

Kat no: BS-ME-MX17S-100

# Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Panel



Bio-Speedy®

## Kullanım Kılavuzu



### 100 Test

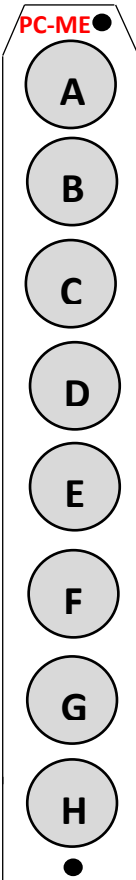
#### 1. Kit içeriği

**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 70 µL	DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu, ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitörü (Her örnek için 1 adet)				
NTC	2 x 1000 µL	Negatif Kontrol ( <b>Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işleimde test ediniz.</b> )				
ME Strip	120 Adet	Strip	Kuyu İçerik	Kanal	Hedef	
		A	A: CNG Oligo Mix	FAM	-	
				HEX	IC; Internal Kontrol, (İnsan RNase P geni)	
				ROX	-	
				CYS	Cryptococcus gattii/neoformans	
			B	B: LNS Oligo Mix	FAM	Listeria monocytogenes
					HEX	-
					ROX	Neisseria meningitidis
					CYS	Streptococcus pneumoniae
		C	C: HES Oligo Mix	FAM	Haemophilus influenza	
				HEX	-	
				ROX	Streptococcus agalactiae	
				CYS	Escherichia coli_K1	
		D	D: CPEV Oligo Mix	FAM	Cytomegalovirus	
				HEX	Enterovirus	
				ROX	Parechovirus	
				CYS	Varicella Zoster Virus	
		E	E: HSV Oligo Mix	FAM	Herpes simplex virüs 1	
				HEX	-	
				ROX	-	
				CYS	Herpes simplex virüs 2	
		F	F: HV Oligo Mix	FAM	Human Herpesvirus 6	
				HEX	-	
				ROX	Human Herpesvirus 7	
				CYS	Human Herpesvirus 8	
		G	G: Boş	FAM	-	
				HEX	-	
				ROX	-	
CYS	-					
H	H: Boş	FAM	-			
		HEX	-			
		ROX	-			
		CYS	-			

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

		Strip	İçerik (Reaktif stabilite kontrolü için, her işletimde test ediniz)
PC-ME Strip	20 Adet		A: Pozitif Kontrol Template + CNG Oligo Mix
		B: Pozitif Kontrol Template + LNS Oligo Mix	
		C: Pozitif Kontrol Template + HES Oligo Mix	
		D: Pozitif Kontrol Template + CPEV Oligo Mix	
		E: Pozitif Kontrol Template + HSV Oligo Mix	
		F: Pozitif Kontrol Template + HV Oligo Mix	
		G: Boş	
		H: Boş	

#### Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Olan Cihaz ve Ekipmanlar

1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate  $\geq 3$  °C/sec.
2. 1-10  $\mu$ L 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 Prensipleri

Enfeksiyöz nörolojik bozukluk (menenjit, ensefalit, miyelit, radikülit, ventrikülit, serebrit, serebral ya da spinal apse, kist, ekstradural apse, diskrit, granulom, postenfeksiyöz ensefalit/serebellit/myelit ya da radikülönöropati) belirtileri belli bir etkeni işaret etmeyebilir ve etkenin konvansiyonel yöntemlerle izolasyonu zordur. Bu gibi durumlarda etkenin hızlı ve doğru tanısı, uygun tedavi için gereklidir. Kit, Tablo 1'de verilen bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyöz nörolojik bozukluk etkenlerinin klinik örneklerde hızlı ve doğru tanısı amacıyla kullanılmaktadır. Kit beyin omurilik sıvısı (BOS) 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 **40 dakikadan kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir.**

## 3. Kitin Analitik Özellikleri

Kit, Roche LightCycler® 96, Bio-Rad CFX96 Touch™, Cobas Z 480, Himedia Insta Q96 Plus Real Time PCR Sistemleri ile valide edilmiştir ve tam uyumludur. Tablo 1'de verilen etkenlerin referans suşları ve saha izolatları üzerinde yapılan analitik özgüllük çalışmalarında çapraz reaksiyon gözlenmemiştir. Kitin tespit limiti (LoD), %95 ihtimalle tespit edilebilen en düşük analitik konsantrasyonudur. Kitin tüm hedefler için tespit limiti (LoD) 1 kopya genom/reaksiyon' dur. Kit; RINA™ M14 Viral Nükleik Asit İzolasyon Sistemi ve Kiti (Kat No: RN-NA-101) ve Bio-Speedy® Viral Nükleik Asit İzolasyon Kiti (Kat No: BS-NA-109-100-VN) ile kullanıldığında, klinik BOS 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 %100, rölatif özgüllüğü ise %97'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 laboratuvarda 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	ME Her hasta için 1 strip	2X Prime Script Mix	70 µL	15 µL
		Hasta örneği nükleik asit ekstraktı	35 µL	
		Toplam	105 µL	
Negatif Kontrol (NTC)	ME Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	70 µL	15 µL
		NTC	35 µL	
		Toplam	105 µL	
Pozitif Kontrol (PC)	PC-ME Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	70 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- 10 sn	95°C- 1 sn	55 °C- 1 sn	FAM/HEX/ROX /Cy5*

\* Okuma için farklı enstrümanlardaki alternatif boya: 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