

Kat no: BS-SY-MX24T-100

# Solunum Yolu RT-qPCR MX-24T Panel



## Kullanım Kılavuzu



### 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	İçerik/Kullanım Amacı	
2X Prime Script Mix	4 x 1250 µL	DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu, ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitörü (Her örnek için 1 adet)	
CVD19/FLU Oligo Mix	1 x 500 µL	<b>Kanal</b>	<b>Hedef</b>
		FAM	SARS CoV-2 N (Nükleokapsid geni)
		HEX	IC; Internal Kontrol, (İnsan RNase P geni)
		ROX	Influenza B
COR Oligo Mix	1 x 500 µL	CY5	Influenza A
		FAM	İnsan Corona 229E
		HEX	İnsan Corona OC43
		ROX	İnsan Corona NL63
PAR Oligo Mix	1 x 500 µL	CY5	İnsan Corona HKU1
		FAM	Parainfluenza 1
		HEX	Parainfluenza 2
		ROX	Parainfluenza 3
MRE Oligo Mix	1 x 500 µL	CY5	Parainfluenza 4
		FAM	İnsan Metapneumovirüs (HMPV)
		HEX	Enterovirus/Rhinovirus
		ROX	-
BPA Oligo Mix	1 x 500 µL	CY5	Rinovirüs/ Enterovirus
		FAM	İnsan Bocavirüs (HBoV)
		HEX	-
		ROX	İnsan Parechovirüs (HPeV)
LMC Oligo Mix	1 x 500 µL	CY5	Adenovirüs (AV)
		FAM	Legionella pneumophila
		HEX	-
		ROX	Mycoplasma pneumoniae
HIS Oligo Mix	1 x 500 µL	CY5	Chlamydomydia pneumoniae
		FAM	Haemophilus influenzae
		HEX	-
		ROX	Bordetella pertussis
RSV Oligo Mix	1 x 500 µL	CY5	Streptococcus pneumoniae
		FAM	-
		HEX	-
		ROX	Respiratuvar Sinsitiyal Virüs A/B
		CY5	-

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

Saklama sıcaklığı: +2-8°C/-20°C; Taşıma Sıcaklığı:+2-8°C/-20°C		
Bileşenler donuk ise, ilk defa çözüldükten sonra bir daha dondurulmadan +2-8°C' de saklanmalıdır.		
Bileşen	Miktar	İçerik/Kullanım Amacı
NTC	2 x 1000 µL	Negatif Kontrol <b>Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>
PC-CVD19/FLU	1 x 200 µL	Pozitif Kontrol: SARS-CoV-2, Influenza A/B, insan RnaseP genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>
PC-COR	1 x 200 µL	Pozitif Kontrol: Sentetik Corona 229E/OC43/NL63/HKU1 genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>
PC-PAR	1 x 200 µL	Pozitif Kontrol: Sentetik Parainfluenza 1/2/3/4 genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>
PC-MRE	1 x 200 µL	Pozitif Kontrol: Sentetik Metapneumovirüs, Enterovirüs ve Rinovirüs genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>
PC-BPA	1 x 200 µL	Pozitif Kontrol: Sentetik Bocavirüs, Parechovirüs ve Adenovirüs genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>
PC-LMC	1 x 200 µL	Pozitif Kontrol: Sentetik Legionella pneumophila, Mycoplasma pneumoniae ve Chlamydia pneumoniae genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>
PC-HIS	1 x 200 µL	Pozitif Kontrol: Sentetik Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis ve Streptococcus pneumoniae genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>
PC-RSV	1 x 200 µL	Pozitif Kontrol: Sentetik Respiratuvar Sinsitiyal Virüs A/B genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>

**PC tüplerinin içerisinde 2X Prime Script Mix, Oligo Mix ve plazmid hazır bulunmaktadır. PCR kuyucuğuna doğrudan 20 µL pipetlenecek kullanılır.**

Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Olan Cihaz ve Ekipmanlar	
1) Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate $\geq 3$ °C/sec	6) 1.5 or 2 mL mikrosantrifüj tüpü
2) 1-10 µL, 10-100 µL 100-1000 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve RNaz içermeyen)	7) PCR cihazına uyumlu reaksiyon tüpleri, kapakları, plate ve plate filmi
3) Spin Santrifüj: min. 3000 rpm	<b>Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:</b>
4) Vorteks	8) PCR kurulumu için UV kabini
5) Nükleaz-içermeyen su / Viral Taşıma Besiyeri / Serum fizyolojik	9) Soğuk Tüp standı (Microsantrifüj ve PCR tüpleri için)
	10) Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

## 2. Kullanım Amacı ve Test Prensipleri

Kit; **SARS-CoV-2**, Influenza (Inf) A/B, İnsan Coronavirüs (HCoV) HKU/NL63/OC43/229E, Parainfluenza (PIV) 1/2/3/4), İnsan Metapneumovirüs (HMPV), İnsan Rinovirüs (HRV), Enterovirüs (EV), İnsan Bocavirüs (HBoV), İnsan Parechovirüs (HPeV), Adenovirüs (AV) Legionella pneumophila, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus pneumoniae ve Respiratuvar Sinsitiyal Virüs (RSV) A/B enfeksiyon olgularının tespitine yardımcı olmak amacıyla kullanılan, kalitatif bir in-vitro tıbbi tanı cihazıdır.

Kit; nazofaringeal aspirat/lavaj, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü ve balgam örneklerinden vNAT™ ekstraksiyon tamponu veya robotik ekstraksiyon sistemleri ile elde edilen nükleik asit ekstraktlarında tek basamaklı ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) ve etken spesifik oligonükleotid setleriyle solunum yolu enfeksiyon etkenlerinin tespit edilmesi ilkesine dayanmaktadır. Kit örneklem, nükleik asit ekstraksiyonu ve inhibisyon kontrolü için insan RNaseP genini hedeflemektedir. Kit ile **numuneden sonuca 50 dakikadan kısa bir sürede** ulaşılabilmektedir.

## 3. Kitin Analitik Özellikleri

Kit RINA™ M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Sistemi (Cihaz Kat No: RINA-M14-01; Kit Kat No: RN-NA-14-111-100) ve Bio-Speedy® vNAT™ Ekstraksiyon Sarfları (vNAT™ Reaktif Kat No: BS-NA-510; vNAT Transfer Tüpü Kat No: BS-NA-513-100) ile elde edilen nükleik asit ekstraktları ve Roche LightCycler® 96, Bio-Rad CFX96 Touch™, Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex, Biomolecularsystems Mic qPCR Cycler Real Time PCR Sistemleri ile 20 ve 50 µL qPCR hacimler için valide edilmiştir. 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) iş birliği ile gerçekleştirilmiştir. Solunum yolu enfeksiyonu pozitifliği doğrulanmış 991 farklı klinik örnek ile testin **analitik duyarlılığı (sensitivite) %97.3, özgüllüğü (spesifite) %96.3** olarak belirlenmiştir. Kit ayrıca, kit içeriğindeki tüm hedef etkenlerle kirlenmiş 150 klinik örnekte FDA onaylı bir kit ile karşılaştırılmış ve sonuçlar %100 uyumlu bulunmuştur. Kitin hedef etkenler için LOD değerleri Inf A 6.6, Inf B 8.8, HCoV 229E 6.2, HCoV OC43 6.8, HCoV NL63 9.4, HCoV HKU1 8.6, PIV-1 7.5, PIV-2 9.1, PIV-3 5.3, PIV-4 8.8, HMPV 6.4, RSV A/B 9.7, HRV 9.7, HBoV 8.3, EV 7.1, HPeV 5.9, AV 6.2, Legionella pneumophila 5.4, Mycoplasma pneumoniae 6.2, Chlamydomphila pneumoniae 5.8, Haemophilus influenzae 4.8, Streptococcus pneumoniae 4.3 ve SARS CoV-2 5.6 genom/reaksiyon olarak belirlenmiştir.

#### 4. Klinik Örneklerin Paketlenmesi ve Taşınması

Sürüntü örnekleri dacron veya polyester swablar kullanılarak toplanmalıdır. Diğer örnek türleri ise steril kaplar ile transfer edilmelidir. Taşıma aşamasında viral taşıma besiyeri (VTM) (Preparation of viral transport medium, Centers for Disease Control and Prevention, SOP#: DSR-052-01) veya Bio-Speedy® vNAT™ Viral Transfer Tüpü (Kat No:BS-NA-513-100) kullanılmalıdır. Örnekler laboratuvara gelene kadar +2-8°C saklanmalı ve taşınmalıdır. Sürüntü örnekleri 5 gün içerisinde, diğer örnek türleri ise 2 gün içerisinde transfer edilmelidir. Gönderide bir gecikme bekleniyorsa, VTM ile gelen örnekler -70 °C'de dondurulmalı ve kuru buz ile gönderimi yapılmalıdır. vNAT™ ile gelen örnekler +2-8°C saklanmalıdır. Örneklerin sürekli don-çöze maruz kalmaması önemlidir.

#### 5. Uyarılar

1. Kit; DNA, RNA kaynaklarından ve qPCR amplikonlarından uzak bir yerde muhafaza edilmelidir.
2. Kit içeriğindeki bileşenler farklı lot numaralı bileşenler ile ya da aynı isimli fakat farklı üreticilere ait kimyasal maddeler ile karıştırılmamalıdır.
3. Ana stok reaktifler PCR kurulumu sırasında, mümkünse soğuk blok üzerinde bekletilmelidir ve PCR kurulumu mümkünse soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmelidir.
4. Kit bileşenleri kullanım öncesinde hafifçe çalkalanarak karıştırılmalıdır.
5. qPCR mikserleri ve kalıp nükleik asitleri pipetlemek için kullanılan mikropipetler mutlaka ayrı olmalıdır.
6. Kalıp nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri, sıvı transferleri dışında sürekli kapalı tutulmalıdır.
7. Analizin gerçekleştirildiği odalar, tezgahlar ve cihazların silinebilir yüzeyleri düzenli olarak %10'luk NaClO (çamaşır suyu) ile temizlenmeli ve ardından distile su ile silinmelidir.
8. qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüpleri laboratuvarında açılmadan bertaraf edilmelidir.

#### 6. RT-qPCR Uygulama Protokolü

Analize başlamadan önce aşağıdaki bilgileri göz önünde bulundurunuz.

1. Kit, sadece toplam qPCR hacminin %25'i kadar olan kalıp nükleik asit hacmi için valide edilmiştir.
2. Kit, periyodik bakım kayıtları olmayan real time PCR cihazlarıyla kullanılmamalıdır.
3. qPCR cihazının üreticisi tarafından tavsiye edilmeyen qPCR plakalarını/striplerini kullanmayınız.
4. **Kontaminasyonu test etmek için, 1) template eklemeyen reaktif kontrolü (NRC) ve 2) NTC ilavesiyle ortam kontrolü amacıyla iki farklı reaksiyon kurunuz.**

qPCR cihazını aşağıda belirtilen şekilde programlayınız ve reaktifleri qPCR tüplerine aşağıda belirtildiği sırasıyla ekleyiniz, tüpleri kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve işletimi başlatınız (Tablo 2).

**Tablo 2.** Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları

Reaksiyon Kurulumu			qPCR Programı		
İçerik	Reaksiyon		Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2X Prime Script Mix	10 µL	25 µL	1	52°C	5 dk
Hedef Oligo Mix	5 µL	12,5 µL	1	95°C	10 sn
Template Nükleik Asit	5 µL	12,5 µL	40	95°C	1 sn
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	20 µL	50 µL		55°C	1 sn
			FAM/HEX/ROX/CYS Okuma*		

\* Okuma için farklı cihazlardaki alternatif boya lar: FAM: GREEN, HEX: YELLOW/VIC, ROX: ORANGE/TEXAS RED, CYS: RED

## 7. 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 3. 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	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

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.**

## 8. 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