

ÖZET

İZOTERMAL AMPLİFİKASYON YÖNTEMİYLE COVID-19 TANISINDA
KULLANIMA UYGUN ÖZGÜN REAKSİYON KARIŞIMI

- 5 Mevcut buluş, Covid-19'un izotermal amplifikasyon yöntemiyle tanısında kullanıma uygun bir reaksiyon karışımına ilişkindir.

İSTEMLER

1. Covid-19 tanısında kullanım için TCAAACGTTTCGGATGCTC (SEQ ID No: 1),
TTCATAAGGATCAGTGCCAAG (SEQ ID No: 2),
CACCAAGTGTCTCACCACTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ ID
5 No: 3), CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC
(SEQ ID No: 4), ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5),
GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerleri.
2. İzotermal amplifikasyon yönteminde kullanıma uygun bir Sars-CoV-2 primer
karışımı olup özelliği söz konusu primer karışımının; a)
10 TCAAACGTTTCGGATGCTC (SEQ ID No: 1),
TTCATAAGGATCAGTGCCAAG (SEQ ID No: 2),
CACCAAGTGTCTCACCACTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ ID
No: 3), CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC
(SEQ ID No: 4), ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5),
15 GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerlerini; b) % 0,5 - %2
oranında dimetilsüfoksit (DMSO) ve c) % 0.05 - % 0.2 oranında tween 20
içermesidir.
3. İstem 2'ye göre bir primer karışımı olup özelliği reaksiyon başına 2X SYBR Safe
floresans boya içermesidir.
- 20 4. İzotermal amplifikasyon yöntemiyle Covid-19 tanısında kullanıma uygun Sars-
CoV-2 kolorimetrik master karışım, Sars-CoV-2 sentetik nükleokapsit RNA (SEQ
ID No: 7), ultra saf DNAaz ve RNAaz içermeyen su ve Sars-CoV-2 primer
karışımı içeren bir kite ilişkin olup özelliği primer karışımının; a)
25 TCAAACGTTTCGGATGCTC (SEQ ID No: 1),
TTCATAAGGATCAGTGCCAAG (SEQ ID No: 2),
CACCAAGTGTCTCACCACTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ ID
No: 3), CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC
(SEQ ID No: 4), ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5),
30 GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerlerini; b) % 0,5 - %2
oranında dimetilsüfoksit (DMSO) ve c) % 0.05 - % 0.2 oranında tween 20
içermesidir.
5. Covid-19 tanısında kullanıma uygun bir izotermal amplifikasyon yöntemi olup
özelliği söz konusu yöntemin;

- i. Sars-CoV-2 sentetik nükleokapsit RNA (SEQ ID No: 7) ile bir pozitif kontrol solüsyonu hazırlanması,
- ii. Sars-CoV-2 kolorimetrik master karışım ve
 TGCCTCAACTTGAACAGC(SEQ ID No: 1),
 5 TTCATAAGGATCAGTGCCAAG (SEQ ID No: 2),
 CACCAAGTGTCTCACCACCTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ
 ID No: 3),
 CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC (SEQ
 ID No: 4), ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5),
 10 GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerlerini; % 0,5 - %2
 oranında dimetilsüfoksit (DMSO) ve c) % 0.05 - % 0.2 oranında tween 20
 içeren primer karışımı ile reaktif çalışma karışımının hazırlanması,
- iii. Reaktif çalışma karışımı ile pozitif kontrol solüsyonunun karıştırılmasıyla pozitif kontrol numunesinin hazırlanması,
- 15 iv. Reaktif çalışma karışımı ile numunelerin karıştırılması ile analiz numunelerinin hazırlanması,
- v. Reaktif çalışma karışımı ile suyun karıştırılmasıyla negatif kontrol numunesinin hazırlanması,
- 20 vi. pozitif kontrol numunesi, negatif kontrol numunesi ve analiz numunelerinin 20-30 dakika boyunca 65-75 °C sıcaklıkta tutulması,
- vii. Numunelerin süre sonunda gözle veya plaka okuyucuyla değerlendirilmesi, pembe renkli olmayanların veya floresans ışıma yapanların pozitif olarak değerlendirilmesi adımlarını içermesidir.
6. İstem 2'ye göre primer mix olup özelliği %0.8 ile %1.2 oranında DMSO
 25 içermesidir.
7. İstem 2'ye göre primer mix olup özelliği içerisinde % 0.08 ile % 0.12 oranında tween20 içermesidir.

TARİFNAME

İZOTERMAL AMPLİFİKASYON YÖNTEMİYLE COVID-19 TANISINDA
KULLANIMA UYGUN ÖZGÜN REAKSİYON KARİŞİMİ

5 Mevcut buluş, Covid-19'un izotermal amplifikasyon yöntemiyle tanısında kullanıma uygun bir reaksiyon karışımına ilişkindir.

Tekniğin Bilinen Durumu

COVID-19 tanısı, ülkemizde ve dünyada rutin olarak Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR (RT-PCR) yöntemiyle yapılmaktadır. Bu yöntem reaksiyonun gerçekleşmesi için ısı döngü gerektirdiğinden kompleks laboratuvar cihazlarına ve alt yapısına ihtiyaç duyulmaktadır. Ülkemizde tam donanımlı laboratuvar sayısı oldukça fazla olmasına rağmen COVID-19 tanısında şu an için rutin olarak kullanılan RT-PCR cihazları günlük belirli sayıda test yapabilmektedir. Bilinen teknikte yaygın olarak kullanılan RT-PCR yöntemi ısı döngüye ihtiyaç duymaktadır. Bu da çalışma süresini 60-90 dk aralığında devam ettirmektedir. Pandemi koşullarında sınırlı sayıda test yapabilen RT-
15 PCT cihazlarının ihtiyaç duyulan test sayısını karşılamaması nedeniyle ve her bölgede ayrı birer laboratuvar kurulamayacağı ve yeterince uzman personel görevlendirilemeyeceği için, uzmanlar patojenlerin tanısını hızlı ve doğru bir şekilde yapabilecek ucuz, kullanımı kolay ve sahaya uygun yerinde tanı (point of care) hizmetleri üzerine çalışmaktadır. Özellikle COVID-19 tanısı için kullanılacak yerinde
20 tanı sistemlerinin yaygınlaşabilmesi için, farklı çalışma koşullarında tutarlı sonuçlar veren, kullanımı basit, taşınabilir ve ucuz tanı sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

RT-PCT yöntemine alternatif olarak izotermal amplifikasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde analiz yaklaşık 30 dakikada tamamlanmaktadır. Bu yönüyle izotermal amplifikasyon yöntemi RT-PCR'a göre 2 kat daha fazla hasta örneğinin analiz
25 edilmesine imkan sağlamaktadır.

RT-LAMP adıyla da bilinen izotermal amplifikasyon yöntemi bir deney kiti ve ısıtıcıyla Covid-19'a neden olan Sars-CoV-2 virüsünün tespit edilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde deney kiti sayesinde Sars-CoV-2 virüsü RT-PCT yöntemine göre çok daha hızlı çoğaltılır ve işlem sonunda virüsün varlığı renk
30 değişimi sayesinde kolayca gözle veya 440-560 nm arasını ölçebilen bir plaka okuyucuyla gözlemlenebilir.

Her ne kadar bu yöntem hızlı sonuç vermesi, gelişmiş teknik uzmanlık ve komplike deney araçları gerektirmemesi yönüyle RT-PCT yöntemine göre önemli avantajlar sağlasa da yapılan çok sayıda çalışmada yanlış pozitif sonuç verdiği bildirilmektedir.

5 **Buluşun Amacı**

Bu buluşun amacı, RT-LAMP adıyla da bilinen izotermal amplifikasyon yönteminde kullanıma uygun yanlış pozitif test sonuçlarını azaltan bir test kiti için reaksiyon karışımı geliştirmektir.

10 **Buluşun Detaylı Anlatımı**

Mevcut buluş RT-LAMP adıyla da bilinen izotermal amplifikasyon yönteminde kullanıma uygun bir Sars-CoV-2 primer karışımına ilişkin olup özelliği söz konusu primer karışımının; a) TGCCTCAACTTGAACAGC (SEQ ID No: 1), TTCATAAGGATCAGTGCCAAG (SEQ ID No: 2),

- 15 CACCAAGTGTCTCACCACCTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ ID No: 3), CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC (SEQ ID No: 4), ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5), GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerlerini; b) % 0,5 - %2 oranında dimetilsüfoksit (DMSO) ve c) % 0.05 - % 0.2 oranında tween 20 içermesidir.

- 20 Mevcut buluşa uygun primer karışımı kullanılarak izotermal amplifikasyon yöntemiyle yapılan analizlerde yanlış pozitif sonuç alınmadığı ve bu şekilde bilinen yöntemin güvenilirliğinin ve doğruluğunun artırıldığı görülmektedir.

Ayrıca, buluşa uygun primer karışımı covid-19 tanısında yüksek spesifikliğin sağlanmasını, RT-PCR yöntemine göre en az 2 kat daha hızlı sonuç elde edilmesini,

- 25 komplike cihazlar gerektirmeden basit ısıtıcı ve blue gel görüntüleme sistemiyle tespit edilmesini sağlamaktadır.

TGCCTCAACTTGAACAGC (SEQ ID No: 1) ve

TTCATAAGGATCAGTGCCAAG(SEQ ID No: 2) primerleri dış primerler olup, hedef gen üzerindeki dış bölgeyi tanıyan spesifik dizilerdir.

- 30 CACCAAGTGTCTCACCACCTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ ID No: 3) ve CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC (SEQ ID

No: 4) primerleri iç primerler olup, hedef gen üzerindeki iç bölgeyi tanıyan spesifik dizilerdir.

ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5) ve GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerleri yöntemi hızlandırmak için ilmi yapılarına bağlanan primerler olup özellikle hairpin veya primer dimer yapılarını oluşturmayacak özelliktedir.

Buluşa uygun primer karışımı içerisinde ayrıca, reaksiyon başına 2X SYBR Safe floresans boya içerebilir.

Buluş bir açıdan TGCCTCAACTTGAACAGC (SEQ ID No: 1),
10 TTCATAAGGATCAGTGCCAAG (SEQ ID No: 2),
CACCAAGTGTCTCACCCTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ ID No: 3),
CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC (SEQ ID No: 4),
ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5),
GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerlerinin Covid-19 tanısında
15 kullanılmasına ilişkindir.

Buluş bir diğer açıdan izotermal amplifikasyon yöntemiyle Covid-19 tanısında kullanıma uygun Sars-CoV-2 kolorimetrik master karışım, Sars-CoV-2 sentetik nükleokapsit RNA (SEQ ID No: 7), ultra saf DNAaz ve RNAaz içermeyen su ve Sars-CoV-2 primer karışımı içeren bir kite ilişkin olup özelliği Sars-CoV-2 primer
20 karışımının;

a) TGCCTCAACTTGAACAGC (SEQ ID No: 1),
TTCATAAGGATCAGTGCCAAG (SEQ ID No: 2),
CACCAAGTGTCTCACCCTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ ID No: 3),
CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC (SEQ ID No: 4),
25 ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5),
GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerlerini; b) % 0,5 - %2 oranında dimetilsüfoksit (DMSO) ve c) % 0.05 - % 0.2 oranında tween 20 içermesidir.

Bir diğer açıdan buluş covid-19 tanısında kullanıma uygun bir izotermal amplifikasyon yöntemine ilişkin olup söz konusu yöntem;

30 i. Sars-CoV-2 sentetik nükleokapsit RNA (SEQ ID No: 7) ile bir pozitif kontrol solüsyonu hazırlanması,

- ii. Sars-CoV-2 kolorimetrik master karışım ve TGCCTCAACTTGAACAGC (SEQ ID No: 1), TTCATAAGGATCAGTGCCAAG (SEQ ID No: 2), CACCAAGTGTCTCACCCTACGGCACCTCATGGTCATGTTAT (SEQ ID No: 3), CTCATGTGGGCGAAATACCAGTCCACCAGCTCCTTTATTACC (SEQ ID No: 4), ACCGTACTGAATGCCTTCG (SEQ ID No: 5), GGCTTACCGCAAGGTTCT (SEQ ID No: 6) primerlerini; % 0,5 - %2 oranında dimetilsüfoksit (DMSO) ve c) % 0.05 - % 0.2 oranında tween 20 içeren primer karışımı ile reaktif çalışma karışımının hazırlanması,
- iii. Reaktif çalışma karışımı ile pozitif kontrol solüsyonunun karıştırılmasıyla pozitif kontrol numunesinin hazırlanması,
- iv. Reaktif çalışma karışımı ile numunelerin karıştırılması ile analiz numunelerinin hazırlanması,
- v. Reaktif çalışma karışımı ile suyun karıştırılmasıyla negatif kontrol numunesinin hazırlanması,
- vi. pozitif kontrol numunesi, negatif kontrol numunesi ve analiz numunelerinin 20-30 dakika boyunca 65 °C sıcaklıkta tutulması,
- vii. Numunelerin süre sonunda gözle veya plaka okuyucuyla değerlendirilmesi, kolorimetrik değerlendirmede pembe renkli olmayanların veya floresansla değerlendirmede floresans ışıma yapanların pozitif olarak değerlendirilmesi adımlarını içermesidir.

Burada bahsi geçen “kolorimetrik değerlendirme” ifadesi elde edilen sonuçların gözle veya teknikte bilinen bir cihazla, renk açısından değerlendirilmesini ifade etmektedir. Buluş kapsamında, kolorimetrik değerlendirme, numunelerin gözle incelenmesiyle gerçekleştirilebilir.

Burada bahsi geçen “floresansla değerlendirme” ifadesi bir numunenin floresansının değerlendirilmesini ifade etmektedir. Buluş kapsamında floresansla değerlendirme işlemi floresans spektroskopisi kullanılarak, tekniğin ilgili alanında uzman kişiler tarafından iyi bilinen tekniklerle ölçülebilir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında primer karışımı içerisinde %0.8 ile %1.2 oranında DMSO bulunur.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında primer karışımı içerisinde % 0.08 ile % 0.12 oranında tween20 bulunur.

Buluşa uygun yöntemde ve kit içerisinde yer alan Sars-CoV-2 sentetik nükleokapsit RNA;

- 5 CCCTATGTGTTTCATCAAACGTTTCGGATGCTCGAACTGCACCTCATGGTCAT
GTTATGGTTGAGCTGGTAGCAGAACTCGAAGGCATTTCAGTACGGTCGTAG
TGGTGAGACACTTGGTGTCTTGTCCCTCATGTGGGCGAAATACCAGTGG
CTTACCGCAAGGTTCTTCTTCGTAAGAACGGTAATAAAGGAGCTGGTGGC
CATAGTTACGGCGCCGATCTAAAGTCATTTGACTTAGGCGACGAGCTTGG
10 CACTGATCCTTATGAAGA (SEQ ID No:7) ile gösterilen dizilime sahiptir.

Buluşa uygun yöntem ve kit içerisinde isteğe bağlı olarak Mg^{+2} iyonu, örneğin $MgSO_4$, dNTP'ler ve bazı tuzlar örneğin 10 mM $(NH_4)_2SO_4$ ve/veya 50 mM KCl bulunabilir.

- 15 Bu temel kavramlar etrafında, buluş konusu ile ilgili çok çeşitli uygulamaların geliştirilmesi mümkün olup, buluş burada açıklanan örneklerle sınırlandırılmaz, esas olarak istemlerde belirtildiği gibidir. Şimdi buluş aşağıda yer alan örneklerle kapsama ilişkin herhangi bir sınırlama yapılmaksızın açıklanacaktır.

20

25