

Kat no: BS-GE-MX24S-100

Gastroenterit RT-qPCR MX-24S Panel



Kullanım Kılavuzu



100 Test

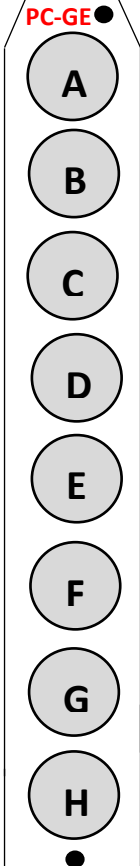
1. Kit içeriği

Raf Ömrü: 18 ay; kutunun üzerindeki son kullanma tarihine bakınız. Depolama sıcaklığında saklanan her bir reaktif, tüp üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Kitin son kullanma tarihi reaktiflerin son kullanma tarihine göre belirlenmektedir.

Tablo 1a. Kit içeriği

Saklama Sıcaklığı: -20°C, Taşıma Sıcaklığı: +2-8°C					
Bileşen	Miktar (100 Test)	İçerik/Kullanım Amacı			
2X Prime Script Mix	140 Tüp x 90 µL	DNA polimeraz, dNTP miqs, reaksiyon tamponu, ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitörü (Her örnek için 1 adet)			
NTC	2 x 1000 µL	Negatif Kontrol (Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.)			
GE Strip	120 Adet		A: SAPO Oligo Mix	FAM	Sapovirus (GI/ GII/ GIV/ GV)
				HEX	Dahili Kontrol (IC); insan <i>RnaseP</i>
			ROX	-	
			CY5	-	
			B: GCE Oligo Mix	FAM	Giardia lamblia
				HEX	-
				ROX	Entamoeba histolytica
			CY5	Cryptosporidium spp.	
			C: YPC Oligo Mix	FAM	<i>Yersinia enterocolitica</i>
				HEX	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
				ROX	-
			CY5	Cyclospora cayetanensis	
			D: ANRA Oligo Mix	FAM	Astrovirus
				HEX	Norovirus (GI/ GII)
				ROX	Rotavirus (A)
				CY5	Adenovirus
			E: CVVS Oligo Mix	FAM	<i>Salmonella</i> spp.
				HEX	<i>Campylobacter</i> spp.
				ROX	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
				CY5	<i>Vibrio cholerae</i>
			F: ET1 Oligo Mix	FAM	<i>Shigella</i> / Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)
				HEX	-
				ROX	Enteraggregative <i>E. coli</i> (EAEC)
				CY5	Shiga toxin producing <i>E. coli</i> (STEC)
			G: ET2 Oligo Mix	FAM	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)
				HEX	-
				ROX	-
				CY5	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)
			H: CTX Oligo Mix	FAM	<i>Clostridium difficile</i> toxin B
				HEX	-
				ROX	<i>Clostridium difficile</i> toxin A
				CY5	<i>Clostridium difficile</i> Binary toxin A/B

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

		Strip	İçerik (Reaktif stabilite kontrolü için, her işletimde test ediniz)
PC-GE Strip	20 Adet		A: Pozitif Kontrol Template + SAPO Oligo Mix
		B: Pozitif Kontrol Template + GCE Oligo Mix	
		C: Pozitif Kontrol Template + YPC Oligo Mix	
		D: Pozitif Kontrol Template + ANRA Oligo Mix	
		E: Pozitif Kontrol Template + CVVS Oligo Mix	
		F: Pozitif Kontrol Template + ET1 Oligo Mix	
		G: Pozitif Kontrol Template + ET2 Oligo Mix	
		H: Pozitif Kontrol Template + CTX Oligo Mix	

Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Olan Cihaz ve Ekipmanlar

1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate ≥ 3 °C/sec.
2. 1-10 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve Rnaz içermeyen)
3. Spin Santrifüj: min.3000 rpm (8'li strip ve 2 mL mikrotüp ile uyumlu)
4. Vorteks

- Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:**
5. PCR kurulumu için UV kabini
 6. Soğuk Tüp standı (2 mL ve 0.2 mL)
 7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.

2. Kullanım Amacı ve Test Prensibi

Akut gastroenterit; ishal, bulantı, kusma, ateş, karın ağrısı, tenesmus, özellikle çocuklarda ve yaşlılarda dehidratasyon bulguları ile seyreden klinik tablodur. Çocuklarda ve yaşlılarda morbidite ve mortalite oranları yüksektir ve uygun tedavi için etkenin hızlı ve doğru tanısı gereklidir. Kit, Tablo 1'de verilen bakteriyel, viral ve parazitik etkenlerin klinik örneklerde hızlı ve doğru tanısı amacıyla kullanılmaktadır. Kit, dışkı örneklerinden elde edilen nükleik asit izolatlarına uygulanmaktadır. Kit ile hızlı tanı, hedef etkene özgü genomik RNA ve DNA bölgelerini hedefleyen tek adımda ters transkripsiyon (RT) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) (RT-qPCR) ile gerçekleştirilmektedir. **Kit ile tanı 60 dakikadan kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir.**

3. Kitin Analitik Özellikleri

Kit, Roche LightCycler® 96, ABI 7500 / 7500 Fast (Thermo), Bio-Rad CFX96 Touch™, Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex Real Time PCR Sistemleri ile valide edilmiştir ve bu sistemler ile tam uyumludur. Tablo 1'de verilen etkenlerin referans suşları ve saha izolatları üzerinde yapılan analitik spesifikite çalışmalarında herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmemiştir. Kitin tespit limiti (LoD), %95 ihtimalle tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonudur. Kitin tüm hedefler için tespit limiti (LoD) 1 kopya genom/reaksiyon'dur. Kit, RINA™ Robotik Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Kat No: RN-NA-101) ve Bio-Speedy® Dışkıdan Nükleik Asit İzolasyon Kiti (Kat No: BS-NA-104-100) ile kullanıldığında, klinik dışkı örneklerinde yer alan DNA hedefleri için LoD değeri 10 kopya etken/mL; RNA hedefleri için LoD değeri 100

kopya etken/mL'dir. Kitin rölatif duyarlılığı ve özgüllüğü Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) protokollerine uygun şekilde, 500 klinik örnek üzerinde test edilmiştir. Kitin rölatif duyarlılığı %97, rölatif özgüllüğü ise %95' dir.

4. Uyarılar

1. Kiti nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampliconlarından uzakta saklayınız.
2. Kit bileşenlerini farklı lot numaralarıyla veya aynı adı taşıyan ancak farklı üreticilere ait kimyasallarla karıştırmayınız.
3. Mümkünse, PCR'yi soğuk blokta kurunuz.
4. qPCR karışımlarının tüplere dağıldığı alan ve tüplere kalıp nükleik asitlerin eklendiği alanın ayrı odalarda veya farklı tezgahlarda olması sağlanmalıdır.
5. Stripler, nükleik asit dağıtıldıktan sonra PCR cihazına yüklenmeli ve duvarda kalan sıvı, spin santrifüj ile altta toplanmalıdır.
6. Sıvı transferleri dışında template nükleik asit ve pozitif kontrol tüplerini her zaman kapalı tutunuz.
7. Testin yapıldığı oda, tezgah ve cihazların silinebilir yüzeylerini %10 NaClO ile düzenli olarak temizleyiniz.
8. qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüplerini laboratuvarında açmadan uzaklaştırınız.

5. RT-qPCR Uygulama Protokolü

Reaksiyon kurulumunu Tablo 2'de belirtildiği gibi gerçekleştiriniz ve qPCR aletini Tablo 3'e göre programlayınız. qPCR tüplerini kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve çalışmayı başlatınız.

Tablo 2. Reaksiyon Kurulumu

Reaksiyon Tipi	Kullanılacak Strip	1 adet 2X Prime Script Mix tüpünün içerisine aşağıda verilen miktarlarda örnek eklenir, pipetajla karıştırılır, sağ kolonda verilen miktarda strip kuyularına dağıtılır		8 strip kuyusuna dağıtılacak miktar
Hasta Numunesi	GE Her hasta için 1 strip	2X Prime Script Mix	90 µL	15 µL
		Hasta örneği nükleik asit ekstraktı	45 µL	
		Toplam	135 µL	
Negatif Kontrol (NTC)	GE Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	90 µL	15 µL
		NTC	45 µL	
		Toplam	135 µL	
Pozitif Kontrol (PC)	PC-GE Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	90 µL	10 µL

Tablo 3. Real-Time PCR Programı; Reaksiyon hacmini 20 µL olarak ayarlayınız.

Ters Transkripsiyon 1 Döngü	Ön İnkübasyon- 1 döngü	Çoğalma- 40 döngü		
		Denatürasyon	Bağlanma ve Uzama	Floresan Okuma
52 °C- 5 dk	95 °C- 180 sn	95 °C- 10 sn	55 °C- 30 sn	FAM/HEX/ROX/Cy5*

* Okuma için farklı enstrümanlardaki alternatif boya lar: FAM: GREEN, HEX: YELLOW/VIC, ROX: ORANGE/TEXAS RED, CY5: RED

6. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold döngü sayısını (Cq) hesaplamak için önerilen threshold seviyesi *Insta Q96® Plus* ve *CFX96 Touch™* cihazları için 200 RFU'dur. Threshold seviyesi *Roche LightCycler® 96* için 0,05'tir. *Rotor-Gene® Q'da* Cq hesaplamak için; "Dynamic Tube" etkin olmalı, "Slope Correct" pasif, "Outlier Removal" seçeneği "0" olmalı ve eşik seviyesi 0,02 olarak ayarlanmalıdır. *BMS MIC* qPCR için, "Non-Assay Green/Parameters/Dynamic" seçenekleri seçilmeli, auto-threshold ayarı etkin olmalıdır.

Amplifikasyon eğrilerinin şekli incelenmelidir. Cihazın yazılımı tarafından bir numuneye bir Cq değeri atanmışsa ve eğri sigmoidal ise, Cq değeri son değerlendirmede kullanılabilir. **Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak kaydedilmelidir.** Bir numuneye bir Cq değeri atanmışsa, ancak eğri sigmoidal değilse, **sonuç negatif olarak kaydedilmelidir.**



UYARI: QR kod ile bağlantısı verilen web sayfasında, farklı cihaz tipleri için, sigmoidal ve sigmoidal olmayan eğri örnekleri verilmiştir. Bu örnekler incelenmeden, bu kit ile elde edilen sonuçlar **KESİNLİKLE** yorumlanmamalıdır.

Tablo 4. Kit kontrollerinin beklenen performansı

Kontrol Türü	İsmi	Kontrol Amacı	Beklenen Sonuç	
NTC eklenmesi	NTC	Kontaminasyon kontrol	Cq Yok = Geçerli	
Template ekleme yok	NRC	Reaktif kontaminasyon kontrol	Cq Yok = Geçerli	
PC eklenmesi	PC	Pozitif reaktif kontrol	Cq<38.0 = Geçerli	
RNase-P	IC	Örneklem, RNA bütünlüğü, nükleik asit ekstraksiyonu, ve ters transkripsiyon ve qPCR inhibisyonu kontrolü	Cq≤34.0 = Geçerli	IC Cq ≥34.0, ise fakat hedef Cq≤38.0 ise, IC geçerli

Herhangi bir kontrol yukarıda açıklandığı gibi çalışmazsa, çalışma geçersiz sayılır ve test tekrarlanır.

- Geçersiz PC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
- Geçersiz NRC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
- Geçersiz NTC: "Uyarılar" bölümüne dikkat ederek analizi tekrarlayınız.
- Geçersiz IC: Tablo 2'deki reaksiyon bileşenlerinin oranlarını koruyarak reaksiyon hacmini 50 µL'ye yükseltip, analizi tekrarlayınız. Sorun devam ederse, PCR template'i geçersiz olarak kabul ediniz.

Tüm kontroller geçerliyse, sonuçların yorumlanmasına geçiniz.

- Gen hedeflerinin Cq değeri <38 ise, **pozitif** olarak sonuçlandırınız.
- Gen hedeflerinin Cq değeri ≥38 ise, **negatif** olarak sonuçlandırınız.

Hedeflerin kanalında eşğin altında şüpheli bir sigmoidal eğri paternine sahip numuneler için IC'nin Cq değeri incelenmelidir. IC Cq≤34 ise, numune negatif olarak rapor edilmelidir. Cq>34 ise, numune dondurulup çözüldükten sonra test tekrarlanmalıdır. Dondur- çözden sonra problem devam ederse yeni bir numune istenmelidir.

7. Üretici ve Teknik Destek



Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Limitet Şirketi

Adres: İTÜ ARI Teknokent 3, 4/B-105, 34467. Sarıyer, İstanbul, TÜRKİYE.

Tel: +90 (212) 285 10 17

Faks: +90 (212) 285 10 18

Web: www.bioeksen.com.tr

e-mail: info@bioeksen.com.tr, support@bioeksen.com.tr