

Kat No: BS-SY-MX24T-100

# Solunum Yolu RT-qPCR MX-24T Panel



## Kullanım Talimatı

### 1. Kit İçeriği

**Raf ömrü:** 12 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; Transfer Koşulları: 2-8°C				
İçerik/Kullanım Amacı	Kanal	İçerik	Miktar	Birim Reaksiyon Tüketim
			(20 µL Reaksiyon)	
DNA polimeraz, dNTP miqs, reaksiyon tamponu, ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitörü	-	2X Prime Script Mix	8 x 1000 µL	10 µL
SARS CoV-2 N (Nükleokapsid geni)	FAM	CVD19/FLU Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL
IC; Internal Kontrol, (İnsan RNase P geni)	HEX			
Influenza B	ROX			
Influenza A	CY5			
İnsan Corona 229E	FAM	COR Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL
İnsan Corona OC43	HEX			
İnsan Corona NL63	ROX			
İnsan Corona HKU1	CY5			
Parainfluenza 1	FAM	PAR Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL
Parainfluenza 2	HEX			
Parainfluenza 3	ROX			
Parainfluenza 4	CY5			
İnsan Metapneumovirüs (HMPV)	FAM	MEA Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL
Enterovirus	HEX			
Adenovirüs	CY5			
İnsan Bocavirüs (HBoV)	FAM	BPR Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL
İnsan Parechovirüs (HPeV)	ROX			
Rinovirüs (HRV)	CY5			
Legionella pneumophila	FAM	LMC Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL
Mycoplasma pneumoniae	ROX			
Chlamydomphila pneumoniae	CY5			
Haemophilus influenzae	FAM	HBS Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL
Bordetella pertussis	ROX			
Streptococcus pneumoniae	CY5			
Respiratuvar Sinsitiyal Virüs A/B	ROX	RSV Oligo Mix	1 x 500 µL	5 µL

**Tablo 1b.** Kit içeriği-Kontroller

Saklama Sıcaklığı: 2-8°C; Transfer Sıcaklığı: 2-8°C			
Bileşenler donmuşsa -20°C'de saklayınız. İlk çözündürmeden sonra 2-8°C'de saklayınız.			
No Template Kontrol (Nükleaz İçermeyen Su) <b>Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	NTC	2 x 1000 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: SARS-CoV-2, Influenza A/B, insan RnaseP genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-CVD19/FLU	1 x 200 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: Sentetik Corona 229E/OC43/NL63/HKU1 genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-COR	1 x 200 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: Sentetik Parainfluenza 1/2/3/4 genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-PAR	1 x 200 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: Sentetik Metapneumovirüs, Enterovirüs ve Adenovirüs genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-MEA	1 x 200 µL	5 µL

Pozitif Kontrol: Sentetik Bocavirüs, Parechovirüs ve Rinovirüs genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-BPR	1 x 200 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: Sentetik <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ve <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-LMC	1 x 200 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: Sentetik <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> ve <i>Streptococcus pneumoniae</i> genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-HBS	1 x 200 µL	5 µL
Pozitif Kontrol: Sentetik Respiratuvar Sinsitiyal Virüs A/B genom fragmanı <b>Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.</b>	PC-RSV	1 x 200 µL	5 µL

Tablo 1c. Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar

Kullanıcı tarafından sağlanacak olan cihaz ve ekipmanlar	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Real-Time PCR Cihazı: 4 kanallı, Ramp rate <math>\geq 3</math> °C/sec.</li> <li>2. 1-10 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve Rnaz içermeyen)</li> <li>3. Spin Santrifüj: min.3000 rpm (8'li strip ve 2 mL mikrosantrifüj tüpü ile uyumlu)</li> <li>4. Vorteks</li> </ol>	<b>Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. PCR kurulumu için UV kabini</li> <li>6. Soğuk Tüp standı (mikrosantrifüj tüpleri ve PCR tüp/stripleri için)</li> <li>7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.</li> </ol>

## 2. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipleri

Kit, Tablo 1a'da verilen viral ve bakteriyel etkenlerin klinik örneklerde hızlı ve doğru tanısı amacıyla kullanılmaktadır. Kit, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal aspirat 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 **45 dakikadan kısa bir sürede** gerçekleştirilebilmektedir.

"Bio-Speedy® Solunum Yolu RT-qPCR MX-24T Panel" kiti "vNAT® Viral Nükleik Asit Tamponu (BS-NA-510)", "Bio-Speedy® vNAT® Transfer Tüpü (BS-NA-513-100)" ve "RINA™ M14 Nükleik Asit Ekstraksiyon Robotu (RINA-M14-F)" ile valide edilmiştir. Kit, sağlık hizmeti sunucuları tarafından hastalık şüphesi olan bireylerden alınan nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal aspirat ve balgam örneklerine uygulanır.

## 3. Kitin Analitik Özellikleri

Kit, Bio-Rad CFX96 Touch™, Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler ve HiMedia Insta Q96® Plus Real Time PCR Sistemleri ile 20 µL qPCR hacmi 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 oligonükleotit 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. 573 tanesi pozitif solunum yolu enfeksiyon örneği olan 1152 farklı klinik örnek ile testin analitik duyarlılığı %98,95 ve özgüllüğü %99,13 olarak belirlenmiştir. Kitin HSGM tarafından belirlenen LoD değerleri Influenza A için 66 kopya/mL, Influenza B için 88 kopya/mL, SARS-CoV-2 için 67 kopya/mL, Coronavirus 229E için 62 kopya/mL, Coronavirus OC43 için 68 kopya/mL, Coronavirus NL63 için 94 kopya/mL, Coronavirus HKU1 için 86 kopya/mL, Parainfluenza 1 için 75 kopya/mL, Parainfluenza 2 için 91 kopya/mL, Parainfluenza 3 için 53 kopya/mL, Parainfluenza 4 için 88 kopya/mL, Metapneumovirus için 64 kopya/mL, Enterovirus için 71 kopya/mL, Adenovirus için 62 kopya/mL, Bocavirus için 83 kopya/mL, Parechovirus için 59 kopya/mL, Rhinovirus için 97 kopya/mL, *Legionella pneumophila* için 54 kopya/mL, *Mycoplasma pneumoniae* için 62 kopya/mL, *Chlamydomphila pneumoniae* için 58 kopya/mL, *Haemophilus influenzae* için 48 kopya/mL, *Bordetella pertussis* için 47 kopya/mL, *Streptococcus pneumoniae* için 43 kopya/mL ve Respiratory syncytial virüs A/B için 97 kopya/mL olarak belirlenmiştir. Kitin saptama sınırı (LoD), %95 olasılıkla saptanabilen en düşük analit konsantrasyonudur.

Kit, gerçek zamanlı (RT-qPCR) PCR cihazına özgü reaksiyon tüpleriyle doğrulanmıştır. Kitin belirtilen analitik performansı yalnızca Tablo 2'deki cihaza özgü reaksiyon tüpleri kullanılarak elde edilebilir. Örneğin, Bio-Rad CFX 96 cihazında şeffaf platelerin, beyaz platalere kıyasla en az 10 kat daha düşük floresans sinyali verdiği tespit edilmiştir.

Tablo 2. Valide qPCR cihazına özgü plastik sarf malzemeleri

CFX96 Touch*	Rotor-Gene® Q	MIC-4 qPCR	Insta Q96® Plus
Kat#: 1845098; CFX Kalifikasyon plate ve filmi (96 kuyu)			Kat#: PR19-1x25NO; Hi-media plate (96 kuyu)
Kat#: BS2001 Ultra optik yarı etekli qPCR plate ve filmi (96 kuyu)			Kat#: PR18-1x100NO; Hi-media film (96 kuyu)
			Kat#: ANT-MB0096; Plate (96 kuyu)
Kat#: TLS0851; Beyaz Strip (8 kuyu)	Kat#: 981103; Qiagen Strip Tüpü ve Kapağı 0.1 mL (4 kuyu)	Kat#: 71-107C; BMS MIC qPCR Tüpü ve Kapağı 0.1 mL (4 kuyu)	Kat#: ANT-MB11096; Film (96 kuyu)
Kat#: TCS0803; Ultra Şeffaf Strip ve Kapağı (8 kuyu)			Kat#: PR17-1x200NO; Hi-media Strip ve kapağı (8 kuyu)
Kat#: BS1001; Ultra Optik qPCR Strip ve Kapağı (8 kuyu)			Kat#: ANT-MB02; Strip ve kapağı (8 kuyu)

\*Bio-Rad CFX96 qPCR cihazıyla yalnızca beyaz plate/beyaz strip kullanın!

#### 4. Nükleik Asit Ekstraktlarının Toplanması, Saklanması ve Transferi

Swab örnekleri Dacron veya Polyester swablar kullanılarak toplanmalıdır. Diğer örnek türleri steril kaplarda aktarılmalıdır. Taşıma aşamasında, Viral Taşıma Ortamı (VTM) (Viral taşıma ortamının hazırlanması, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, SOP #: DSR-052-01) veya Bio-Speedy® vNAT® Viral Transfer Tüpleri (Kat No: BS-NA-513-100) kullanılmalıdır. Örnekler laboratuvara gelene kadar 2-8°C'de saklanmalı ve taşınmalıdır. Swab örnekleri 5 gün içinde, diğer örnek türleri 2 gün içinde aktarılmalıdır. Sevkiyatta bir gecikme bekleniyorsa, numuneler -70°C'de dondurulmalı ve kuru buz ile gönderilmelidir. Örneklerin tekrarlanan dondurma-çözdürmeye maruz bırakılmaması önemlidir.

#### 5. Uyarılar

1. Kiti nükleik asit kaynaklarından ve qPCR amplikonlarından 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

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. **Kit ile valide olmayan qPCR plate/strip kullanmayın!** Valide qPCR plate/strip türleri bu kılavuzun "Kitin Analitik Özellikleri" bölümünde verilmiştir.
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 3).

Tablo 3. Reaksiyon kurulumu ve qPCR program detayları

Reaksiyon Kurulumu		qPCR Programı		
İçerik	İçerik	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2X Prime Script Mix	10 µL	1	52°C	5 dk
		1	95°C	10 sn
Hedef Oligo Mix	5 µL	40	95°C	1 sn
			55°C	10 sn
Template Nükleik Asit	5 µL			
TOTAL REACTION VOLUME	20 µL		FAM / HEX / ROX / CYS Okuma	

#### 7. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold döngü sayısını (Cq) hesaplamak için önerilen threshold seviyesi Insta Q96® Plus ve CFX96 Touch™ cihazları için "200" RFU'dur. 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.**

**Hedeflerin kanalında eşiğin 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 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

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

Herhangi bir kontrol Tablo 4'te 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 3'teki 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.

## 8. Sınırlamalar

- Bio-Speedy® Solunum Yolu MX-24T Panel performansı nazofaringeal aspirat, bronkoalveolar lavaj, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü ve balgam örneklerinde belirlenmiştir.
- Kitin hedef bölgelerindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyebilir ve virüsün varlığının tespit edilememesine neden olabilir.
- Numune toplanması, taşınması veya işlenmesi sırasında yapılan hatalar, yanlış negatif sonuçlara yol açabilir.
- Inhibitörler 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		Su/ Nem uzak tutun
	Son Kullanım Tarihi YYYY-AA		Katalog Numarası		Kırılabılır dikkatli taşıyınız
	Sıcaklık sınırı (Saklama sıcaklığı)		Steril değil		Dik tutun
	Negatif Kontrol		Dikkat		Sıcaktan ve Radyoaktivite kaynaklarından uzak tutun
	Pozitif Kontrol		Kullanım Talimatlarına bakın veya elektronik kullanım talimatlarına bakın		Paket zarar gördüyse kullanmayın ve üretici ile iletişime geçin

## 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](mailto:vigilance@bioeksen.com.tr)” adresinden tarafımıza iletiniz.

TÜM HAKKI SAKLIDIR