



# SARS CoV-2 RT-qPCR Kit



For in vitro diagnostic use only.  
For laboratory and professional use only.

Cat. No: CV-RT-DBL-v1-100  
CV-RT-DBL-v1-250

Manual Version: 040121-1  
Approval Date for Use: 04.01.2021

**Tablo 1. Kit İçeriği**

Saklama: -20°C, Transfer: +2-8°C			
Kit İçeriği	Miktar (10 µL Reaksiyon)		Birim Tüketim
	100 Rxns	250 Rxns	
CVD Tri Oligo Mix: <ul style="list-style-type: none"><li>SARS-CoV-2 Hedef (Orf1 ab N ve E) (FAM)</li><li>İç Kontrol (IC) (RNase P) (HEX)</li></ul>	1 x 250 µL	1 x 625 µL	2.5 µL
2X Prime Script Mix: <ul style="list-style-type: none"><li>DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu, Ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitör</li></ul>	1 x 500 µL	1 x 1250 µL	5 µL
Saklama: +2-8°C/-20°C, Transfer: +2-8°C/-20°C, Çözdükten sonra: 2-8°C			
NTC: <ul style="list-style-type: none"><li>Negatif Kontrol (No-template)</li></ul> <b>Kontaminasyon kontrolü için her çalışmada test edin</b>	1 x 1000 µL	1 x 1000 µL	2.5 µL
PC-CVD Tri: <ul style="list-style-type: none"><li>Pozitif Kontrol</li></ul> <b>Kontaminasyon kontrolü için her çalışmada test edin</b>	1 x 250 µL	1 x 250 µL	2.5 µL
<b>Kit içeriğine dahil olmayan gerekli ekipmanlar</b>			
<b>1)</b> Real-Time PCR Cihazı: FAM/HEX kanallı, Ramp rate $\geq 3$ °C/sec. <b>2)</b> 1-10 µL, 10-100 µL ve 100-1000 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve RNaz içermeyen) <b>3)</b> 1.5 or 2 mL mikrosantrifüj tüpü <b>4)</b> PCR cihazına uyumlu reaksiyon tüpleri, kapakları, plate sealı <b>5)</b> Nükleaz-içermeyen su / Viral Taşıma Besiyeri / Serum fizyolojik	<b>6)</b> Vorteks <b>7)</b> Spin Santrifüj: min. 3000 rpm <b>8)</b> PCR kurulumu için UV kabini <b>9)</b> Soğuk Tüp standı (Microsantrifüj ve PCR tüpleri için) <b>10)</b> Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven.		

## Kullanım Amacı ve Çalışma Prensibi

Laborant SARS CoV-2 RT-qPCR Kit, COVID-19 hastalığına yol açan 2019-nCoV virüsünün tespitinde kullanılmaktadır. **Kit ile RT-qPCR sonucu 34 dakikada elde edilebilmektedir.** Çalışma materyali, nazofaringeal aspirat/lavaj, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü ve balgam örneklerinden elde edilen nükleik asit izolatlarıdır. 2019-nCoV virüsünün ORF1ab, N ve E gen bölgelerini tek adımda ters transkripsiyon (RT) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) (RT-qPCR) ile tespit eder. İnsan RNase P geni ise, örnek alımı, nükleik asit izolasyonu ve reaksiyon engelleyici olası problemlerin tespiti amacıyla iç kontrol için çoğaltılır.

## Analitik Özellikler

Kit; RINA™ M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Sistemi (Robot Kat No: RINA-M14-01; Sarf malzemeleri Kat No: RN-NA-14-111-100) ve vNAT™ Ekstraksiyon Sarfları (vNAT™ Viral Nükleik Asit Tamponu Kat No: BS-NA-510; vNAT™ Transfer Tüp Kat No: BS-NA-513-100) ile validedir. Kit Himedia Insta Q96, Roche LightCycler® 96, Bio-Rad CFX96 Touch™, Bio Molecular Systems Magnetic

Induction Cycler (MIC), Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex Real-Time PCR sistemlerinde 10 µL ve 20 µL qPCR reaksiyon hacimleri için valide edilmiştir. Kitin LOD değeri, tüm kit versiyonları için 5.6 SARS CoV-2 genomu/reaksiyondur. Kitin dışlayıcılık testleri 40 farklı viral ve bakteriyel suş kullanılarak ve 20 farklı kişiden elde edilen nazal yıkama sıvılarıyla hazırlanan havuz örneği kullanılarak hem laboratuvar da hem de *in-siliko* olarak test edilmiştir. Kit diğer solunum yolu patojenleri ve insan solunum yolu mikrobiyal florası ile çapraz reaksiyon vermemektedir. *In-siliko* testler kitin bazı yarasa ilişkili SARS-CoV suşlarıyla çapraz reaksiyon verdiğini göstermiştir.

Kitin duyarlılık ve özgüllüğü; SARS-CoV-2'yi hedefleyen FDA onaylı RT-qPCR test kitine göre arşivlenmiş 357 pozitif ve 94 negatif klinik örnek üzerinde test edilmiştir. Kitin rölatif duyarlılık ve özgüllüğü, tüm kit versiyonları için %97.3 ve %100 olarak belirlenmiştir.

## Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması

Sürüntü örnekleri dactron veya polyester swablar kullanılarak toplanmalıdır. Diğer örnek türleri ise steril kaplar ile transfer edilmelidir. Taşıma aşamasında viral taşıma besiyeri (VTM) (Preparation of viral transport medium, Centers for Disease Control and Prevention, SOP#: DSR-052-01) vNAT Viral Transfer Tüpü (Kat No:BS-NA-513-100) kullanılmalıdır. Örnekler laboratuvara gelene kadar +2-8°C saklanmalı ve taşınmalıdır. Sürüntü örnekleri 5 gün içerisinde, diğer örnek türleri ise 2 gün içerisinde transfer edilmelidir. Gönderide bir gecikme bekleniyorsa, VTM ile gelen örnekler -70°C'de dondurulmalı ve kuru buz ile gönderimi yapılmalıdır. vNAT ile gelen örnekler +2-8 °C saklanmalıdır. Örnekler sürekli don-çöze maruz kalmamalıdır. Bunların yanı sıra;

- Kit, nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampikonlarından uzak bir yerde muhafaza edilmelidir.
- Kit içeriğindeki bileşenler farklı lot numaralı bileşenler ile ya da aynı isimli fakat farklı üreticilere ait kimyasal maddeler ile karıştırılmamalıdır.
- Ana stok reaktifler PCR kurulumu sırasında, mümkünse soğuk blok üzerinde bekletilmelidir ve PCR kurulumu mümkünse soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmelidir.
- Kit bileşenleri kullanım öncesinde hafifçe çalkalanarak karıştırılmalıdır.
- qPCR mikserleri ve kalıp nükleik asitleri pipetlemek için kullanılan mikropipetler ayrı olmalıdır.
- Kalıp nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri, sıvı transferleri dışında sürekli kapalı tutulmalıdır.
- Analizin gerçekleştirildiği odalar, tezgahlar ve cihazların silinebilir yüzeyleri düzenli olarak %10'luk NaClO ile temizlenmelidir.
- qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüpleri laboratuvar da açılmadan bertaraf edilmelidir.

## Çalışma Protokolü

Teste başlamadan önce lütfen aşağıdakileri göz önünde bulundurun:

- Kit, sadece toplam qPCR hacminin %25'i kadar olan template nükleik asit hacmi için valide edilmiştir.
- Kit, periyodik bakım kayıtları olmayan gerçek zamanlı PCR cihazlarıyla kullanılmamalıdır.
- Bio-Rad CFX96 Touch™ cihazında analiz için hem beyaz hem de şeffaf renkli 0.1 mL'lik qPCR strip/plateleri kullanılabilir. Beyaz renkli strip/plate kullanılarak daha iyi bir performans elde edilebilmektedir.
- Roche LightCycler® 96 cihazında analiz için sadece beyaz 0.1 mL'lik qPCR strip/plateleri kullanılabilir.
- Qiagen Rotor-Gene® cihazında test için 0.1 mL ve 0.2 mL'lik şeffaf qPCR tüpleri kullanılabilir. 0.1 mL'lik şeffaf tüplerin kullanılarak daha iyi bir performans elde edilebilir.
- BMS MIC qPCR cihazında, cihaza özgü reaksiyon stripleri kullanılmaktadır. qPCR cihazını aşağıda belirtilen şekilde programlayınız ve reaktifleri aşağıda belirtilen sırasıyla qPCR tüplerine ekleyiniz, tüpleri kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve işletimi başlatınız (Tablo 2).

qPCR cihazını aşağıda belirtilen şekilde programlayınız ve reaktifleri qPCR tüplerine aşağıda belirtildiği sırasıyla ekleyiniz, tüpleri kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve işletimi başlatınız (Tablo 2).

**Tablo 2.** qPCR Reaksiyon Şartları

Reaksiyon Kurulumu			qPCR Programı		
Bileşen	Reaksiyon		Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2X Prime Script Mix	5 µL	10 µL	1	52°C	1 dk
CVD Tri Oligo Mix	2.5 µL	5 µL	1	95°C	10 sn
			40	95°C	1 sn
Kalıp Nükleik Asit	2.5 µL	5 µL		55°C	1 sn
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 µL	20 µL		FAM/HEX Okuma	

## Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold seviyesi Bio-Rad CFX96 Touch™ için 200 RFU, Roche LightCycler® 96 için 0.05 EPF'ye ayarlanmalıdır. QIAGEN Rotor-Gene® cihazlarında çoğalma eğrilerinin sigmoidallığı "Raw Data" ekranından değerlendirilmelidir. Rotor-Gene® cihazlarında sigmoidal eğrilerin Ct değerlerini görmek için; analiz ekranında "Dynamic Tube" aktif, "Slope Correct" seçenekleri pasif olmalı, "Outlier Removal" seçeneği "0" olmalı, threshold seviyesi 0.02'ye ayarlanmalıdır. BMS MIC qPCR için "Non-Assay Green/Parameters/Dynamic" seçenekleri seçilmeli, auto-threshold ayarı aktif olmalıdır. FAM/HEX kanallarında elde edilen çoğalma eğrilerinin şekli incelenir. Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak kaydedilir. Bir örneğe cihaz tarafından Cq değeri atanmış ama eğri sigmoidal değilse, sonuç negatif olarak kaydedilmelidir. Cq<38 ise Pozitif olarak sonuçlar kaydedilir ve analiz sonucu Tablo 3'e göre yorumlanır. Negatif kontrolde sigmoidal eğri yok ve örnek Cq≥38 ise -20°C'ye kaldırılan nükleik asit ekstraktı tekrar analiz edilmeli, ikinci analizde de Cq≥38 ise bu kişiden tekrar örnek istenmeli ve analiz tekrarlanmalıdır.

**Tablo 3.** Sonuçların Yorumlanması

	NA İzolatı		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		Yorum
	Hedef	IC	Hedef	IC	Hedef	IC	
<b>Durum 1</b>	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Pozitif
<b>Durum 2</b>	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg	Hedef Pozitif: Örnek pozitif sonuç verdiği için kitin çalıştığı sonucuna varılır, hasta sonucu rapor edilir. Pozitif kontrolde sorunun devam etmesi durumunda, üretici ile irtibata geçip, yeni bir pozitif kontrol talep edilir.
<b>Durum 3</b>	Poz	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Pozitif
<b>Durum 4</b>	Neg	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Negatif
<b>Durum 5</b>	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Kontaminasyon Problemi: Uyarılar bölümündeki hususlara dikkat edilerek deney tekrarlanır.
<b>Durum 6</b>	Neg	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Hedef Negatif: Hedef negatif çıktığı için kontaminasyon problemi yoktur. Kit içeriği ile birlikte sağlanan ve negatif kontrol örneğine eklenen NTC kontamine olmuş olabilir. Sorunun devam etmesi durumunda, üretici ile irtibata geçip, yeni bir negatif kontrol talep edilir.
<b>Durum 7</b>	Neg	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	Örneklem/Ekstraksiyon/İnhibisyon Problemi: Nükleik asit izolatu 1/10 seyreltilip, deney tekrarlanır. Seyreltilen örnek HEX kanalında pozitif sonuç vermezse yeni örnek istenir.
<b>Durum 8</b>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Reaktif Problemi: Üretici ile irtibata geçilerek, reaktifler yenilenir ve reaksiyon tekrarlanır.
<b>Durum 9</b>	Neg	Poz	Poz	Poz	Neg	Poz	Eğer negatif kontrol reaksiyonundaki IC Cq değeri, NA izolatından elde edilen IC Cq değerinden 3 döngü veya daha yüksekse, sonuç değerlendirilir, negatif olarak rapor edilir. Aksi takdirde, örneklem, ekstraksiyon inhibisyon problemi sonucuna varılır.
<b>Durum 10</b>	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Poz	Hedef Pozitif: Negatif kontrolde hedef negatif, NA izolatında hedef pozitif olduğu için, IC'deki kontaminasyon göz önüne alınmadan, örnek pozitif olarak rapor edilir.

## Sınırlamalar

- Laborant SARS CoV-2 RT-qPCR Kiti'nin performansı sadece nazofaringeal sürüntü, orofaringeal (boğaz) sürüntü, nazofaringeal aspirat veya lavaj, bronkoalveoler lavaj ve balgam örnekleri için belirlenmiştir.
- Laborant SARS CoV-2 RT-qPCR Kiti'nin hedeflediği bölge içindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyerek virüs varlığının saptanamamasına neden olabilir.
- Numune toplanması, taşınması veya işlenmesi sırasında yapılan hatalar, yanlış negatif sonuçlara yol açabilir.
- İnhibitörler veya diğer dış etkenler yanlış negatif sonuç alınmasına neden olabilir. Düşük viral yük durumunda da yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir.
- Çalışma sonuçları hasta faktörlerinden (örn. semptomların varlığı) ve/veya enfeksiyon evresinden etkilenebilir.
- *İn-siliko* testler, kitin SARS-CoV-2 dışındaki bazı SARS-CoV suşlarıyla çapraz reaksiyon verebileceğini göstermiştir.