

Kat No: BS-ME-MX17S-100

Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Panel



Kullanım Talimatı

100 Test

1. Kit İçeriği

Raf ömrü: 12 ay; kutunun üzerindeki son kullanma tarihine bakınız. Depolama sıcaklığında saklanan her bir reaktif, 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 tüp)			
ME Strip	120 Adet		A: CNG Oligo Mix	FAM	-
				HEX	IC; Internal Kontrol, (insan RNase P geni)
				ROX	-
				CY5	Cryptococcus gattii/neoformans
			B: LNS Oligo Mix	FAM	Listeria monocytogenes
				HEX	-
				ROX	Neisseria meningitidis
				CY5	Streptococcus pneumoniae
			C: HES Oligo Mix	FAM	Haemophilus influenza
				HEX	-
				ROX	Streptococcus agalactiae
				CY5	Escherichia coli K1
			D: CPEV Oligo Mix	FAM	Cytomegalovirus
				HEX	Enterovirus
				ROX	Parechovirus
				CY5	Varicella Zoster Virus
			E: HSV Oligo Mix	FAM	Herpes simplex virüs 1
				HEX	-
				ROX	-
				CY5	Herpes simplex virüs 2
			F: HV Oligo Mix	FAM	Human Herpesvirus 6
				HEX	-
				ROX	Human Herpesvirus 7
				CY5	Human Herpesvirus 8
			G: Boş	FAM	-
				HEX	-
				ROX	-
				CY5	-
H: Boş	FAM	-			
	HEX	-			
	ROX	-			
	CY5	-			

Saklama Sıcaklığı: -20°C, Taşıma Sıcaklığı: 2- 8°C			
NTC	2 x 1000 µL	Negatif Kontrol Template (Nükleaz içermeyen su) (Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.)	
PC-ME Strip	20 Adet	Strip	
		İçerik (Reaktif stabilite kontrolü için, her işletimde test ediniz)	
		PC-ME ●	
		A	A: Pozitif Kontrol + CNG Oligo Mix
		B	B: Pozitif Kontrol + LNS Oligo Mix
		C	C: Pozitif Kontrol + HES Oligo Mix
		D	D: Pozitif Kontrol + CPEV Oligo Mix
		E	E: Pozitif Kontrol + HSV Oligo Mix
		F	F: Pozitif Kontrol + HV Oligo Mix
G	G: Boş		
H	H: Boş		

Tablo 1c. Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar

Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar	
1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate ≥ 3 °C/sec.	Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:
2. 1-10 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve Rnaz içermeyen)	5. PCR kurulumu için UV kabini
3. Spin Santrifüj: min.3000 rpm (8'li strip ve 2 mL mikrosantrifüj tüpü ile uyumlu)	6. Soğuk Tüp standı (mikrosantrifüj tüpleri ve PCR tüp/stripleri için)
4. Vorteks	7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.

2. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensibi

Enfeksiyöz nörolojik bozukluk (menenjit, ensefalit, miyelit, radikülit, ventrikülit, serebrit, serebral ya da spinal apse, kist, ektradural apse, diskrit, granülom, postenfeksiyöz ensefalit/serebellit/myelit ya da radikülönöropati) belirtileri belli bir etkeni işaret etmeyebilir ve etkenin konvansiyonel yöntemlerle izolasyonu zordur. Bundan dolayı da uygun tedavinin hızlı bir şekilde uygulanabilmesi için etkenin hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi gerekmektedir. **"Bio-Speedy® Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Panel"** Tablo 1a'da verilen viral, bakteriyel ve fungal etkenlerin 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 **45 dakikadan kısa bir sürede** gerçekleştirilebilmektedir. İnsan *RNase P* oligo seti, mRNA'daki ekzon-ekzon birleşimini hedefleyip insan genomunu hedeflememektedir. Bu nedenle örneklem, RNA stabilitesi, nükleik asit ekstraksiyonu ve hem qPCR hem de ters transkripsiyonun inhibisyonunu kontrol etmek için kullanılır.

"Bio-Speedy® Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Panel" kiti **"vNAT® Viral Nükleik Asit Tamponu (BS-NA-510)"** ve **"RINATM M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Robotu (RINA-M14-01)"** ve **"RINA™ Robotik Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Kat #: RN-NA-101)"** ile valide edilmiştir.

3. Kitin Analitik Özellikleri

"Bio-Speedy® Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Panel", *Bio-Rad CFX96 Touch™* Real Time PCR Sistemi ile 20 µL qPCR hacim için valide edilmiştir. Tablo 1a'da verilen etkenlerin referans suşları ve saha izolatları üzerinde yapılan analitik spesifikite çalışmalarında herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmemiştir. Kitin içerdiği oligonükleotid setlerinin tespit limiti (LoD), dahil edicilik ve dışlayıcılık çalışmaları T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı (HSGM) tarafından gerçekleştirilmiştir. 200 adet farklı klinik örnek ile testin analitik duyarlılığı %100,00 ve özgüllüğü %98,24 olarak belirlenmiştir. Kitin HSGM tarafından belirlenen LoD değerleri *Cryptococcus gattii/neoformans* için 33/57 kopya/mL, *Listeria monocytogenes* için 68 kopya/mL, *Neisseria meningitides* için 91

Sadece *in vitro* diagnostik kullanım içindir.

Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.

kopya/mL, *Streptococcus pneumoniae* için 74 kopya/mL, *Haemophilus influenzae* için 71 kopya/mL, *Streptococcus agalactiae* için 59 kopya/mL, *Escherichia coli K1* için 77 kopya/mL, *Cytomegalovirus* için 63 kopya/mL, *Enterovirus* için 81 kopya/mL, *Parechovirus* için 82 kopya/mL, *Varicella Zoster Virus* için 79 kopya/mL, *Herpes simplex virüs 1* için 32 kopya/mL, *Herpes simplex virüs 2* için 24 kopya/mL, *İnsan Herpesvirus 6* için 91 kopya/mL, *İnsan Herpesvirus 7* için 66 kopya/mL ve *İnsan Herpesvirus 8* için 56 kopya/mL olarak belirlenmiştir.

Bio-Rad CFX 96 cihazında şeffaf reaksiyon tüplerinin, beyaz tüplere kıyasla 5-10 kat daha düşük floresans sinyali ile sonuç verdiği tespit edilmiştir. Kiti belirtilen analitik performansı yalnızca valide beyaz tüpler kullanılarak elde edilebilir.

4. Nükleik Asit Ekstraktlarının Toplanması, Saklanması ve Transferi

Beyin omurilik sıvısı (BOS) örnekleri, 2-3 mL viral taşıma besiyeri (VTM) içeren steril bir taşıma tüpüne aktarılır. Örnekler en geç 2 gün içinde 2-8°C'de saklanarak laboratuvara ulaştırılmalıdır. Eğer sevkியatta bir gecikme bekleniyorsa, numuneler -70°C'de dondurulmalı ve kuru buz ile gönderilmelidir. Örneklerin tekrarlanan dondurma-çözdürmeye maruz bırakılmaması önemlidir.

Nükleik asitler, "vNAT® Viral Nükleik Asit Tamponu (BS-NA-510)", "RINATM M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Robotu (RINA-M14-01)" ve "RINA™ Robotik Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Kat #: RN-NA-101)" kullanılarak ekstrakte edilebilirler.

5. 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. Ana stok reaktiflerini PCR kurulumu sırasında soğuk blokta tutunuz.
4. Mümkünse, PCR'yi soğuk blokta kurunuz.
5. Kullanmadan önce kit bileşenlerini yavaşça karıştırınız.
6. qPCR karışımlarını ve template nükleik asitleri pipetlemek için ayrı mikropipetler kullanınız.
7. Sıvı transferleri dışında template nükleik asit ve pozitif kontrol tüplerini her zaman kapalı tutunuz.
8. Testin yapıldığı oda, tezgâh ve cihazların silinebilir yüzeylerini %10 NaClO ile düzenli olarak temizleyiniz.
9. qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüplerini laboratuvarında açmadan uzaklaştırınız.

6. 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-10 sn	FAM/HEX/ROX/CY5

7. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold döngü sayısını (Cq) hesaplamak için önerilen threshold seviyesi CFX96 Touch™ cihazı için 200 RFU'dur.

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

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- çözen sonra problem devam ederse yeni bir numune istenmelidir.



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
İnsan mRNA*	IC	Örnekleme, 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

* internal kontrolün bulunduğu multipleks reaksiyonda herhangi bir etken pozitif çıktığında internal kontrol (IC) negatif çıksa dahi hedef pozitif olarak yorumlanır. internal kontrolün bulunduğu multipleks reaksiyonda herhangi bir etken pozitif değil ise internal kontrol (IC) pozitif sonuç vermelidir.

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: 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.

8. Sınırlamalar

- Bio-Speedy® Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Panel'in performansı sadece BOS örnekleri için belirlenmiştir.
- Bio-Speedy® Menenjit/Ensefalit RT-qPCR MX-17S Panel'in hedeflediği bölge içindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyerek hedef virüs, bakteri veya mantarın varlığının saptanamamasına neden olabilir.
- Numune toplanması, taşınması veya işlenmesi sırasında yapılan hatalar, yanlış negatif sonuçlara yol açabilir.
- İnhibitörler veya diğer enterferans etkenler yanlış negatif sonuç alınmasına neden olabilir. Numunede yetersiz sayıda hedef organizma bulunduğu durumlarda da yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir.

9. Sembollerin Açıklaması

Sembol	Anlam	Sembol	Anlam	Sembol	Anlam
	Avrupa Uygunluğu CE işareti		In Vitro Teşhis Kullanımı için		Güneş ışığından uzak tutun
	Üretici		Lot numarası		Isı ve radyoaktif kaynaklardan koruyun
	Son Kullanım Tarihi YYYY-AA		Katalog Numarası		Paket hasarlıysa kullanmayınız ve kullanım talimatlarına bakınız.
	Negatif Kontrol		Steril Değil		Su/ Nem uzak tutun
	Pozitif Kontrol		Kullanım Talimatlarına bakın veya elektronik kullanım talimatlarına bakın		Kırılabilir dikkatli taşıyınız
	Sıcaklık sınırı (Saklama sıcaklığı)		Dikkat		Dik tutun

10. Üretici ve Teknik Destek



Bioeksen AR-GE Teknolojileri Anonim Şirketi
Adres: Reşitpaşa Mh., Katar Cd., 4/B-105, 34469, Sarıyer, İstanbul, TÜRKİYE
Tel: +90 (212) 285 10 17, Faks: +90 (212) 285 10 18
Web: www.bioeksen.com.tr, E-posta: info@bioeksen.com.tr

Teknik destek: support@bioeksen.com.tr

Kullanıcıya Bildirim: Ürün ile ilişkili olumsuz olayları 24 saat içerisinde "vigilance@bioeksen.com.tr" adresinden tarafımıza iletiniz.

TÜM HAKKI SAKLIDIR