

INOGene-SCoV-2 RT-qPCR Tanı Kiti



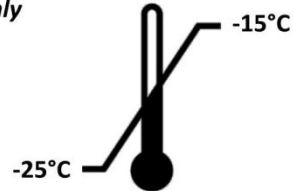
Kullanım Kılavuzu (Sadece Profesyonel kullanım içindir.)



For in Vitro Diagnostic Use Only



INOSCoV-2100
INOSCoV-2500



İnovia Yenilikçi Elektronik Teknolojileri San. ve Tic. Ltd. Şti.

Oruçreis Mahallesi, Giyimkent 7. Sokak, No.:115, 34235

Esenler, İstanbul - TURKEY

Tel.: +90 (212) 210 01 17

Email : info@inovia.com.tr

Fax : +90 (212) 210 01 18

Web : www.inovia.com.tr

İçindekiler

1. Kullanım Amacı	3
2. Prensip ve Ek Bilgiler	3
2.1 Numune Toplanması ve RT-qPCR Analizi ön hazırlıkları	3
2.2 RT-QPCR Analizi	4
2.3 TaqMan RT-qPCR Analizi	5
3. Kit İçeriği	5
4. Saklama ve kullanım	6
5. Materyaller	6
6. RT-qPCR Protokolü	6
7. RT-qPCR programının kurulması	7
8. Sonuç Analizi ve Yorumlama	7
8.1 Eşik Değerinin Ayarlanması	7
8.2 Sonuçların Analizi	8
8.3 Olası Problemler ve Çözüm Önerileri	9
9. Kit Özellikleri	9
10. KAYNAKÇA	11
11. Sembollerin Açıklaması	11

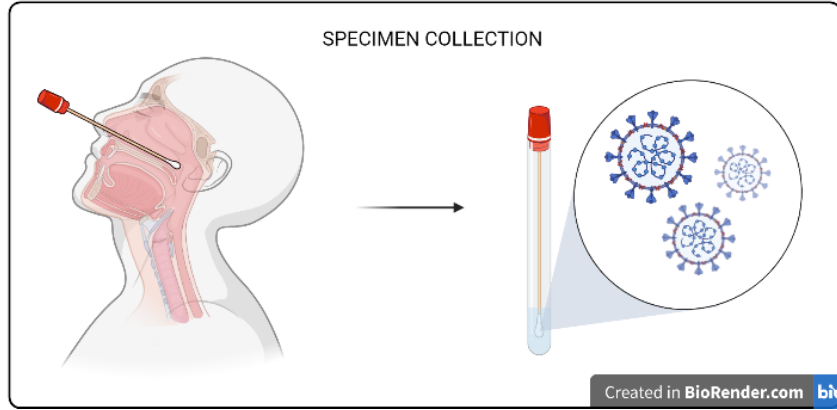
1. Kullanım Amacı

INOGene-SCoV2 RT-qPCR Tanı kiti, M-MLV Ters Transkriptaz, Taq Polimeraz enzimleri, Ribonükleaz inhibitör ve özellikle bu kit için dizayn edilmiş mutasyon riski en düşük bölgeleri hedefleyen (bu sayede varyantların hepsini tespit edebilen) oligonükleotidler sayesinde en düşük miktardaki RNA numunelerinde bile SARS-COV-2 Viral RNA'nın gerçek zamanlı tespitini yüksek verimle sağlamaktadır. Bu kit nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü, tükürük ve balgam örneklerinden RNA ekstraksiyonu yapılarak elde edilmiş numuneler ile analizi desteklemektedir.

2. Prensip ve Ek Bilgiler

2.1 Numune Toplanması ve RT-qPCR Analizi ön hazırlıkları

Dünya Sağlık Örgütü gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (rRT PCR) yoluyla CoV-2 RNA seviyesinin ölçülmesinde; ayaktan hastalarda nazofaringeal (NP), orofaringeal (OP) sürüntü gibi üst solunum yolu örneklerini, hastalığı daha şiddetli geçiren hastalarda ise balgam, endotrakeal aspirat veya bronkoalveolar lavaj gibi alt solunum yolu örneklerini önermektedir [1].

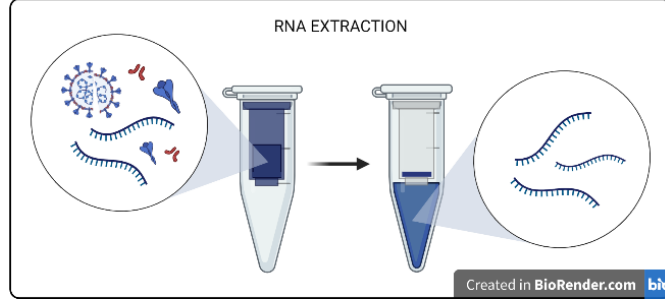


Numunenin analiz yapılacak tesise bozulmadan getirilmesi için bazı özel çözeltiler kullanılır. Bunlar:

- ✓ Virüs Taşıma ortamı (VTM)
- ✓ Viral RNA taşıma ortamı (VNAT)
- ✓ Evrensel taşıma ortamı (UTM)
- ✓ Fosfat tamponlu salin (PBS) veya Salin çözeltisi
- ✓ Steril nükleaz içermeyen su, olabilir.

Tesiste yapılacak ekstraksiyon yöntemine göre numune hazırlama süreci farklılık göstermektedir.

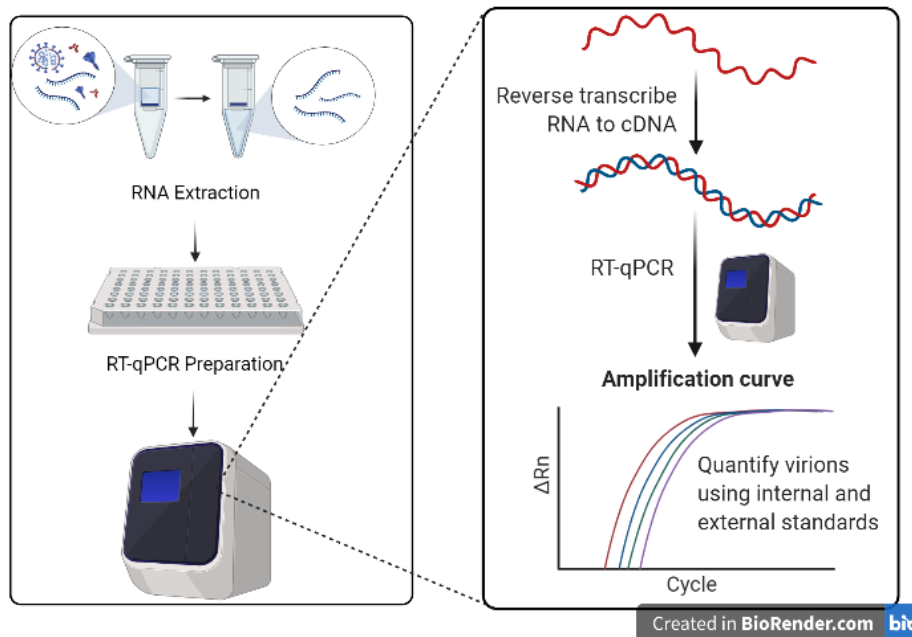
RNA ekstraksiyonu için ticari olarak ulaşılabilir RNA ekstraksiyon kitleri ile VNAT gibi hızlı RNA ekstraksiyon yapan ortamlar kullanılarak gerçekleştirilebilir. RT-qPCR analizi için nükleik asit ekstraksiyonu kullanılacak yöntemin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilir. Elde edilen RNA numuneleri analizde kullanılmak üzere kısa süreli kullanım için 2-8 °C'de, uzun süreli kullanım için -20 °C'de saklanmalıdır.



2.2 RT-QPCR Analizi

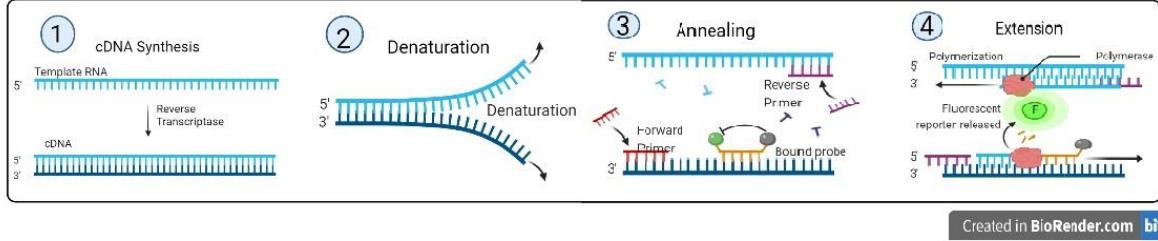
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), deoksiribonükleik asidin (DNA) amplifikasyonu ve tespiti için kullanılan oldukça hassas ve spesifik bir yöntemdir. Kavramsal basitliği, onu moleküler biyolojide en yaygın kullanılan teknik haline getirmiştir ve teoride, tek bir DNA kopyasını dahi tespit edebilir. Bu nedenle, çok çeşitli bakteriyel, fungal, viral ve parazit patojenleri için bir tanı testi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, koronavirüslerin genomu DNA'dan ziyade ribonükleik asitten (RNA) oluşur. RNA, DNA'ya benzer olsa da, DNA amplifikasyonu için kullanılan standart enzim olan Taq polimerazın onu çok verimsiz bir şekilde kopyalamasından dolayı sonuç tatmin edici olmaz. Bu sebeple, RNA, PCR testinin ters transkripsiyon (RT)-PCR olarak adlandırılan bir çeşidi tarafından saptanır. RT-PCR, tipik olarak iki enzim içeren iki aşamalı bir yöntemi kapsar; ilk adım, RNA'yı DNA'ya (cDNA) kopyalamak için ters transkriptaz olarak da bilinen RNA'ya bağlı bir DNA polimerazı kullanırken, ikinci adım standart bir PCR testinde olduğu gibi cDNA'yı çoğaltan Taq polimerazın kullanımıyla amplifikasyon işlemini içerir[2].

Tanı amacıyla, RT ve PCR reaksiyonlarını tek bir test tüpünde yürütmek en uygunu iken; araştırma kullanımı için, iki adım genellikle ayrı tüplerde gerçekleştirilir. Çoğu tanı testi, floresan bazlı kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) olarak adlandırılan RT-PCR testinin belirli bir sürümünü kullanır [2].



2.3 TaqMan RT-qPCR Analizi

TaqMan qPCR olarak da bilinen 5' nükleaz veya hidroliz problemlerini kullanan gerçek zamanlı PCR, yaşam biliminin çeşitli alanlarında kullanılan önemli ve güçlü bir araçtır. Ayrıca, TaqMan qPCR'nin insan, hayvan veya bitki örneklerinde birçok viral veya bakteriyel patojenin tespiti için genellikle birinci basamak tarama yöntemi olduğu tanısal mikrobiyolojide büyük potansiyele sahiptir.



TaqMan qPCR, bir çift primer ve genişletilemez bir prob kullanır. Prob, primerler tarafından sınırlanan bölge içinde bağlanan kısa, diziyeye özgü bir oligonükleotittir. Probun bir ucu, genellikle 5' ucu, bir floresan boya kullanılarak etiketlenirken diğer ucu, 3' ucu, bir söndürücü ile etiketlenir. Amplifikasyon ilerledikçe, TaqMan probu, primerlerden birinin aşağı akış hedefi üzerindeki diziyeye hibritleşir. Bu iki oligonükleotid, etkili bir birim oluşturur. Yukarı akış primeri uzamaya başladığında, probun Taq polimeraz aracılı 5'→3' hidrolizi gerçekleşir, bu da söndürücü ve floresan boya tarafından oluşturulan çiftin bozulmasına yol açar. Reaksiyon tüpündeki ışınlama, boyaya özgü dalga boyu ile saptanabilir floresan ile sonuçlanır. Yayılan floresan sinyali, amplifiye edilmiş PCR ürününün miktarı ile orantılıdır.[3].

3. Kit İçeriği

Kit, iki farklı paket boyutunda 100 ve 500 reaksiyon olarak bulunur. Tablo 1, her iki paketin içindeki bileşenlerini listeler.

Tablo 1 Inovia Covid19 RT-qPCR Kit İçeriği

Reaktifler	100 reaksiyon	100 rxn Tüpler	500 reaksiyon	500 rxn Tüpler
Reaction Mix (Taq Polimeraz, RT, RI, Tampon çözelti)	1050 ul	1.5 ml test tüpü	5250 ul	5x1.5 ml test tüpü
Primer Probe Mix (E, RdRp ve Rnase P kontrolü için özel olarak sentezlenmiş oligonükleotidler)	325 ul	0.5 ml test tüpü	1550 ul	2 ml test tüpü
Negative Control (Nükleaz içermeyen distile su)	400 ul	0.5 ml test tüpü	1650 ul	2 ml test tüpü
Positive Control (Viral gen bölgelerini içeren plasmid karışımı)	40 ul	0.5 ml test tüpü	200 ul	0.5 ml test tüpü

Kit, SARS-COV-2 kontrolleri olarak E ve RdRp genlerini ve dahili kontrol olarak Rnase P genini hedeflemek için Tablo 2'de de görüldüğü şekilde raporör floroforlar kullanır.

Tablo 2 Hedef gen ve boyaları

HEDEF GEN	FLOROFOR
<i>E Geni</i>	<i>CY5 (Kırmızı)</i>
<i>RdRp Geni</i>	<i>FAM (yeşil)</i>
<i>İç kontrol (Rnase P geni)</i>	<i>HEX (Sarı)</i>

4. Saklama ve kullanım

- ✓ Kit kullanıcıya kuru buzla birlikte gönderilir.
- ✓ Kitin tüm elemanları -15 ile -25 °C arasında saklanmalıdır. Dondurma çözündürme çok sık yapılacaksa alikotlama önerilir.
- ✓ Ürünün son kullanma tarihi kutu ve tüplerin üzerinde belirtilmiştir. Uygun koşullarda saklandığı sürece son kullanım tarihine kadar sorunsuz şekilde kullanılabilir.
- ✓ Özellikle Primer-probe mix ışığa maruz bırakılmamalıdır.

5. Materyaller

- 0.1-0.2 ml beyaz ya da şeffaf PCR tüpleri
- PCR Optik kapak, film veya membran
- Steril nükleaz-free filtreli pipet uçları
- Mikropipet
- Vortex
- Mini santrifüj

6. RT-qPCR Protokolü

1. QPCR cihazında reaksiyon kurulumu kullanılan cihaza uygun program seçilerek yapılır.
2. Reaksiyon hazırlığı yapılacak ortam gerekli sterilizasyon işlemleri yapılarak kullanıma uygun hale getirilir.
3. Reaktifler Buz üzerinde çözüldükten sonra hafifçe vortekslenip kısaca santrifüjlenir ve yine buz üzerine alınır.
4. Yapılacak test sayısına göre master mix 3 nolu tabloda belirtilen miktarlara göre hazırlanır.

Tablo 3 Reaksiyonda Kullanılacak Reaktif Miktarları Tablosu

Reaksiyonda kullanılan reaktifler	1 reaksiyon
Reaction Mix (Taq Polymeraz, RT, RI, tampon çözelti)	10 ul
Primer-Probe Mix (Primer ve Problar E, RDRP ve Rnase P)	3 ul
Nuclease-free water	3 ul
Toplam hacim	16 ul

5. Daha önceden hazırlanmış PCR tüplerine ya da 96 kuyucuklu tabaklara master mix 16 ul olacak şekilde kuyucuklara dağıtılır.
6. Hasta numuneleri, negatif ve/veya pozitif kontrol de 4 ul olacak şekilde kuyucuklara yüklenir.
*Her analizde kontaminasyon araştırması için mutlaka bir negatif kontrole de yer verilmelidir. Ayrıca Sonuçların doğruluğundan şüphe duyulduğunda pozitif kontrol kullanarak enzim aktivitesi veya primer-probeların çalışması kontrol edilebilir.
7. Tüpler veya 96 kuyucuklu tabaklar, kapak veya film kullanarak iyice kapatılır ve cihaza yerleştirilir.
8. Yazılımda program çalıştırılır ve sonuçların çıkması beklenir.

7. RT-qPCR programının kurulması

Kit, Bio Rad CFX96, Roche Lightcycler 480 ve Inovialab Genx-4'te optimize edilmiştir. Program Tablo 4'te gösterildiği gibi ayarlanabilir. Program cihaza bağlı olarak 45-55 dakika sürer. CDNA sentezi ve Taq polimeraz aktivasyon aşamaları her bir döngü alırken, amplifikasyon segmentinin iki aşaması 40 döngü alır. Cihazlarda amplifikasyonun ikinci aşaması (60 °C, 10 s), veri toplamanın gerçekleşmesi için End Point Only Runs (BioRAD, CFX96), Quantification (Roche, LC480) ve End point (Inovialab, Genx-4) olarak ayarlanmalıdır.

Tablo 4 RT-qPCR programı

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Döngü
cDNA sentezi	48 °C	5 dk	1 döngü
Taq polimeraz aktivasyonu	95 °C	2 dk	1 döngü
Amplifikasyon	95 °C	5 s	40 döngü
	60 °C	10 s	

8. Sonuç Analizi ve Yorumlama

8.1 Eşik Değerinin Ayarlanması

Eşik değerini ayarlarken her çalışmada bir NTC kuyusu ekleyip Rnase P için eşik değerini NTC'de Ct vermeyecek şekilde ayarladıktan sonra hasta numunelerinde Rnase P Ct değerleri kontrol edilir eğer sonuçlar pozitif ise RNA ekstraksiyonu başarılı kabul edilip diğer genler için Ctler kontrol edilir. Eğer hasta numunelerinde Rnase P pozitif sonuç vermezse çalışmada kontaminasyon olabilir ya da RNA ekstraksiyonu başarılı değildir. Test yeni bir NTC ile tekrar denir. Genler için pozitif kabul edilen Ct değerleri Tablo 5'teki gibidir.

Tablo 5 Genler için pozitif kabul edilen Ct değerleri

Gen	Florofor	Ct değeri	Sonuç
RDRP	FAM	<36	Pozitif (+)
		≥36	Negatif (-)
E	CY5	<36	Pozitif (+)
		≥36	Negatif (-)
RNASE P	HEX	<28	Pozitif (+)
		≥28	Negatif (-)

8.2 Sonuçların Analizi

Sonuçlar analiz edilirken öncelikle Rnase P iç kontrolünün eşik değerinin doğru ayarlanması gerekir. RNA ekstraksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği ve kontaminasyon tespit edilmediyse E ve RDRP genlerinin pozitif-negatiflik durumları kontrol edilir ve aşağıdaki tabloya göre sonuçlar analiz edilir.

Tablo 6 Analizi yapılabilecek olası sonuçlar

	E geni(CY5)	RdRp geni(FAM)	Rnase p (IC)(HEX)	Analiz sonucu
Sonuç 1	+	+	-	Kovid Pozitif
Sonuç 2	+	+	+	Kovid Pozitif
Sonuç 3	-	+	+	Kovid Pozitif
Sonuç 4	+	-	+	Kovid Pozitif
Sonuç 5	-	-	+	Kovid negatif
Sonuç 6	-	-	-	Geçersiz (Tekrar)

8.3 Olası Problemler ve Çözüm Önerileri

Tablo 7 analiz sırasında ortaya çıkabilecek problemleri ve bunlara yönelik çözüm önerilerini içermektedir.

Tablo 7 Olası problem ve çözümleri

Problem	Olası Sebepleri	Önerilen Çözümler
Sinyal yok	Yazılımda Rt-qPCR programının yanlış ayarlanması.	Program kontrol edilerek test tekrar edilir.
	Yanlış boya veya kuyucuk seçimi.	Program kontrol edilerek test tekrar edilir.
	Reaktifler doğru şekilde yüklenmemiş olabilir. (Kit elemanlarının kuyucuğa eklenmemesi vb.)	Test tekrar edilir.
	Kitin son kullanma tarihinin geçmesi, yanlış koşullarda saklanması ya da çok fazla dondurma çözündürme sonrası enzim aktivitesinin düşmesi vb.	Son kullanma tarihi ve dondurma çözündürme sayısı kontrol edilir. Gerekirse yeni kit ile test tekrar edilir.
	Reaksiyonda inhibitör bulunması.	RNA ekstraksiyonu ve RT-qPCR analizi tekrar edilir.
	Rna ekstraksiyonunun başarılı şekilde gerçekleşmemiş ve yeterli miktarda RNA bulunmuyor olabilir ya da kuyucuğa numune eklenmemiş olabilir.	RNA numunesi kontrol edilir eğer yeterli miktarda RNA yoksa hastadan yeni örnek alınır, önce ekstraksiyon daha sonra Rt-qPCR analizi tekrar edilir.
NTC'de sinyal var	Kontaminasyon olabilir.	Test yeni sarf malzemelerle tekrar edilir. Yine kontaminasyonla karşılaşılması durumunda reaktifler yenileriyle değiştirilerek test tekrar edilir.

9. Kit Özellikleri

Kit optimizasyonu, SARS-COV-2 genlerini içeren tasarlanmış plazmidler kullanılarak gerçekleştirildi. Pozitif numunedeki kopya sayısına bağlı olarak analiz sonuçlarının değerlendirilmesi yapılmış ve sonuçlar Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8 Farklı sayıda kopya içeren Pozitif kontrollerle yapılan Rt-qPCR analizleri

	Pozitif Kontrol #Kopya/Reaksiyon	Analiz Sonuçları	
		Positive	Negatif
Numune 1	50,1*10 ³	20/20	0/20
Numune 2	50,1*10 ²	20/20	0/20
Numune 3	50,1*10 ¹	20/20	0/20
Numune 4	50,1*10 ⁰	20/20	0/20

Kit, piyasadaki başka bir kit ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9 Karşılaştırmalı analiz sonuçları

		Piyasadaki Diğer Kit		
		Pozitif	Negatif	Toplam
INOGene-SCoV-2 RT-qPCR Tanı Kiti	Pozitif	78	0	78
	Negatif	1	16	17
	Toplam	79	16	105

Kullanılan dizilerin yanlış pozitif verme ihtimali in siliko analizlerle araştırılmıştır ve sonuç olarak benzer semptomlara yol açan organizmaların Covid-19 testine yanlış pozitif verme ihtimali bulunmadığı gözlenmiştir. Diziler Sars-Cov-2 genomu hariç bir organizmada bulunmamaktadır.

Tablo 10 In siliko analiz sonuçları.

No	Organizma	E geni	RdRp geni
1	Homo sapiens (taxid:9606)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
2	Influenza A (taxid:11320)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
3	Influenza B (taxid:11520)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
4	Middle east respiratory syndrome (taxid:1335626)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
5	Human respiratory syncytial virus (taxid:11250)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
6	Human rhinovirus A (taxid:147711)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
7	Human adenovirus B (taxid:108098)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
8	Human bocavirus (taxid:573977)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
9	Epstein barr virus (taxid:10376)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
10	Mycoplasma (taxid:2093)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
11	Mycobacteria (taxid:85007)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
12	Streptococcus (taxid:1301)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
13	Streptococcus pyogenes (taxid:1314)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
14	Legionella (taxid:445)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
15	Bordetella pertussis (taxid:520)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.
16	Pneumocystis jirovecii (taxid:42068)	Dizi bulunamadı.	Dizi bulunamadı.




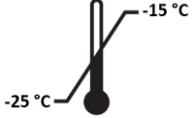




10. KAYNAKÇA

[1] Harikrishnan, Pandurangan. "Saliva as a potential diagnostic specimen for COVID-19 testing." *The Journal of craniofacial surgery* (2020).

[2] Bustin, Stephen A., and Tania Nolan. "RT-qPCR testing of SARS-CoV-2: a primer." *International journal of molecular sciences* 21.8 (2020): 3004.

[3] Nagy, A., Vitásková, E., Černíková, L. et al. Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Sci Rep* 7, 41392 (2017) <https://doi.org/10.1038/srep41392>

11. Sembollerin Açıklaması

	Referans/Katalog numarası		Son kullanma tarihi
	Seri numarası		Saklama koşulları
	In vitro tanı için Avrupa Uygunluk beyanı		Işığa maruz bırakmayın!
	Paket içeriği		Üretici