

Cat no: BS-SY-MX24S-100

# Solunum Yolu RT-qPCR MX-24S Panel



## Kullanım Kılavuzu

### 100 Test

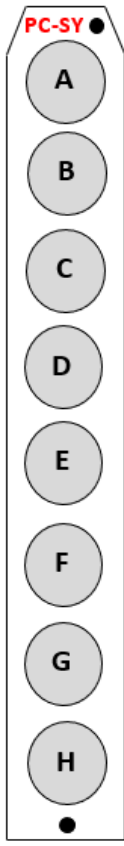
#### 1. Kit içeriği

**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°C- +8°C					
Bileşen	Miktar (100 Test)	İçerik/Kullanım Amacı			
2X Prime Script Mix	140 Tüp x 90 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 işletimde test ediniz.</b> )			
SY Strip	120 Adet		A: COVID/Flu Oligo Mix	FAM	SARS-CoV-2
				HEX	İnternal Kontrol
			B: COR Oligo Mix	ROX	İnfluenza B
				CY5	İnfluenza A
				FAM	İnsan Corona 229E
			C: PAR Oligo Mix	HEX	İnsan Corona OC43
				ROX	İnsan Corona NL63
				CY5	İnsan Corona HKU1
			D: MEA Oligo Mix	FAM	Parainfluenza 1
				HEX	Parainfluenza 2
				ROX	Parainfluenza 3
				CY5	Parainfluenza 4
			E: BPR Oligo Mix	FAM	Metapneumoviruses (MPV)
				HEX	Enterovirus
				ROX	
			F: LMC Oligo Mix	CY5	Adenovirus
				FAM	Bocavirus (BoV)
				HEX	
			G: HBS Oligo Mix	ROX	Parechovirus
				CY5	Rhinovirus
				FAM	<i>Legionella pneumophila</i>
			H: RSV Oligo Mix	HEX	
				ROX	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
				CY5	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
				FAM	<i>Haemophilus influenzae</i>
				HEX	
				ROX	<i>Bordetella pertussis</i>
				CY5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
				FAM	
				HEX	
				ROX	Respiratory syncytial virus (RSV) A/B
				CY5	

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

		Strip	İçerik (Reaktif stabilite kontrolü için, her işletimde test ediniz)
<b>PC-SY Strip</b>	20 Adet		A: Pozitif Kontrol Template + COVID/Flu Oligo Mix
		B: Pozitif Kontrol Template + COR Oligo Mix	
		C: Pozitif Kontrol Template + PAR Oligo Mix	
		D: Pozitif Kontrol Template + MEA Oligo Mix	
		E: Pozitif Kontrol Template + BPR Oligo Mix	
		F: Pozitif Kontrol Template + LMC Oligo Mix	
		G: Pozitif Kontrol Template + HBS Oligo Mix	
		H: Pozitif Kontrol Template + RSV Oligo Mix	

#### Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Olan Cihaz ve Ekipmanlar

- |  |   |
|--|---|
| 1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate $\geq 3$ °C/sec.           | <b>Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:</b> |
| 2. 1-10 $\mu$ L 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 mikrotüp ile uyumlu) | 6. Soğuk Tüp standı (2 mL ve 0.2 mL)            |
| 4. Vorteks   | 7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.   |

## 2. Kullanım Amacı ve Test Prensibi

Kit, Tablo 1'de verilen viral ve bakteriyel etkenlerin klinik örneklerde hızlı ve doğru tanısı amacıyla kullanılmaktadır. Kit, nazofaringeal sürüntü, nazofaringeal aspirat/lavaj, boğaz sürüntüsü, bronkoalveolar lavaj ve balgam numunelerinden 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, Bio-Rad CFX96 Touch™, Cobas Z 480, Insta Q96 Plus (HiMedia) 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 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. Solunum yolu enfeksiyonu pozitifliği doğrulanmış 991 farklı klinik örnek ile testin **analitik duyarlılığı (sensitivite) %97.3, özgüllüğü (spesifite) %96.3** olarak belirlenmiştir. Kitin HSGM tarafından belirlenen LoD değerleri Influenza A virus için 6.6; Influenza A H1 virus için 8.3; Influenza B virüs için 8.8; Coronavirus 229E için 6.2; Coronavirus OC43 için 6.8; Coronavirus NL63 için 9.4; Parainfluenza 1 virus için 7.5; Parainfluenza 2 virus için 9.1; Parainfluenza 3 virus için 5.3;

Parainfluenza 4 virus için 8.8; Metapneumovirus için 6.4; Respiratory syncytial virus A/B için 9.7; Rhinovirus için 9.7; Bocavirus için 8.3; Enterovirus için 7.1; Parechovirus için 5.9; Adenovirus için 6.2; *Mycoplasma pneumoniae* için 6.2; *Bordetella pertusis* için 3 kopya genom/reaksiyon olarak belirlenmiştir. Kitin tespit limiti (LoD), %95 ihtimalle tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonudur. 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 nazofaringeal sürüntü, nazofaringeal aspirat/lavaj, boğaz sürüntüsü, bronkoalveolar lavaj ve balgam örneklerinde bulunan DNA hedefleri için LoD değeri 10 kopya etken/mL; RNA hedefleri için LoD değeri ise 100 kopya etken/mL'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	SY 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)	SY Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	90 µL	15 µL
		NTC	45 µL	
		Toplam	135 µL	
Pozitif Kontrol (PC)	PC-SY 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- 10 sn	95 °C- 1 sn	55 °C- 1 sn	FAM/HEX/ROX/Cy5

\* Okuma için farklı enstrümanlardaki alternatif boyalar: 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'ı 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

TÜM HAKLARI SAKLIDIR