



SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kiti

MD-COVID19-04

RUO*

*SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kiti Yakın Doğu Üniversitesi, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti ile birlikte geliştirilmiştir.

Kit Tanımı

Şiddetli akut solunum sendromu ile seyreden COVID-19 hastalığına yol açan SARS-CoV-2 enfeksiyöz ajanının Dünya Sağlık Örgütü tarafından endişe-verici varyantlar (variants of concern, VoC) olarak sınıflandırılan Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) ve Delta (B.1.617.2) varyantlarının kalitatif olarak tespit edilmesi için tasarlanmıştır.

Kitin çalışma prensibi, SARS-CoV-2'ye ait nükleik asitten (RNA) tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi yapılarak SARS-CoV-2 VoC mutasyonlarına spesifik gen bölgelerini hedefleyen tek adımda ters transkripsiyon (RT) ve gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile varyant tespitlerinin gerçekleştirilmesine dayanmaktadır.

SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kit içeriğinde bulunan primer ve probler SARS-CoV-2 Spike (S) geni üzerinde bulunan varyant tanımlayıcı mutasyon bölgeleri, iç kontrol olarak ise korunmuş SARS-CoV-2 (2019-nCoV, yabancıl tip) N2 genine özgül olarak tasarlanmış ve iki farklı panel master mix (PM1 ve PM2) **Tablo 1**'de gösterilmiştir.

Tablo 1. SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kitinin içeriği ve farklı hacim seçenekleri aşağıda özetlenmektedir.

Tüp	Hedef S gen mutasyonu	Kanal	Test / Reaksiyon			
			100	200	500	1000
PM1	N501Y	FAM	1x 1,5 ml	2x 1,5 ml	5x 1,5 ml	10x 1,5 ml
	HV 69//70	HEX				
	N2	CY5				
PM2	T478K	FAM	1x 1,5 ml	2x 1,5 ml	5x 1,5 ml	10x 1,5 ml
	K417N	HEX				
	N2	CY5				
Pozitif Kontroller (PC1, PC2, PC3 ve PC4)			30 µl	40 µl	70 µl	140 µl
Negatif Kontrol (NC)						

PM1: Panel 1 master mix; PM2: Panel 2 master mix; Pozitif kontroller sırası ile PC1: SARS-CoV-2 Alfa varyant, PC2: SARS-CoV-2 Beta varyant; PC3: SARS-CoV-2 Gamma varyant; PC4: SARS-CoV-2 Delta varyant.

HibriGen Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme Sanayi ve Ticaret A.Ş.

MERKEZ: Barış Mahallesi Koşu Yolu Cad. No:26 / İç Kapı No: 39 Gebze / Kocaeli

ŞUBE: Tübitak MAM Teknoloji Serbest Bölge Şubesi Barış Mahallesi 5002 Sk. Yeni Tek. Binası A Blok 4 A/101 Gebze/ Kocaeli

Saklama Koşulu

SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kiti, -20°C'de saklanmalıdır.

Kitin Analitik Özellikleri

Kitin duyarlılık ve özgüllüğü 5607 SARS-CoV-2 RT-qPCR pozitif klinik örnek ile test edilmiştir. Kitin rölatif duyarlılık ve özgüllüğü % 99,75 olarak hesaplanmıştır.

Kitin dışlayıcılık testleri **Tablo 2'**de listelenmiş olan 26 farklı viral ve bakteriyel suş kullanılarak *in silico* teknikler ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kitinin *in silico* analizlerle dışladığı patojenler

Dışlanan Patojen	
Orthomyxoviridae	Pneumocystis jiroveci
Adenoviridae	Candida albicans Pseudomonas aeruginosa
Picornaviridae	Staphylococcus epidermis
Mycoplasma pneumoniae	Human parainfluenza 1-3 virus
Bordetella pertussis	Influenza B virus
Human metapneumovirus	SARS coronavirus
Enterovirus	MERS coronavirus
Haemophilus influenzae	Human coronavirus OC43
Legionella pneumophila	Human coronavirus HKU1
Streptococcus pyogenes	Human coronavirus NL63
Influenza A virus	Chlamydiae/Verrucomicrobia group

Kit ile kullanılabilen cihazlar

Kit, QIAGEN Rotor-Gene 5 Plex Real-Time PCR, Roche Light Cycler 480 ve HiMedia Q96 Plus Real-Time PCR cihazları ve uygun plastik sarf malzemeler ile validedir.

Klinik Örneklerin Taşınması

Sürüntü örnekleri HibriGen NAE Tamponu kullanılarak toplanmalı ve taşıma aşamasında başka bir yere aktarılmamalıdır. Örnekler laboratuvara gelene kadar +2-8 °C'de tutulmalıdır. Sürüntü örnekleri en fazla iki gün içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. HibriGen NAE Tamponu içerisindeki örnekler -70°C'de daha uzun süre saklanabilir. Örnekler için çok sayıda don-çöz işleminden kaçınılmalıdır.

Hibrigen Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme Sanayi ve Ticaret A.Ş

MERKEZ: Barış Mahallesi Koşu Yolu Cad. No:26 / İç Kapı No: 39 Gebze / Kocaeli

ŞUBE: Tübitak MAM Teknoloji Serbest Bölge Şubesi Barış Mahallesi 5002 Sk. Yeni Tek. Binası A Blok 4 A/101 Gebze/ Kocaeli

RT-qPCR Uygulama Protokolü

1. Hastadan alınmış sürüntü örneğinin içinde bulunduğu HibriGen NAE Tamponu içeren tüp 1 dakika vortekslenir.
2. SARS-CoV-2 varyant tespiti için sürüntü örneğinden izole edilen viral nükleik asit **Tablo 3**'te belirtilen miktarda kullanılır.

Tablo 3. SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kiti reaksiyon bileşenleri ve miktarları

İçerik	Miktar	Son konsantrasyon
PM1 / PM2	15 µl	1X
Viral nükleik asit / Kontrol	5 µl	
Toplam	20 µl	

3. Her bir hasta örneği için Panel 1 (PM1) ve Panel 2 (PM2) miksleri ile iki ayrı karışım olarak hazırlanır.
4. SARS-CoV-2 varyant tespiti için RT-qPCR uygulamasının termal döngü koşulları Tablo 4'e göre uygulanmalıdır.

Tablo 4. Termal döngü protokolü.

Tek Adım RT-qPCR Programı		
Döngü Sayısı	Isı	Süre
1	55°C	5:00
1	95°C	0:30
45	95°C	0:05
	60°C FAM /HEX/Cy5 okuma	0:20

Kontroller

SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kiti kontrollerinin beklenen sonuçları **Tablo 5**'te verilmiştir. Tablodakiler ile uyuşmayan kontrol sonuçları elde edildiği takdirde çalışma geçersiz sayılır ve tekrarlanır.

Tablo 5. SARS-CoV-2 RT-qPCR Tayin ve Varyant Tespit Kitine ait kontrollerden beklenen sonuçlar

Kontrol	Açıklama	Beklenen Sonuç	
NC	Negatif Kontrol	Ct yok	
PC1-PC4	Varyanta Özgü Pozitif Kontrol	FAM /HEX/Cy5 kanalında	Ct < 40 veya Ct yok

Ct: Döngü eşik değeri

HibriGen Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme Sanayi ve Ticaret A.Ş

MERKEZ: Barış Mahallesi Koşu Yolu Cad. No:26 / İç Kapı No: 39 Gebze / Kocaeli

ŞUBE: Tübitak MAM Teknoloji Serbest Bölge Şubesi Barış Mahallesi 5002 Sk. Yeni Tek. Binası A Blok 4 A/101 Gebze/ Kocaeli

Sonuçların Değerlendirilmesi

Her bir hasta için Panel 1 ve Panel 2 karışımlarından alınan sonuçlar birlikte değerlendirilmelidir. Döngü eşik değerini (Threshold, Ct, Cq) belirlemek için cihazın pozitif kontrol ışma değerine göre ayarladığı otomatik algoritmaları (auto-threshold) kullanılabilir. Insta Q96® Plus cihazları için threshold seviyesi 200 RFU'dur. Rotor-Gene® Q cihazında Ct hesaplamak için; "dynamic tube" etkin olmalı, "ignore first" seçeneği "0" olmalı, "slope correct" aktif, "outlier removal" seçeneği "0" olmalı ve threshold değeri 0.02-0.05 aralığında ayarlanmalıdır. Yorumlamaya geçilebilmesi için tüm kontroller **Tablo 5**'te belirtildiği şekilde doğru çalışmış olmalıdır.

Analiz yaparken amplifikasyon eğrilerinin şekilleri incelenmelidir. Ct değeri atanmış olan örneklerin eğrileri sigmoidal şekilde olmalıdır, sigmoidal olmayan eğriler tekrara alınmalıdır.

Tüm kontroller doğru şekilde çalışmış ve eğriler sigmoidal şekillerde ise; örnekler **Tablo 6**'da özetlendiği gibi değerlendirilir. Sonuçların analizi kullanılan cihaza bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Lütfen bilgi için cihazınızın kullanım kılavuzuna bakınız.

Tablo 6. Örneklerin SARS-CoV-2 varyant değerlendirilmesi

SARS-CoV-2 varyant tayini tablosu						
Panel	Gen Bölgesi/ Mutasyon	Kanal	ALFA	BETA	GAMMA	DELTA
PM1	N501Y	FAM	+	+	+	-
	HV 69//70	HEX	-	+	+	+
	N2	CY5	+	+	+	+
PM2	T478K	FAM	-	-	-	+
	K417N	HEX	+	-	+	+
	N2	CY5	+	+	+	+

Uyarı ve Önlemler

- ✓ Kimyasallarla çalışırken personel koruyucu ekipmanlar kullanılmalıdır (gözlük, eldiven, koruyucu giysiler vb. gibi).
- ✓ Kullanılmayan kimyasallar, atıklar ve örnekler ülke ya da bölgesel düzenlemelere uygun olarak ortadan kaldırılmalıdır.
- ✓ Ağızla pipetleme yapılmamalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kitler kullanılmamalıdır.
- ✓ Kimyasallar farklı lot numaraları ya da diğer üreticilerin kimyasalları ile karıştırılmamalıdır.
- ✓ Daha fazla güvenlik bilgisi için firmamızla iletişime geçiniz.

Sınırlamalar

Master mix yalnızca araştırma amacıyla ve *in vitro* kullanım için satılmaktadır. Kit performansı orozofarengal sürüntü, aspirat ve lavaj, bronkoalveolar lavaj ve balgam örnekleri ile izole edilen RNA örnekleri için test edilmiştir. Hasta semptom durumu ve enfeksiyon evresi yanlış negatif sonuçlara sebep olabilir. SARS-CoV-2 genomunda belirlenen primer ve problemlerin hedeflediği bölgelerde oluşacak mutasyonlar, bağlanmayı etkileyerek yanlış negatif sonuçlara sebep olabilir. Numune toplanması, taşınması, işlenmesi sırasında yapılan hatalar ve reaksiyonu inhibe edebilecek faktörler yanlış negatif sonuçlara sebep olabilir.

Hibrigen Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme Sanayi ve Ticaret A.Ş

MERKEZ: Barış Mahallesi Koşu Yolu Cad. No:26 / İç Kapı No: 39 Gebze / Kocaeli

ŞUBE: Tübitak MAM Teknoloji Serbest Bölge Şubesi Barış Mahallesi 5002 Sk. Yeni Tek. Binası A Blok 4 A/101 Gebze/ Kocaeli