

SARS-CoV-2 Direct OneStep RT-PCR Kiti (S/ORF1ab)

Ref. No: Dia-CV19-3 (100 test)

**T.C. Sağlık Bakanlığı Onaylıdır****Ürün Açıklaması**

Dia-CV19-3 SARS-CoV-2 Direct OneStep RT-PCR Kiti, COVID-2019' un etiyolojik ajanı olan SARS-CoV-2 Koronavirüs' un kalitatif tespiti için tasarlanan prob tabanlı bir Real time PCR testidir. Viral RNA'daki S-geni ve ORF1ab-geni tespitinde kullanılır.

Kitin Tanımı

Koronavirüsler insanlar ve diğer memelilerde (deve, kedi, köpek ve yarası gibi) enfeksiyonlara neden olan büyük bir virüs ailesidir. SARS-CoV-2 virüsü, 11 Şubat 2020' de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (1) tarafından tanımlanmış olan yeni bir koronavirüstür. SARS-CoV-2 RT-PCR Kiti, COVID-19 etkeni olan SARS-CoV-2 koronavirüsün genomik RNA' sının kalitatif tespiti için tasarlanmış özgün primerlerin kullanıldığı bir In-vitro tanı kitidir. Test, DSÖ(2) ve ABD'nin CDC(Hastalık Kontrol ve Önleme merkezi) kurumu (3) tarafından koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) için belirlenen klinik kriterleri gösteren bireylerden alınan serum, alt solunum yolu örnekleri (bronkoalveolar lavaj, balgam, trakeal aspirat) ve üst solunum yolu örnekleri (nazofaringeal sıvılar ve sürüntü) ile direkt olarak tek aşamalı gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (Direct OneStep RT-PCR) ile çalışır.

Laboratuvar ve Eğitim Gerekliği

Numunelerin çalışılacağı laboratuvar BSL2 olmalı, çalışmalar DSÖ tarafından 12 Şubat 2020' de yayınlanan laboratuvar güvenlik yönergelerine göre yürütülmelidir. COVID-19 için uygulanacak testler, ilgili teknik ve güvenlik prosedürleri konusunda eğitilmiş personel tarafından uygun donanıma sahip laboratuvarlarda yapılmalıdır. (1)

Real-Time PCR Cihazları

Testin çalışmaya uyumlu Real-Time PCR cihazları, ABI Prism 7000/7300/7500/7900/Step One Plus; iCycler iQTM4/iQTM5; Smart Cycler II; Bio-Rad CFX 96; Rotor GeneTM6000; Mx3000P/3005P; MJ-Option2/Chromo4; *LightCycler 480 Instrument olarak belirlenmiştir.

Pozitif ve Negatif Kontrol

Dia-CV19-3 SARS-CoV-2 Direct OneStep RT-PCR Kit ile birlikte verilen pozitif kontrol örneği sentetik olarak üretilmiş hedef gen bölgeleri (S/ORF1ab/GAPDH) içeren plasmittir ve manuel metod ile ekstrakte edilmiştir. Negatif Kontrol olarak rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılan nükleaz içermeyen su (NFW) kullanılabilir.

Kit ile sağlanmayan gerekli olan ekipman ve kimyasallar

- Biyolojik Kabin
- Real time PCR Cihazı
- Real time PCR test tüpleri/stripleri/plateleri
- Ayarlanabilir Mikropipetler(0.5µl – 1000µl)
- Filtreli Mikropipet uçları
- 1.5 ml Mikrosantrifüj Tüpü
- Soğutucu Çalışma Bloğu
- Pudrasız tek kullanımlık muayene eldiveni
- Tıbbi Atık Kabı
- Soğutucu Dolaplar (+4/-20)
- Masaüstü tipi santrifüj (Max 2.000 g)
- Vortex karıştırıcı
- Nükleaz içermeyen Su (Negatif Kontrol)

Uyarılar ve Dikkat Edilecek Hususlar

- Bu test eğitilmiş personel tarafından uygulanmalıdır.
- Klinik numuneler potansiyel enfeksiyöz materyal olarak kabul edilmeli ve laminar flow kabin içinde hazırlanmalıdır.
- Her bir basamak GLP koşulları takip edilerek uygulanmalıdır.
- Son kullanma tarihi geçmiş kitler kullanılmamalıdır.
- Tekrarlanan don/çöz işlemi kitin sensitivitesini düşürebilir.
- Çözdürülmüş reaktifler için, kullanımdan hemen önce kısaca vortex ve santrifüj işlemi uygulanmalıdır.
- Reaksiyon karışımı buz üzerinde veya soğutucu blok içerisinde hızlı bir şekilde hazırlanmalıdır.
- İki farklı çalışma alanı oluşturulmalıdır:
1) RNA/ DNA ekstraksiyon alanı
2) Amplifikasyon ve Deteksiyon alanı
- Pipet ucu, tüp ve diğer çalışma malzemeleri bir alana ait olup farklı alanlarda kullanılmamalıdır.
- Her zaman steril filtreli pipet ucu kullanılmalıdır.
- Ağzıyla pipetleme yapılmamalıdır. Laboratuvar içerisinde yeme, içme ve sigara kullanma işlemlerini yapılmamalıdır.
- Aerosollerden kaçınılmalıdır.

Dia-CV19-3 SARS-CoV-2 Direct OneStep RT-PCR Kit içeriği

Ref.	Kit İçerikleri	100 test	Kapak
1	RT-PCR 2X MasterMix	1000 µl	Mavi
2	S/ORF1ab/GAPDH Mix	500 µl	Kırmızı
3	S/ORF1ab/GAPDH Pozitif Kontrol	20 ul	Şeffaf
4	DiaQuick RNA Extraction Solution	2 * 1000 µl	Yeşil

Numune Hazırlama**VTM Numunesi için;**

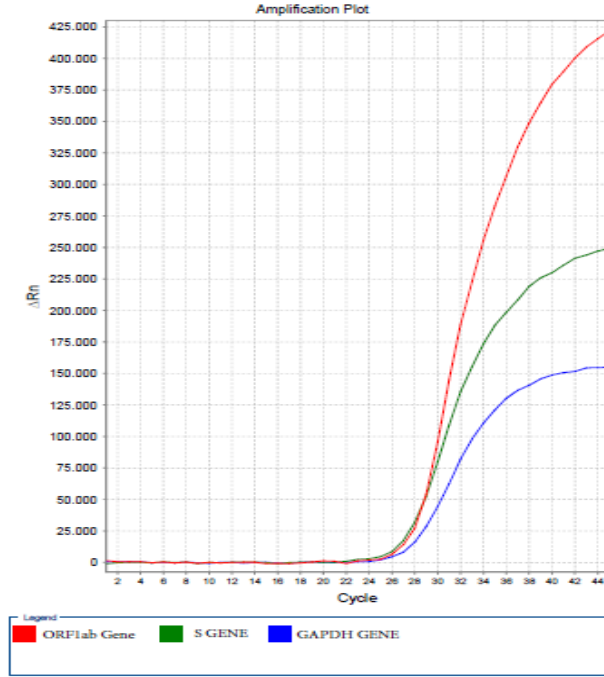
1. Steril/RNase free mikrosantrifüj tüpünde 20 µl VTM örneği ile 20 µl DiaQuick RNA Extraction Solution karıştırılır.
2. Karışım 95°C de 5 dakika inkübe edilir.
3. Sonrasında lizatin buz üzerinde soğuması için 5 dk beklenmelidir. Elde edilen lizattan 5 µl RT-qPCR için kullanılmalıdır.

PROTOKOL**OneStep RT-PCR Miks Hazırlama**

Sıra	Aşağıdaki belirtilen miktarları tek tüp te sırasıyla hazırlayınız.
1	10 µl RT-PCR 2X MasterMix (Mavi)
2	5 µl S/ORF1ab/GAPDH Mix (Kırmızı)
3	5 µl Total RNA (20-100 ng)
Final	Son hacim 20 µl olmalıdır.

OneStep RT-PCR Cihaz Kurulumu

50°C for 20 dk.	1 döngü	Floresan Kanallar	
95°C for 5 dk.	1 döngü	FAM	S gene
95°C for 10 sn.	40 döngü	HEX	GAPDH gene
57°C for 30 sn. (Floresan ölçümü)		Texas Red	ORF1ab gene



Threshold Ayarlamaları: Negatif kontrol olarak kullanılan nukleaz içermeyen su seviyesine ayarlanmalıdır.
Veri analizi ve yorumlama aşağıda belirtilen tabloya göre verilmelidir.

Sonuç	CT Değerleri			Sonuç Değerlendirilmesi
	FAM (S geni)	TexasRed (ORF1ab geni)	HEX (GAPDH geni)	
Negatif Kontrol	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	Beklenen Negatif Kontrol sonucudur.
Pozitif Kontrol	≤30	≤30	≤30	Beklenen Pozitif Kontrol sonucudur.
1.	≤38	≤38	≤38	Örnek 2019-nCoV Pozitif olarak değerlendirilir.
2.	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	≤38	Örnek 2019-nCoV Negatif olarak değerlendirilir.
3.	≤38	≤38	Tespit Edilmedi	İnternal kontrolün çalışmadığı fakat Hedef genlerin çalıştığı durum olur ise FAM ve TexasRed kanalındaki ışım 38 ct'den küçük olursa örnek 2019-nCoV pozitif olarak değerlendirilir.
	≤38	Tespit Edilmedi	Tespit Edilmedi	
4.	Tespit Edilmedi	≤38	Tespit Edilmedi	PCR inhibitörü olabilir, numune ekstraksiyon aşamasında itibaren tekrarlanmalıdır.

Daha fazla soru ve destek için info@diagen.com.tr adresi ile teknik hizmetlerle iletişime geçiniz.

Referanslar

- [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
- <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/surveillance-and-case-definitions>
- <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/hcp/clinical-criteria.html>