

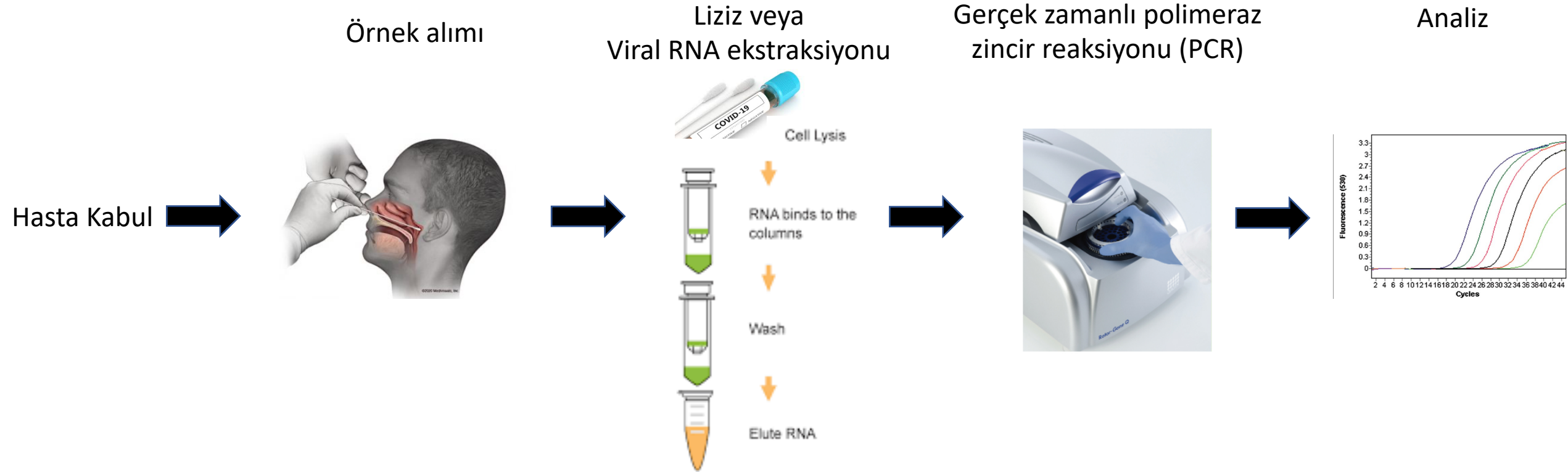
COVID-19 PCR Testleri İşleyiş Şeması

Doç. Dr. Pınar Tulay, Ph.D.

Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD

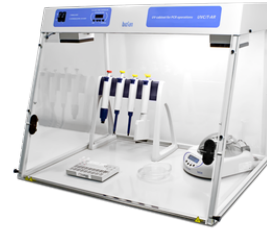
DESAM Enstitüsü, Reprodüktif Tıp Grubu

Temel Akış

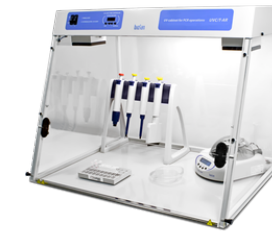


Laboratuvar İş Akışı

Liziz veya RNA ekstraksiyonu



Örneklerin ve PCR mixin birleştirilmesi



Amplifikasyon RT-PCR Cihazı



RNA ekstraksiyon alan: 
Numune hazırlığı, nükleik asit
eldesi

PCR mix hazırlama



Temiz alan:
reagent saklanması,
hazırlanması

Örnek Kabul

[illegible]

Örneklerin İlaba ulaşımı



Personel için Kişisel Koruyucu Ekipman (KKE)

- Çift eldiven
- Ayakkabı koruyucu galoşlar
- Tek kullanımlık cerrahi önlük/ tulum
- FFP3 (N95) veya P3 (N100) maske
- Bone
- Yüz siperi

Laboratuvar hazırlığı

- Ekipman ve çalışma alanı, %70 etanol ile her kullanım öncesi ve sonrası temizlenir
- Her kullanım öncesi ve sonrası kabinler ve laboratuvar minimum 15 dakika UV'lenir
- Yüzeyler ve yerler %10'luk çamaşır suyu ile günde en az 1 kez silinir

Hasta kabul ve örnek alımı

- Hasta kabulü, hasta danışmanı tarafından kayıt açılarak yapılıyor
- Her hastaya ait bir barkod oluşturularak, hasta numarası ve hasta ad-soyadı ile COVID-19 transport tüpü etikenlendirilir
- DSÖ, ayaktan tedavi gören hastalarda nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü örneklerinin birlikte alınmasını önermektedir.
- Swablar ve transport tüpleri SARS-CoV-2 tanısı için kullanılan kit ile sağlanmaktadır
- İlk olarak, orofaringeal sürüntü örneği ve aynı swab kullanılarak nazofaringeal sürüntü örneği alınmalı ve viral taşıma solüsyonuna konulmalıdır.

Örneklerin Nakli

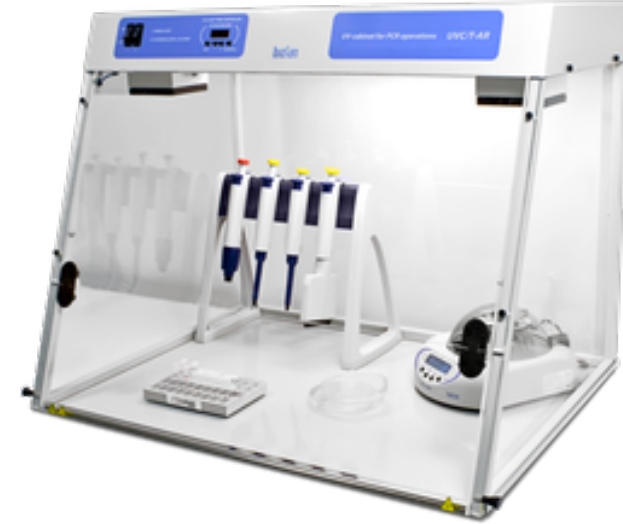
- Alınan numuneler 2-8°C'de saklanmalıdır
- Laboratuvara gönderilecek tüm örnekler muhtemel kırılma, saçılma veya sızıntıya karşı darbelerle dayanıklı ve sızdırmaz koruyucu kap içinde buz kalıbı ile taşınmalıdır
- Taşıma kabı, %70 alkol gibi bir dezenfektan ile her kullanımdan sonra dezenfekte edilmelidir.
- Örnek transferinde pnömatik tüp taşıma sistemi (PTTS) kullanılmamalıdır
 - yüksek basınçtan dolayı, kapaklarının açılması veya gevşemesi - kontaminasyon riski
- Laboratuvara bir personel ile gönderilerek elden teslim edilmelidir.
- Hasta örneğini taşıyan kişilerin de enfeksiyondan korunma ve enfeksiyon kontrol prosedürlerine uyması gerekmektedir.
 - potansiyel olarak enfeksiyöz olduğu düşünülmeli ve KKE kurallarına uyulmalıdır

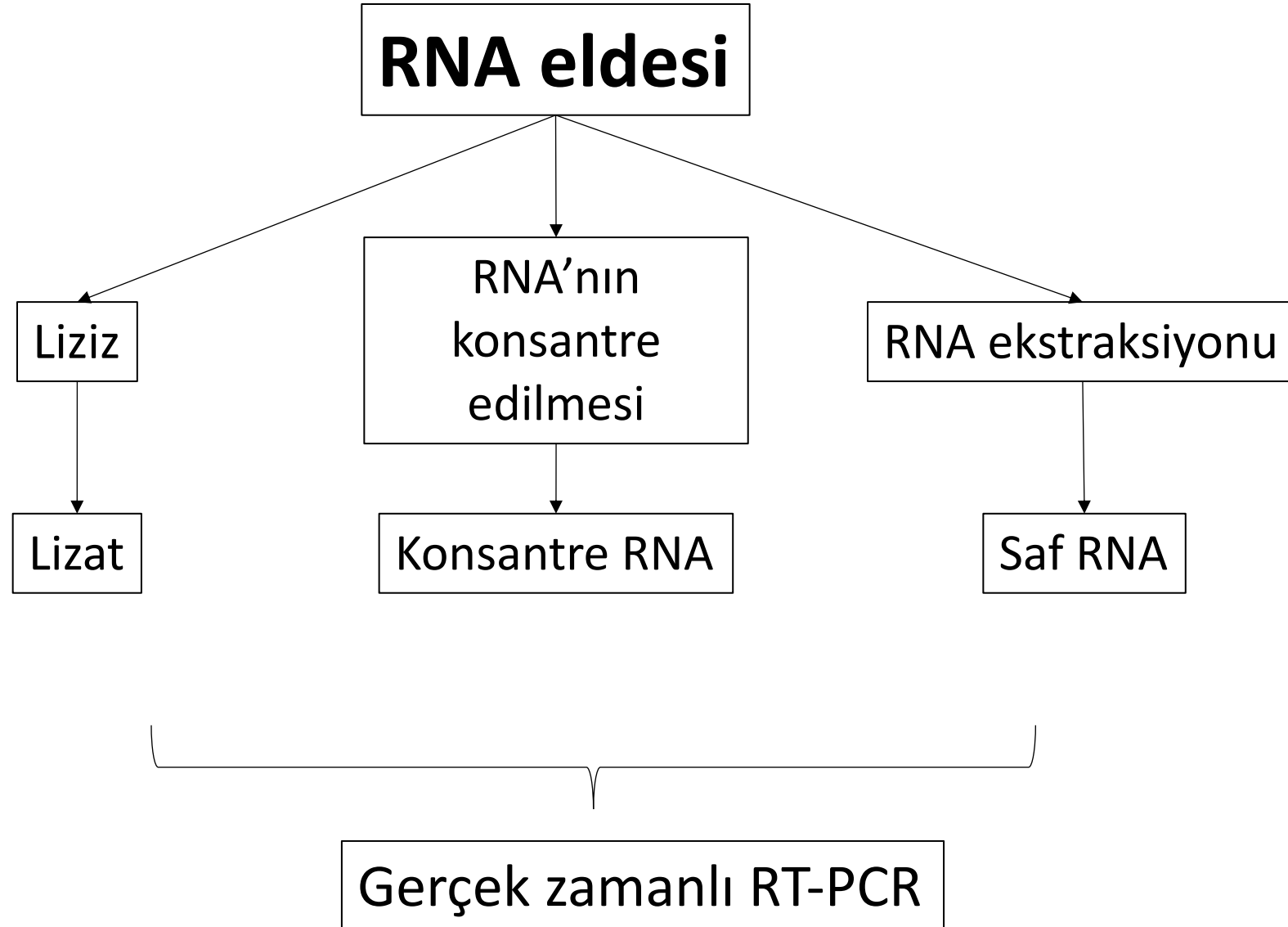
Örnek kabulü

- **Hangi durumlarda numunelerin red edilmesi gerekmektedir?**
- Numune barkod uyumsuzlukları
- Transport (taşıma) solüsyonunun olmaması veya son kullanım tarihinin geçmiş olması
- Numunenin uygunsuz koşullarda saklanması
- Kapağı açılmış, dökülmüş, sızmış numune
- Viral taşıma tüpü içerisinde swab olmaması
- Viral taşıma tüpü içerisinde PCR reaksiyonunu etkileyecek ölçüde kan ya da diğer inhibitörlerin varlığı

Liziz ve RNA eldesi

- **Birinci aşama:** numunedeki viral RNA'nın açığa çıkarılması
- Biyogüvenlik düzey-2 şartlarına sahip laboratuvarlarda
- Sınıf II biyogüvenlik kabinler
- Dikkat edilmesi gerekenler:
 - Numuneler arası kontaminasyon olmaması
 - Sık eldiven değiştirilmesi
 - Kapaklı eppendorf tüplerin kullanılması
 - Mümkün olduğunca kullanılmayan tüplerin kapaklarının kapalı tutulması
 - Aynı anda birden fazla numunenin işleme alınmaması





Liziz

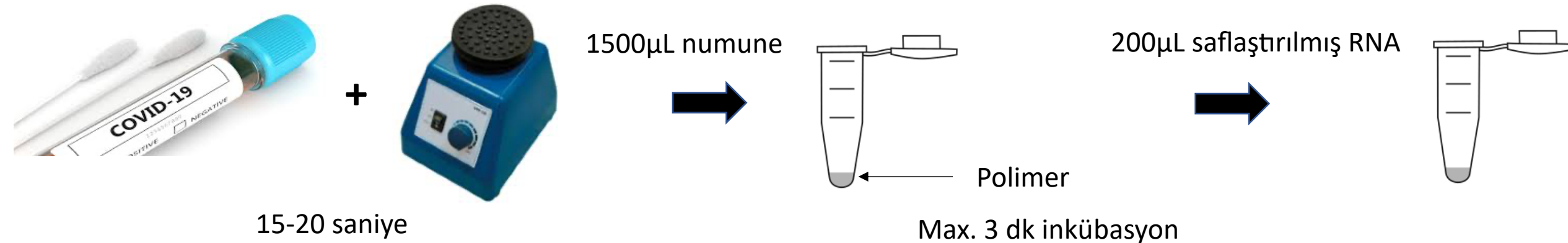
- Pandemi sürecinde, ticari ekstraksiyon kitlerinin teminindeki sıkıntılar, ekstraksiyonun uzun sürmesi, farklı merkezlerde farklı ekstraksiyon sistemlerinin olması, manuel ekstraksiyonun deneyim gerektirmesi... gibi nedenlerle hızlı sonuç verebilecek liziz yöntemleri geliştirildi.
- Transport tüpleri: Viral nükleik asit ekstrakte edici ve koruyucu solüsyon - lizat oluşumu
 - Tween-20 gibi deterjanlar, DNaz ve RNaz gibi hücresel nükleazların inaktivasyonu
- Direkt RT-PCR veya hızlı RNA izolasyonu



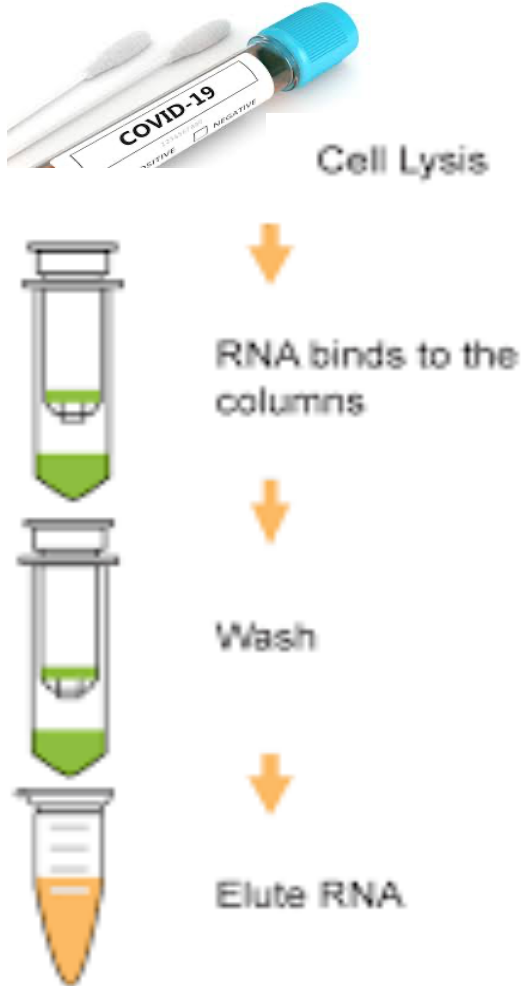
15-20 saniye

Liziz/ RNA konsantrasyonu

- **Diagnovital MagicPrep hızlı RNA izolasyon kiti**
- Polimer, küçük molekülleri solüsyondan ayırıştırarak, mikroorganizmaları ve makromolekülleri konsantre etmektedir
- $>0.5\text{kD}$ 'dan büyük moleküller polimerin dışında kalarak küçük moleküllerden ayırıştırılacaklar



RNA ekstraksiyonu



1. Liziz: guanidinyum izotiyosiyanat, guanidinyum klorür, tween-20, sodyum dodesil sülfat (SDS), sarkosil, üre, fenol veya kloroform gibi kaotropik ajanlar içeren reaktifler

2. RNA'nın kolona bağlanması: Liziz tamponu ve etanol, nükleik asitlerin kolona bağlanması için uygun koşulları yaratır.

3. Yıkama aşamaları: Tuzlar, metabolitler ve çözünür makromoleküler gibi kontaminantlar (potansiyel PCR inhibitörleri), etanol içeren yıkama tamponu ile ortamdan uzaklaştırılır.

4. Elüsyon: Saflaştırılmış viral RNA, düşük tuz tamponu veya su içinde elüte edilebilir

Gerçek zamanlı RT-PCR

- Hedef gen bölgeleri RdRp, E, N ve S
- Testlerin hepsi, oligonükleotidlerin bağlanma bölgelerinde polimorfizm taşımayan SARS-CoV-2 suşlarını doğru olarak tanımlamaktadır.
- **Diagnovital HS SARS-CoV-2 RT-PCR**
- SARS-CoV-2, 2 farklı bölgede spesifik gen dizisinin varlığını tespit eder: Nucleocapsid geninin N1 ve N2 bölgeleri

RT-PCR: Master mix

- Primerler
- Problar
- Ayrıca, endojen insan hedefine yönelik primer ve prob: RNaseP (internal kontrol)

RT-PCR

- **1. aşama:** Revers transtripsiyon: RNA'nın cDNA'e transkripsiyonu
- **2. aşama:** gerçek zamanlı PCR
 - SARS CoV-2'ye özgü hedef sekanslar, floresan etiketli problemlerin kullanımıyla gerçek zamanlı olarak izlenen amplifikasyon ile spesifik olarak amplifiye edilir
 - Yeni amplifiye edilmiş DNA zincirlerine entegre edildiğinde, florofor salınır ve floresans sinyalinde bir artış gözlemlenir.
 - İki farklı hedef sekeans analiz edilmektedir: N1 ve N2 bölgeleri

Component	Volume (µl)
PCR Master Mix	15
RNA Isolate/PC/NTC	5
Total	20

RT-PCR siklusu

Step	Cycles	Temperature	Duration
Reverse Transcription	1	45°C	10 minutes
Initial Denaturation	1	95°C	2 minutes
Amplification	45	95°C	10 seconds
		55°C*	30 seconds

RT-PCR: Kontroller

- Her PCR'da test edilecek numuneler dışında:
- Internal kontrol
 - RNA ekstraksiyonu, saflaştırması ve revers transkripsiyonun doğru bir şekilde yapıldığını anlayabilmek için internal kontrol kullanımı çok önemlidir
 - Test, olası PCR inhibisyonunu belirlemek, ekstraksiyon saflığını ölçmek ve PCR çalışmasının bütünlüğünü doğrulamak için internal kontrol içerir
- Bulaşıcı olmayan bir pozitif kontrol
- Nükleik asit içermeyen bir negatif kontrol

Yanlış negatif sonuçlar neden olabilir?

- Numunelerin uygun olmayan şekilde elde edilmesi, işlenmesi ve / veya depolanması
- Uygun olmayan ekstraksiyon kiti veya PCR platformunun kullanılması
- Viral fazın dışındaki örneklerin analizi

Yanlış pozitif sonuçlar neden olabilir?

- Kontaminasyon
- Yüksek konsantrasyonda COVID-19 viral RNA veya pozitif kontrol şablonu içeren örneklerin uygunsuz kullanımı
- Amplifiye (çoğaltılmış) ürünün uygunsuz kullanımı

Kontaminasyonu nasıl engelleyebiliriz?

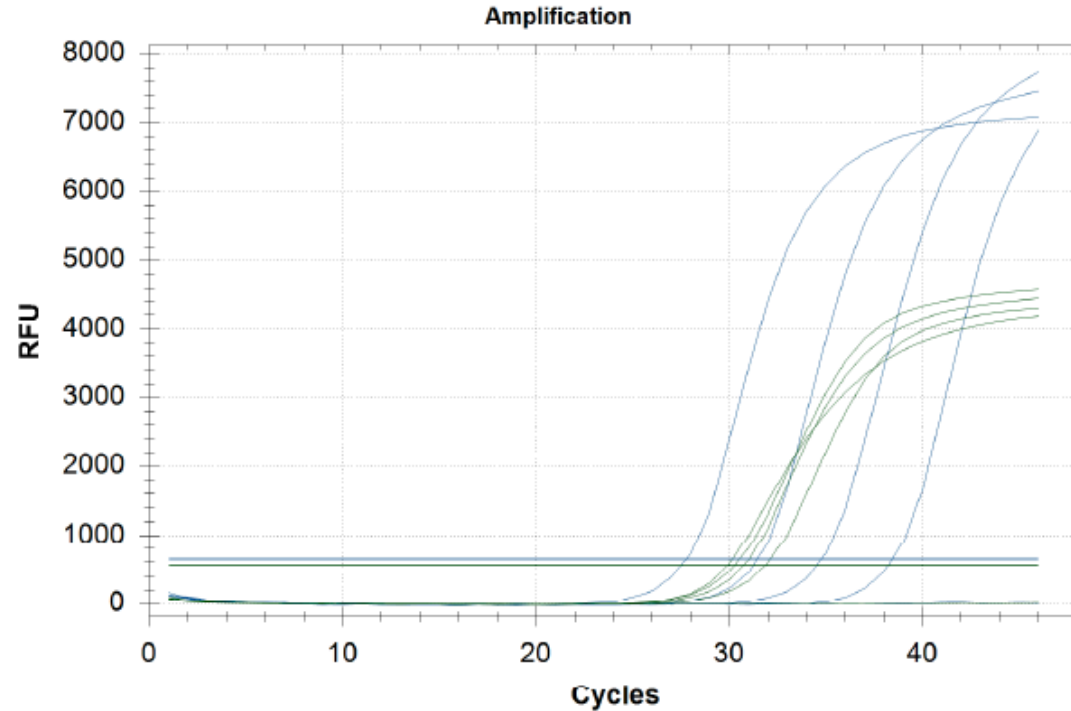
- PCR gibi amplifikasyon teknolojileri, önceki amplifikasyon reaksiyonlarından kazara PCR ürününün eklenmesine duyarlıdır.
- Amplifikasyon adımı kullanılarak klinik örnek veya gerçek zamanlı reaktifler, yanlışlıkla amplifikasyon ürününün (amplikon) eklenmesiyle kontamine olursa yanlış sonuçlar ortaya çıkabilir.
- Örnek hazırlama, PCR öncesi test kurulumu ve PCR sonrası amplifiye nükleik asitlerin işlenmesi için ayrı alanlar olması gerekmektedir.
- Örnek hazırlama, ön PCR test kurulumu ve PCR sonrası amplifiye nükleik asitlerin kullanımı için ayrılmış, özel ekipman (örn. pipetler, mikrosantrifüj) ve sarf malzemeleri (örn. mikrosantrifüj tüpleri, pipet uçları) olması gerekmektedir.
- Örnekler arasında ve kontaminasyondan şüphelenildiğinde eldivenleri değiştirilmesi gerekmektedir.
- Nükleik asit kontaminasyonu riskini en aza indirmek için çalışma yüzeyleri, pipetler ve santrifüjlerin temizlenmesi (etanol,% 10 ağartıcı) gerekmektedir.
- Paylaşılan ekipmandan DNazlar / RNazlar ile çapraz kontaminasyonu önlemek için DNaz / RNaz içermeyen tek kullanımlık plastik malzeme ve DNA / RNA çalışması için ayrılmış pipetler kullanın.
- Aerosol ve sıvı kontaminasyonunu önlemek için prosedür boyunca DNase / RNase içermeyen filtre uçları kullanılması gerekmektedir.

Mevcut RT-PCR Kitlerinden



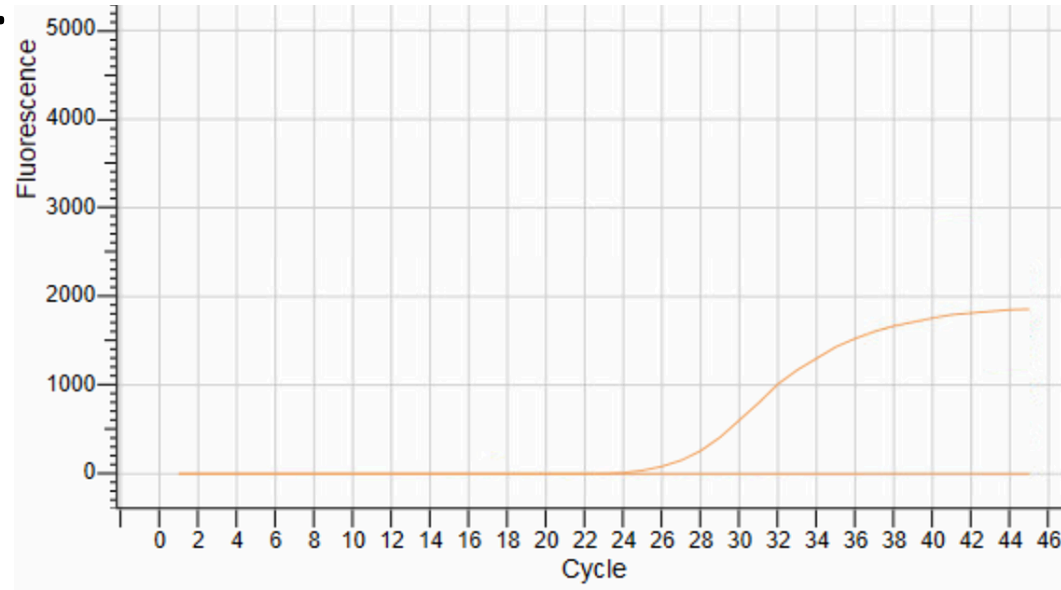
Analiz

- Data eldesi iki farklı floresans kanalından gerçekleştiriliyor:
 - FAM: viral amplifikasyon
 - HEX: internal kontrol



Analiz: Internal Kontrol

- RNA içeren tüm reaksiyonlar **internal kontrol** için pozitif Ct değerleri **vermelidir**.
 - Ct değerleri <40 döngü olmalıdır.
- İnternal kontrolün amplifiye edilememesi, hatalı bir RNA ekstraksiyonunu gösterir veya RNaz kontaminasyonu nedeniyle RNA kaybından olabilir.



Analiz: Pozitif Kontrol

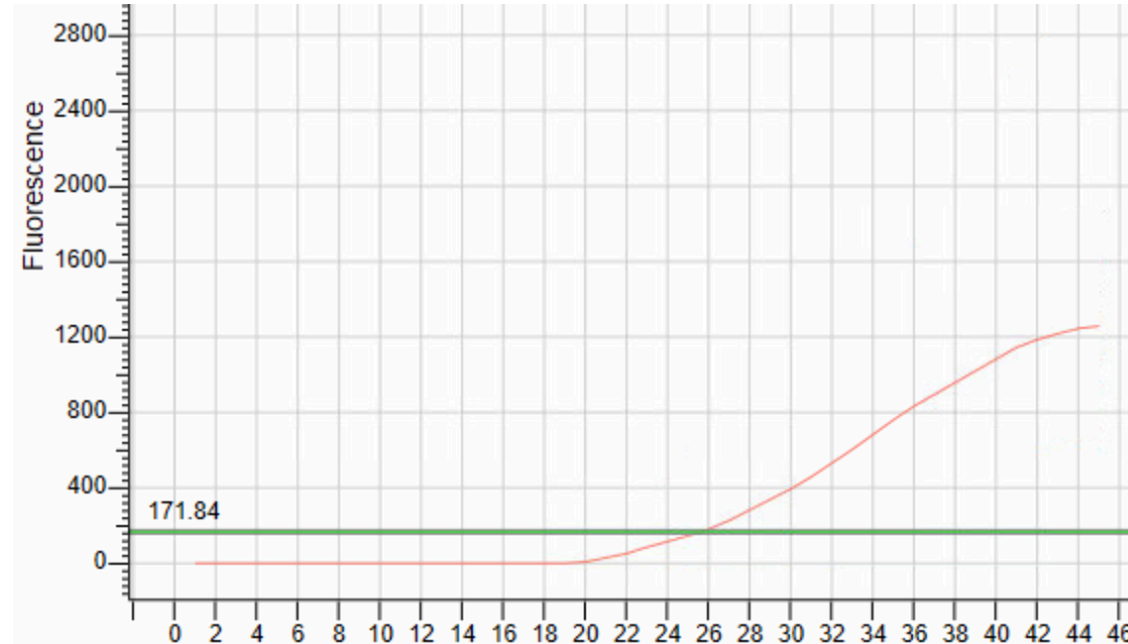
- **Pozitif kontrol** için, **FAM** kanalında pozitif bir Ct gözlemlenmelidir.
- Ct değeri pozitif kontrol için $28 < Ct < 32$ olmalıdır.
- Ct değeri beklenen değere veya pozitif kontrolde Ct saptanamadıysa, RT-PCR tekrarlanmalıdır
- **Ne yapılmalı?**
- Reaksiyon kurulumunu ve PCR reaktifleri kontrol edilmeli
- Cihaz ayarları kontrol edilmeli
- Pozitif kontrolün tekrarlanan dondurma ve çözme döngüleri kalitesinden ödün vererek geç Ct değerlerine sebep olabilir, bundan kaçınılmalı

Analiz: Negatif Kontrol

- **Negatif kontroller** herhangi bir test için pozitif Ct **vermemelidir**.
- Eğer Ct değeri saptanırsa, RNA / DNA ile kontaminasyon mevcuttur.
- **Ekipman ve çalışma alanı dekontamine edilmeli ve reaksiyonları tekrarlanmalı**

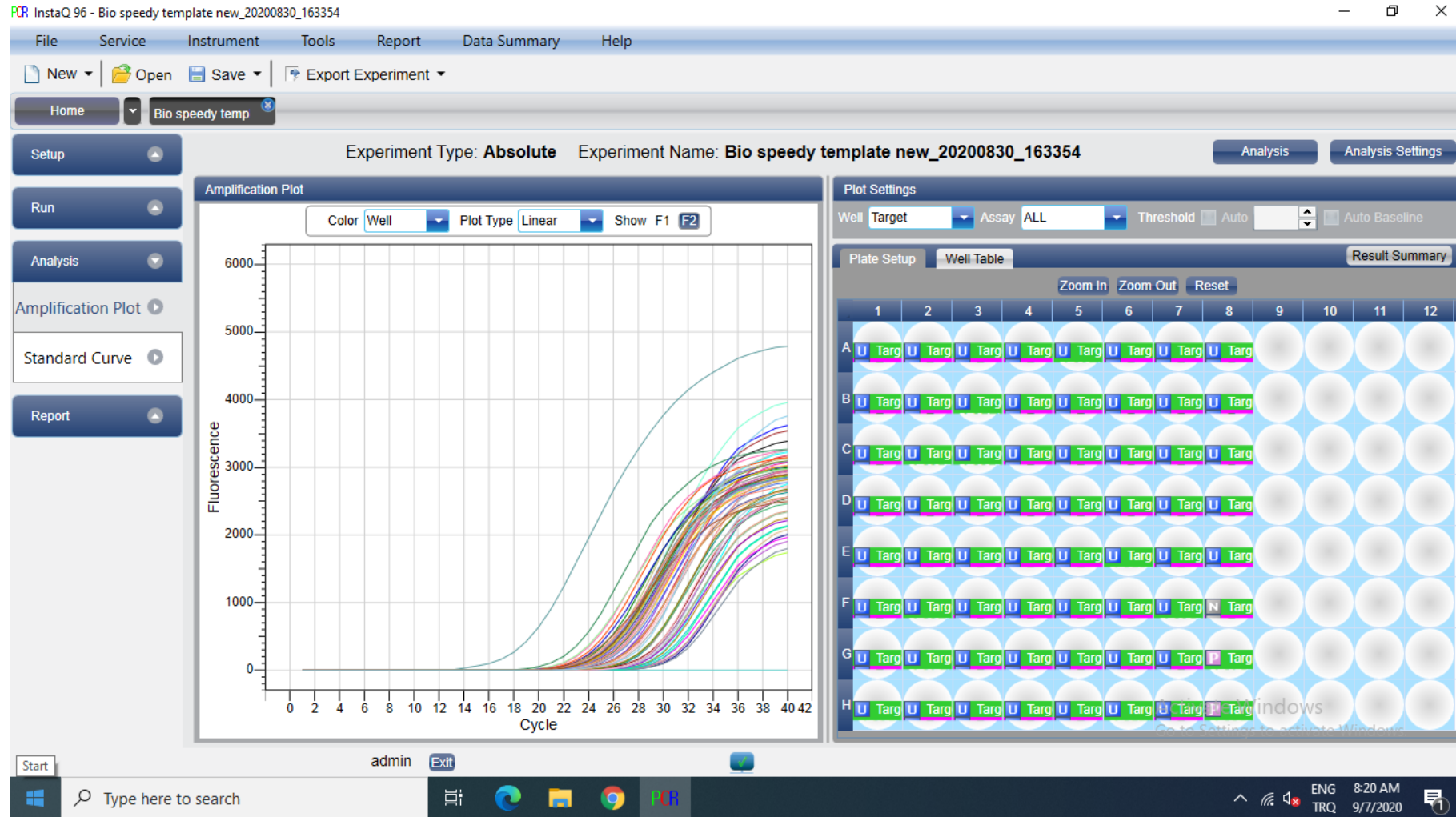
Analiz: Pozitif Sonuçlar

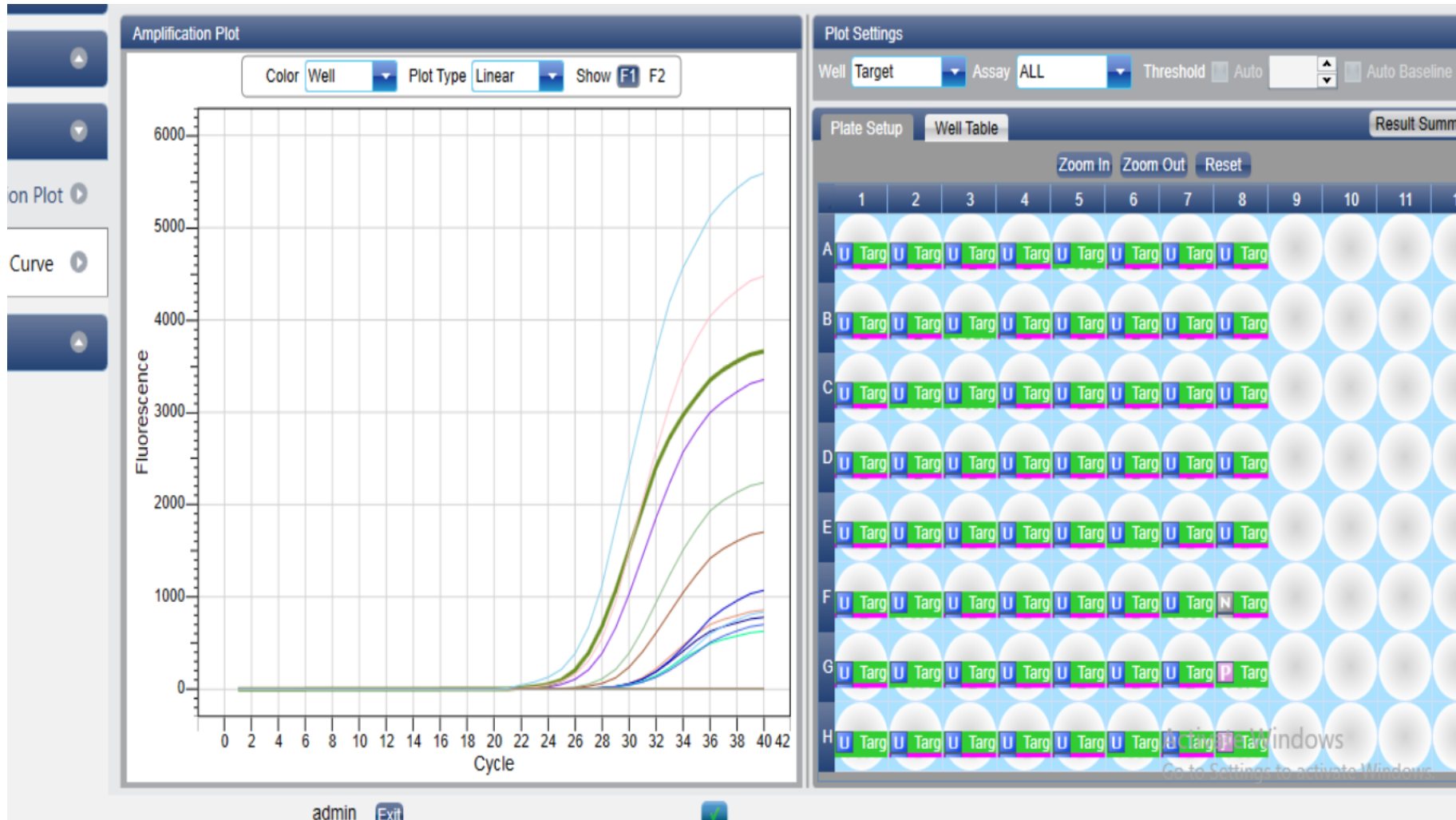
- Bir örneğin SARS-CoV-2 için pozitif kabul edilmesi için, **FAM kanalı** (N1 / N2) pozitif **Ct değerleri vermelidir**.
- İnternal kontrol amplifiye olmazsa, örnek yine de pozitif olarak kabul edilmeli ve RT-PCR tekrarlanmalıdır.



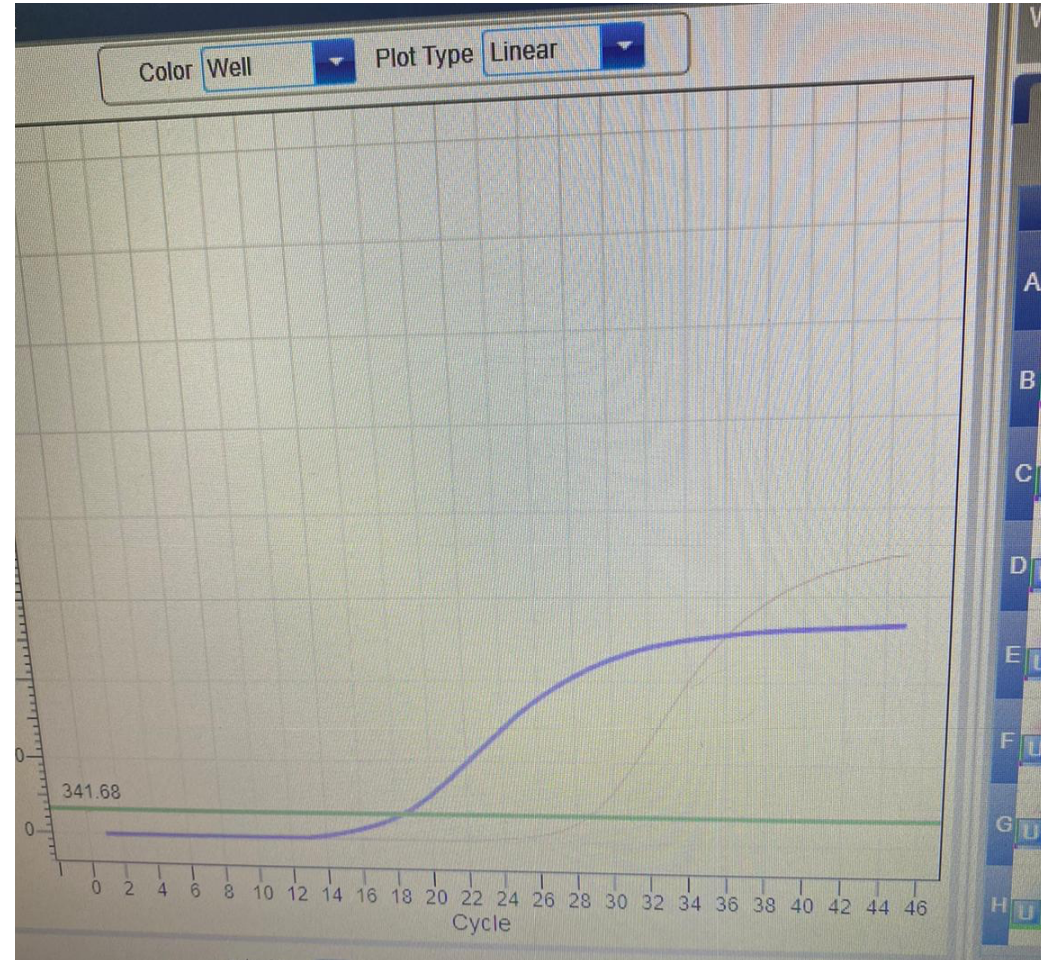
Analiz: Negatif Sonuçlar

- Bir örneğin SARS-CoV-2 için **negatif** kabul edilmesi için FAM kanalında (N1 / N2) Ct değeri **olmamalıdır**
- HEX kanalındaki internal control, pozitif bir Ct değeri vermelidir (<40 döngü)
- HEX kanalında, pozitif Ct değeri saptanmaması durumunda, RNA ekstraksiyonu ve RT-PCR işlemi tekrarlanır.
 - Yine Ct saptanmaması durumunda, tekrar numune alınması gerekmektedir.

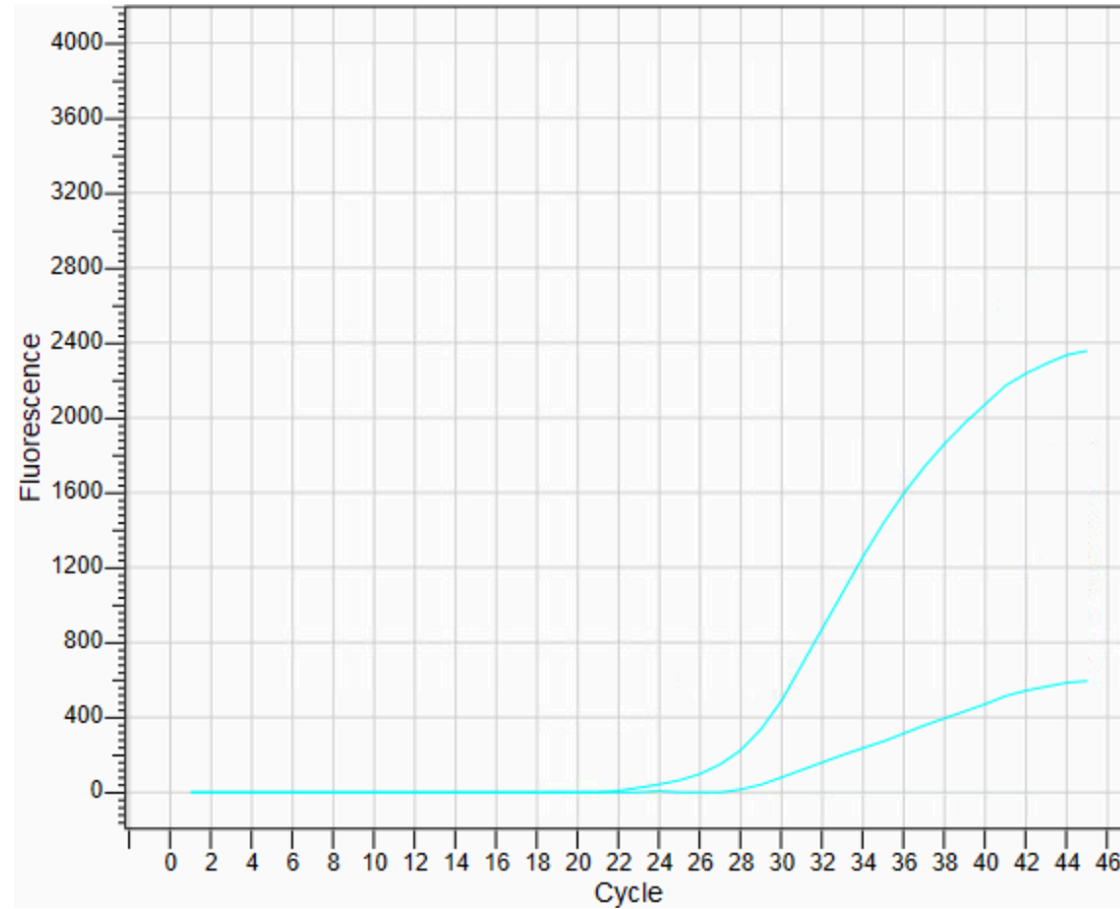








Analiz: Pozitif?



Analiz

N1-N2 (FAM)	RNAseP (HEX)	Interpretation
+	-	The sample is considered positive for SARS-CoV-2.
+	+	The sample is considered positive for SARS-CoV-2.
-	+	Only the target sequence for the internal control was amplified. The sample is considered negative for SARS-CoV-2.
-	-	PCR was inhibited, results are invalid.
+	-	Expected result for the positive control
-	-	Expected result for the negative control