

Sars-Cov-2 Triple Gene Fast RT-qPCR Tespit Kiti

Katalog No: MLGN0003-500

Kitin İçeriği

Kapak Rengi	Bileşen	Miktar
Kırmızı ●	2x Enzim Mix (5 adet)	500 µl
Mavi ●	Triple Gene Mix (5 adet)	250 µl
Beyaz ○	NTC- (2 adet)	50 µl
Sarı ●	PC-Pozitif Kontrol- (2 adet)	50 µl

Kullanıcı Tarafından Temin Edilmesi Gereken Malzemeler

Ayarlanabilir pipetler ve steril pipet uçları, 1.5 mL mikrosantrifüj tüpleri, tek kullanımlık (pudrasız) eldiven, santrifüj, vorteks, ısıtıcı blok, soğuk tüp standı ve Thermocycler cihazı kullanıcı tarafından temin edilmelidir.

Kitin Kullanım Amacı

SARS-CoV-2, ilk olarak 2019 yılında Çin'in Wuhan kentinde tespit edilmiş bir virüs olup Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)'a sebep olmaktadır. Fast-R SARS-CoV-2 Kit ile swab kullanılarak alınan nazofaringal veya orofaringal sürüntüler ve tükürükten alınan numunelerdeki viral nükleik asitler tespit edilebilmektedir.

Çalışma Prensipleri

Test kiti, ters transkriptaz enzimini kullanarak viral RNA'yı komplementer DNA'ya çevirir (RT-PCR) ve elde edilen DNA ile doğrudan gerçek zamanlı PCR (qPCR) reaksiyonuna girerek tek adımda sonuç vermektedir.

Bu test kiti içerisinde SARS-CoV-2 virüsünü tespit etmek üzere Orf1ab, N ve E gen parçalarını hedefleyen, her biri FAM boyası içeren 3 primer-prob ve buna ek olarak insan genomuna ait Ribonükleaz P (RP) gen parçasını hedefleyen HEX boyası içeren 1 primer-prob bulunmaktadır. Test kiti, 3 farklı gen bölgesini hedef alarak yüksek hassasiyeti garanti altına almaktadır.

RNA İzolasyonu veya Ekstraksiyonu

Başarılı bir test için çalışma öncesinde RNA izolasyonu veya ekstraksiyonu yapılması şarttır. Kit, kullanılan tüm guanidyum tiyosiyanat içeren, viral transfer solüsyonları ile doğrudan doğruya qPCR çalışmaları ile uyumludur.

Başarılı bir tükürük numunesi toplanması ve çalışılması için aşağıdaki adımlar izlenebilir:

- 1) Tükürük toplanmadan önce hastanın en az 30 dk öncesinde yiyecek veya içecek tüketmemiş olması ve ağzını temizlemiş olması gereklidir. Toplanan materyalde balgam bulunmamalıdır.
- 2) Numuneler steril, uygun ağız genişliğine sahip tüplerde toplanmalıdır. Taşınırken +4 °C sıcaklıkta muhafaza edilip 6 saat içerisinde çalışılmalıdır.
- 3) Laboratuvarında çalışmadan önce numuneler 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 200 µl olacak şekilde aktarılmalıdır.
- 4) Ekstra güvenlik sağlamak için, numuneler 95 °C sıcaklıkta önceden ısıtılmış ısıtıcı blok içerisinde 5 dakika bekletilebilir. Kapakların sıcaklık ile açılması engellenmeli, koruyucu gözlük ve maske, bulaşı engellemek açısından bu aşamada mutlaka takılmalıdır.
- 5) Numuneler mümkünse buz üzerinde soğutulmalı ve kapakları açılmadan önce kısa santrifüj uygulanarak kapaklar tükürük ve buhardan arındırılmalıdır. Bu aşamadan sonra numuneler çalışmaya hazırdır.

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon karışımı aşağıda bulunan bilgiler ışığında hesaplanmalıdır. Pipetleme hatalarının önüne geçmek adına 25 kuyucuk için +1 ek reaksiyon hazırlanmalıdır.

Bileşen	Miktar
2x Enzim Mix	5 µl
Triple Gene Mix	2.5 µl
Numune	2.5 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 µl

Bileşen	25 Numune için 26 Reaksiyon	50 Numune için 52 Reaksiyon	96 Numune için 100 Reaksiyon
Enzim	130 µl	260 µl	500 µl
Triple Gene Mix	65 µl	130 µl	250 µl
Toplam	195 µl	390 µl	750 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı, qPCR için cihaza uygun platalere veya striplere kuyucuk başına 7.5 µl olacak şekilde dağıtılmalıdır. Karışımın dağıtım aşamasında tek bir filtreli pipet ucu kullanılabilir. Hazırlanan numunelerden 2.5 µl alınarak plate veya stripe eklenir. Numuneyi kuyucuğa eklerken pipetaj yapılabilir. Kontaminasyonu engellemek için numune dağıtımında ise her seferinde uç değiştirilmelidir. Her çalışmada mutlaka 1 kuyucuk NTC için ayrılmalıdır. Mümkünse her seferinde, mümkün değilse haftada 1 pozitif kontrol de eklenerek cihazın performansı kontrol edilmelidir.

qPCR Cihazının Ayarlanması

Cihaza okuma yapması için FAM kanalına "Sars-Cov-2" ismiyle bir hedef, HEX kanalına ise "RP geni" ismiyle başka bir hedef tanımlanır. Cihazda HEX kanalı seçilemiyorsa yerine VIC kanalı seçilebilir.

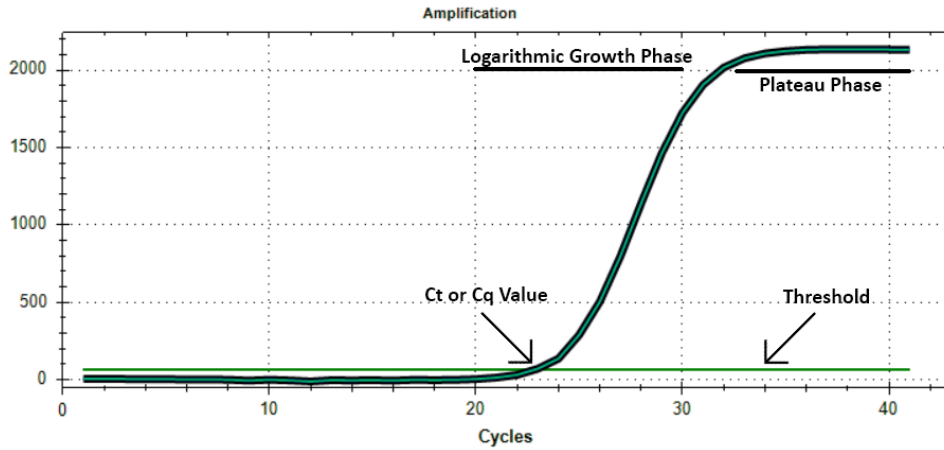
Numune isimlerinin cihaza tanımlanması, sonuçların raporlanması ve kayıt altına alınması açısından yarar sağlayacaktır. Cihaz raporlama için ihtiyaç duyuyorsa NTC ve PC tanımlaması yapılabilir.

Kitin çalışması için gerekli olan qPCR döngüsü koşulları aşağıdaki tabloda yer almaktadır;

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	52°C	5 dk
1	95°C	3 sn
1	95°C	1 sn
6	64°C	4 sn
34	95°C	1 sn
	64°C*	FAM/HEX 4 sn ***

*** Bu aşamada plate okuması yapılmalıdır.

Sonuçların Analizi ve Yorumlanması



qPCR sonuçları yukarıdaki örnek grafiğe göre değerlendirilebilir. Reaksiyonda kullanılan floresan boyalar PCR reaksiyonu ile kopyalanan nükleik asit miktarı paralellik gösterir. Bir hasta örneğinde sinyal eğrisi, eşik/threshold değerini ne kadar erken geçerse o kadar fazla viral yüke sahiptir ve **eşik değerini geçtiği değere Ct veya Cq değeri denir**. Bu sebeple FAM kanalında, eşik değeri Ct>31 olan numunelerin viral yükü çok düşüktür ve negatif olarak yorumlanır. Sonuçlar yorumlanırken Ct değeri ile birlikte yukarıda görüldüğü gibi sigmoidal amplifikasyon grafiği görülmesi gerekmektedir.

Orf1ab, N ve E Geni (FAM)	RP Geni (HEX)	Yorum
Ct <31	Ct <31	Hasta pozitif dir. SARS-CoV-2 RNA'sı tespit edilmiştir.
Ct değeri yok veya Ct >31	Ct <31	Hasta negatif dir. SARS-CoV-2 RNA'sı tespit edilmemiştir.
Ct 30-31 arasında	Ct <31	Tekrar edilmesi önerilir. Tekrar imkanı yoksa negatif olarak değerlendirilir.
Ct <31	Ct Değeri yok, Ct>31	Hasta pozitif olarak değerlendirilir. Viral yükün fazla olduğu durumlarda bu durum gerçekleşebilir.
Ct Değeri yok	Ct Değeri yok, Ct>31	İnsana ait gen tespit edilemedi. Tekrar edilmesi veya tekrar numune alınması önerilir.