

Covid-19 Real Time PCR Kiti

Cat. No: 114R-10-01



GİRİŞ

Coronavirüsler, Coronaviridae familyasına ait olan ve geniş ölçüde insanlara ve diğer memelilere bulaşabilen RNA virüsleridir. Aralık 2019'da, Wuhan, Hubei, Çin'de kaynağı bilinmeyen bir dizi pnömoni vakasından alınan alt solunum yolu örneklerinden yapılan analizler, 2019 yeni koronavirüs (SARS-CoV-2) olarak adlandırılan yeni bir koronavirüsü varlığını gösterdi. Bu virüsün neden olduğu hastalığa ise COVID-19 denildi. Test Sistemimiz, SARS-CoV-2' nin **RNA-dependent RNA polimerase gene (RdRP)** ve **Nucleocapsid protein gene** bölgelerini yüksek hassasiyet ve özgüllük ile tespit eder.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

RNA molekülü ile gerçekleştirilen PCR çalışmalarında, öncelikle komplementer DNA (cDNA) sentezine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için ters transkriptaz (Revers Transcriptase) enzimi ile RNA'nın kalıbı oluşturulmakta ve elde edilen cDNA direk PCR işleminde kullanılabilir. Kalıp olarak cDNA ve DNA'nın kullanıldığı 5' nükleaz testi için işlemin devamı Taq DNA polimerazın 5'exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Bu test için probun 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımamasını baskılamakta aynı zamanda da probun primer gibi davranarak uzamasına engel olmaktadır. PCR esnasında enzim aktivitesi ile birlikte reporter ve quencer arasında bulunan prob parçalanarak ayrılır ve baskılanmanın ortadan kalkmasıyla ışımaya meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışımaya doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş zamanlı olarak tespit edilmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Kit, cDNA ve 5'Nükleaz PCR yöntemine özel olarak uyarlanmış One-Step RT-PCR master miks için "Ready-to-use" formatta tüm reaktifleri sağlar. Kit, spesifik primer-prob setleri içermektedir. COVID-19 analizi için FAM işaretli, PCR reaksiyonunun doğru şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol eden internal kontrol analizi için ise HEX/JOE boyası ile işaretli prob kullanılmaktadır.

Covid-19 Real Time PCR Kit için Limit of Detection (LOD) değeri 1-10 Kopya/Rxn'dir.

Tablo 1 : Tüp- Gen- Boya

Tüp	Gen	Boya
Covid-19 Master Miks	RdRp Geni & Nucleocapsid Geni	FAM
	Internal Kontrol	HEX

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşenler	150 Test
Covid-19 Master Miks	1500 µL
Pozitif Kontrol	50 µL
Negatif Kontrol	50 µL
Kullanım Klavuzu	1

SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözündürmek (>5X), ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

RNA EKSTRAKSİYONU

- İnsan nazofarengeal, orofarengeal, ön nazal ve orta konka burun çubuğu ve nazofarengeal yıkama / aspirat veya nazal aspirat örnekleri ve balgam örnekleri uygun steril pamuklu çubukla viral nakil sıvısına toplanmalıdır.
- Numune viral taşıma sıvısında bir haftaya kadar + 4 °C'de saklanabilir.
- Numune oda sıcaklığında taşınabilir.
- Numune bir haftadan daha uzun süre içerisinde çalışılacaksa -20 °C'de saklanmalıdır.
- Kit, Spin Kolonu RNA Ekstraksiyonu, Otomatik RNA Ekstraksiyonu ve fenol/kloroform RNA Ekstraksiyonu gibi RNA İzolasyon Sistemleri ile elde edilmiş örnekler için uygundur.

TEST PROSEDÜRÜ

- Çalışmaya başlamadan önce eriyen master miks nazikçe pipetaj yapılarak karıştırılır.
- Bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, 10 µl master miks (Ready to use) aktarılır.
- Bu tüplere 10 µl RNA eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla test çalıştırılır.

42 °C	8 dk.	cDNA Sentezi
96 °C	1 sn.	40 Döngü
60 °C	25 sn.	

Floresan boya olarak FAM ve HEX/JOE seçilmelidir.

*Real Time PCR süresi 55 dk'dır. Bu süre cihaza göre küçük farklılıklar gösterebilir.

Eğer;

- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak "none" seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen "Adjust Gain Settings" kısmında Green Auto Gain değerini 20' ye, Yellow Auto Gain değerini 10' a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar;

Bio-Rad CFX96
ABI 7500/7500 Fast
Roche LightCycler 96 System
Rotor Gene Q
Miq qPCR Cycler
LongGene Q



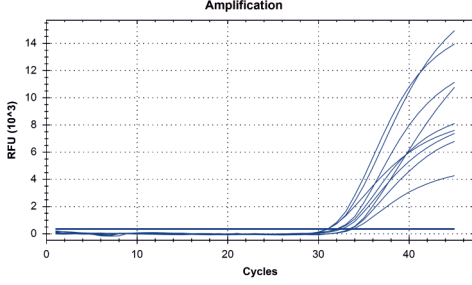
Covid-19 Real Time PCR Kiti

Cat. No: 114R-10-01

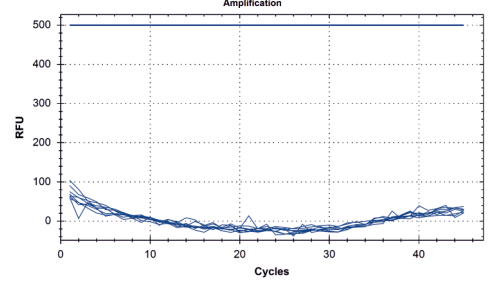


ANALİZ

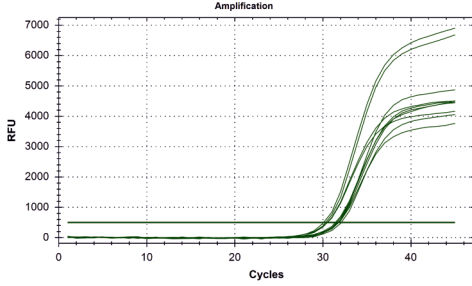
PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz (Tablo 2). Aşağıdaki analiz resimleri CFX96 cihazına aittir. Farklı cihazlar için lütfen iletişime geçiniz (info@snp.com.tr). Internal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. RNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. Internal kontrolün Ct değeri ise RNA konsantrasyonuna bağlı olarak ≤ 35 olmalıdır (Şekil 3). FAM'da Ct değeri <40 olan her amplifikasyon için "**pozitif**" olarak sonuç verilmelidir (Şekil 1). Eğer FAM'da herhangi bir pik yoksa sonuç COVID-19 için "**negatif**"'tir (Şekil 2). FAM boyasında bazı pikler Şekil 4'e göre kontaminasyon olarak değerlendirilebilir.



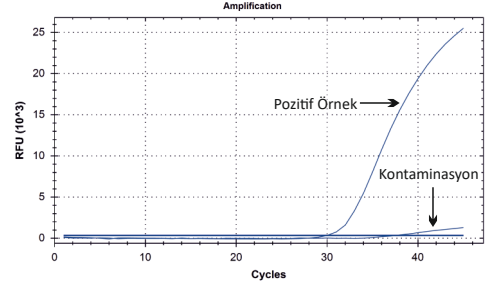
Şekil 1: Covid-19 Pozitif Örnekler (FAM Boyası)



Şekil 2: Covid-19 Negatif Örnekler (FAM Boyası)



Şekil 3: Internal Kontrol (HEX Boyası)



Şekil 4: Olası Kontaminasyon (FAM Boyası)

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol çalışmıyorsa

- Unutulmuş örnek yükleme,
- Test' te inhibitör varlığı,
- Örnek degradasyonu söz konusudur.

Eğer pikler geç başlıyorsa,

Öncelikle örneklerinizin piklerini pozitif kontrol RNA pikleri ile karşılaştırın. Eğer pozitif kontrol RNA da bir sorun yoksa;

- Hedef RNA kalitesi iyi değildir. RNA örneğini 1 e 1 oranında Nuclease free su ile sulandırın.
- Hedef RNA miktarı düşük olabilir. RNA ekstraksiyon aşamasını tekrar edin.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. tech@snp.com.tr

UYARILAR

- Temas halinde tahriş edici olabilir.
- Eldivensiz kullanmayın.
- Temas durumunda, temas edilen yeri bol su ile yıkayınız.
- Tüm bileşenler saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master miksleri kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikslerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Tablo 2: Sonuçların Değerlendirilmesi

Sample Type	Internal Kontrol HEX	Covid-19 FAM	Sonuç	Değerlendirme
Örnek 1	+/-	+	SARS-CoV-2 Pozitif	Sonuç Geçerli. SARS-CoV-2 RNA tespit edilmiştir.
Örnek 2	+/-	-	SARS-CoV-2 Negatif	Sonuç Geçerli. SARS-CoV-2 RNA tespit edilmemiştir.
Örnek 3	-	-	Geçersiz Sonuç	Ekstraksiyon aşamasından itibaren tekrar edilmeli.

Tarih : 01/04/2020

