5 µL		60°C	1 sn
Toplam Reaksiyon Hacmi		10 µL		
FAM / HEX Okuma				

Tablo 2. Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları (Bio-Rad CFX96)

*FAM ve HEX kanalının ortalama trashold değeri 100 RFU olarak belirlenmiştir. RFU değeri sabit bir değer olmayıp numunenin viral yükü ve grafiğin sigmoid yapısına göre değişiklik gösterebilir.

Reaksiyon Kurulumu		qPCR Programı (ROTOR-GENE Q)**		
İçerik	Hacim	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2 x Master Mix	5 µL	1 (Hold)	42°C	8 dk
		1 (Hold-2)	95°C	1 dk
Primer Mix	2,5 µL	45 (Cycling)	95°C	10 sn
Örnek Nükleik Asit	2,5 µL		60°C	10 sn
Toplam Reaksiyon Hacmi		10 µL		
GREEN / YELLOW Okuma				

Tablo 3. Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları (Rotor-Gene Q)**

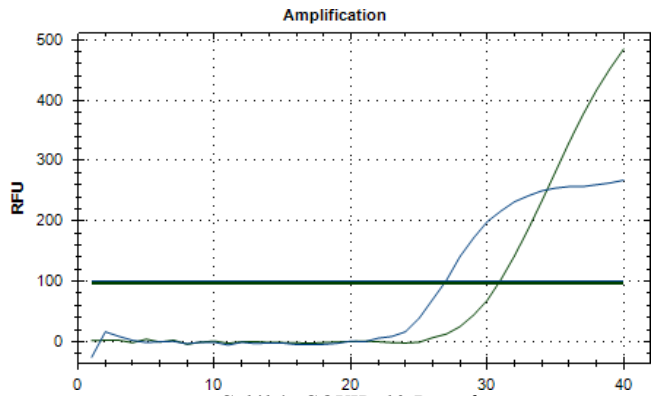
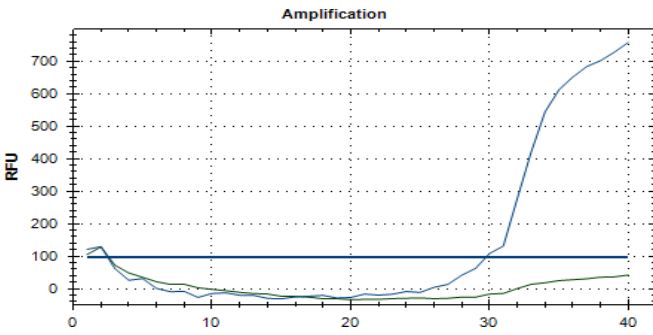
** Analiz yapılırken ilgili kanalın seçiminden sonra *Dynamic Tube* ve *Slope Correct* aktif edilmelidir. Threshold değeri 0,02 olarak ayarlanmalıdır.

7. Sonuçların Yorumlanması

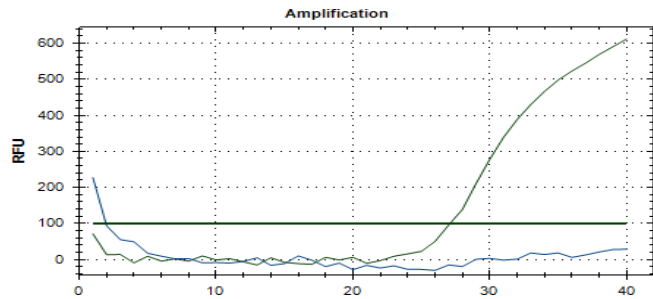
Sonuç	Beklenen Ct Değerleri		Değerlendirme
	FAM (Orflab&N)	HEX (RnaseP)	
Negatif Kontrol	-	-	Beklenen NK
Pozitif Kontrol	≤38	≤38	Beklenen PK
1.	≤38	≤38 / -	COVID-19 Pozitif
2.	-	-	Test tekrarı
3.	-	≤38	COVID-19 Negatif

Tablo 4. Reaksiyon sonuçlarının değerlendirilmesi

*In-vitro Diagnostic Tıbbi Cihazlar Direktifi (98/79/EC) uygunluğu için; TÜSEB DiaKit SARS-CoV-2 V01 RT-qPCR Tanı Kiti, SBTvNAT2022-100 referans numaralı TÜSEB DiaVnat Ekstraksiyon ve Transfer Tüpü markalı NAEKTS (Nükleik Asit Ekstrakte Edici ve Koruyucu Taşıma Sıvısı) ile birlikte kullanımının tam uyumluluğunu beyan ederiz.



Şekil 1: COVID-19 Pozitif



Şekil 2: COVID-19 Negatif

8. Validasyon Beyanı

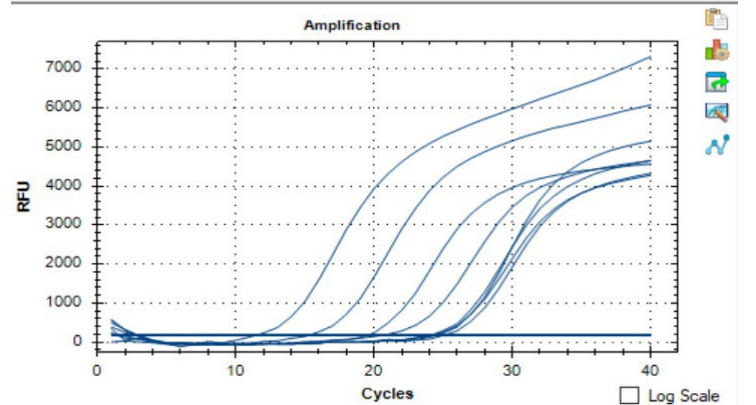
TÜSEB DiaKit SARS-CoV-2 V01 RT-qPCR Tanı Kiti'nin validasyon çalışması, 10^7 / μ L kopya sayısı ile 10^0 / μ L kopya sayısı arasında sentetik SARS-CoV-2 RNA fragmanı içeren numuneler ile üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Reaksiyon sonuçları ve optimum grafikler aşağıda verilmiştir. TÜSEB DiaKit SARS-CoV-2 V01 RT-qPCR Tanı Kiti; mikrolitreye başına 1 (bir) kopya sayısını dahi tespit edebilmektedir.

9. TÜSEB DiaVnat Ekstraksiyon ve Transfer Tüpü ile hazırlanmış çözeltilerin reaksiyon sonuçları

Kopya sayısı/ μ L	Cq Değerleri		
	1	2	3
10^7	14.02	11.31	13.58
10^6	17.18	15.16	17.26
10^5	19.22	19.37	20.22
10^4	21.02	20.38	22.10
10^3	23.83	24.9	24.96
10^2	24.02	24.03	23.24
10^1	-	24.92	24.42
10^0	24.43	24.35	24.23

Tablo 5. TÜSEB DiaVnat Ekstraksiyon ve Transfer Tüpü ile hazırlanmış çözeltilerin reaksiyon sonuçları

10. TÜSEB DiaVnat Ekstraksiyon ve Transfer Tüpü ile hazırlanmış çözeltilerin reaksiyon sonuçları



Tablo 6. TÜSEB DiaVnat Ekstraksiyon ve Transfer Tüpü ile hazırlanmış çözeltilerin grafik görünüşleri