

Kat No: BS-GE-MX24S-100

# Gastroenterit RT-qPCR MX-24S 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	10 x 1250 µL	DNA polimeraz, dNTP Mix, reaksiyon tamponu, ters transkriptaz ve ribonükleaz inhibitörü			
GE Strip	120 Adet		A: SAPO Oligo Mix	FAM	Sapovirus (GI/ GII/ GIV/ GV)
				HEX	Dahili Kontrol (IC); İnsan RNaseP
				ROX	-
				CYS	-
			B: GCE Oligo Mix	FAM	Giardia lamblia
				HEX	-
				ROX	Entamoeba histolytica
				CYS	Cryptosporidium spp.
			C: YPC Oligo Mix	FAM	Yersinia enterocolitica
				HEX	Plesiomonas shigelloides
				ROX	-
				CYS	Cyclospora cayentanensis
			D: ANRA Oligo Mix	FAM	Astrovirus
				HEX	Norovirus (GI/ GII)
				ROX	Rotavirus (A)
				CYS	Adenovirus
			E: CVVS Oligo Mix	FAM	Salmonella spp.
				HEX	Campylobacter spp.
				ROX	Vibrio parahaemolyticus
				CYS	Vibrio cholerae
			F: ET1 Oligo Mix	FAM	Shigella / Enteroinvasive E. coli (EIEC)
				HEX	-
				ROX	Enterohaggative E. coli (EAEC)
				CYS	Shiga toxin producing E. coli (STEC)
			G: ET2 Oligo Mix	FAM	Enteropathogenic E. coli (EPEC)
				HEX	-
				ROX	-
				CYS	Enterotoxigenic E. coli (ETEC)
			H: CTX Oligo Mix	FAM	Clostridium difficile toxin B
				HEX	-
				ROX	Clostridium difficile toxin A
				CYS	Clostridium difficile Binary toxin A/B

Tablo 1b. Kit içeriği-Kontroller

Saklama Sıcaklığı: -20°C, Taşıma Sıcaklığı: +2-8°C			
NTC	2 x 1000 µL	Negatif Kontrol (Nükleaz İçermeyen Su) (Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.)	
PC-GE Strip	20 Adet	Strip	İçerik (Reaktif stabilite kontrolü için, her işletimde test ediniz.)
		PC-GE ●	
		A	A: Pozitif Kontrol + SAPO Oligo Mix
		B	B: Pozitif Kontrol + GCE Oligo Mix
		C	C: Pozitif Kontrol + YPC Oligo Mix
		D	D: Pozitif Kontrol + ANRA Oligo Mix
		E	E: Pozitif Kontrol + CVVS Oligo Mix
		F	F: Pozitif Kontrol + ET1 Oligo Mix
G	G: Pozitif Kontrol + ET2 Oligo Mix		
H	H: Pozitif Kontrol + CTX Oligo Mix		

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 $\geq 3$ °C/sec. 2. 1-10 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve RNaz içermeyen) 3. Spin Santrifüj: min.3000 rpm (8'li strip ve 2 mL mikrosantrifüj tüpü ile uyumlu) 4. Vorteks	<b>Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:</b> 5. PCR kurulumu için UV kabini 6. Soğuk Tüp standı (mikrosantrifüj tüpleri ve PCR tüp/stripleri için) 7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.

## 2. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipleri

Akut gastroenterit, patojenik mikroorganizmaların veya bu organizmaların toksinleri ile kontamine yiyecek veya suların tüketilmesi ile ortaya çıkan ve ishal, bulantı, kusma, ateş ve karın ağrısı gibi semptomlarla karakterize bir hastalık durumudur. Gastroenterit, çocuklarda ve yaşlılarda yüksek morbidite ve mortalite oranları ile en sık görülen sağlık sorunlarından bir tanesidir. Bundan dolayı da uygun tedavinin hızlı bir şekilde uygulanabilmesi için etkenin hızlı ve doğru bir şekilde teşhis edilmesi gerekmektedir. "Bio-Speedy® Gastroenterit RT-qPCR MX-24S Panel" Tablo 1a'da verilen viral, bakteriyel ve parazitik etkenlerin klinik örneklerde hızlı ve doğru tanısı amacıyla kullanılmaktadır. Kit, dışkı ve rektal sürüntü 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. 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.

## 3. Kitin Analitik Özellikleri

"Bio-Speedy® Gastroenterit RT-qPCR MX-24S Panel", Bio-Rad CFX96 Touch™ Real Time PCR Sistemi ile 20 µL qPCR hacim için valide edilmiştir. "Bio-Speedy® Gastroenterit RT-qPCR MX-24S Panel" kiti "Zybio Nükleik Asit İzolasyon Sistemi (Kat No: ZBI-EXM3000)" ve "Zybio Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Kat No: ZBI-B200)" ile dışkı ve rektal sürüntü örnekleri 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. 1144 adet farklı klinik örnek ile testin analitik duyarlılığı %98,93 ve özgüllüğü %99,13 olarak belirlenmiştir. Kitin HSGM tarafından belirlenen LoD değerleri Sapovirus için 98 kopya/mL, Giardia lamblia için 92 kopya/mL, Entamoeba histolytica için 58 kopya/mL, Cryptosporidium spp için 67 kopya/mL, Astrovirus için 46 kopya/mL, Norovirus için 31 kopya/mL, Rotavirus için 24 kopya/mL, Adenovirus için 62 kopya/mL, Yersinia enterocolitica için 74 kopya/mL, Plesiomonas shigelloides için 62 kopya/mL for, Cyclospora cayetanensis için 67

**Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.**

**Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.**

kopya/mL, *Salmonella spp.* için 24 kopya/mL, *Campylobacter spp.* için 31 kopya/mL, *Vibrio parahaemolyticus* için 28 kopya/mL, *Vibrio cholera* için 63 kopya/mL, *Shigella/Enteroinvasive E. coli* için 66 kopya/mL, *Enterotoxigenic E. coli* için 54 kopya/mL, *Shiga toxin producing E. coli* için 54 kopya/mL, *Enteropathogenic E. coli* için 74 kopya/mL, *Enterotoxigenic E. coli* için 83 kopya/mL, *Clostridium difficile toxin A* için 52 kopya/mL for, *Clostridium difficile toxin B* için 68 kopya/mL, *Clostridium difficile Binary toxin A/B* için 38 kopya/mL olarak belirlenmiştir.

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

Klinik dışı örnekleri, 1-5 ml'lik steril ve sızdırmaz vida kapaklı bir kaba aktarılır. Kabin içinde koruyucu sıvı olması gerekli değildir. Klinik rektal sürüntü örnekleri ise eğer sürüntü 2 saat içinde işlenecekse, vida kapaklı steril boş bir tüpe aktarılır. Örneklerin 2 saatten daha uzun süreli saklanması gerekiyor ise örnekler taşıma besiyerine alınmalıdır. Numuneler laboratuvara en geç 2 gün içerisinde ve +2-8 °C'de saklanarak taşınmalıdır. Eğer sevkியatta bir gecikme bekleniyorsa, numuneler -70°C'de dondurulmalı ve kuru buz ile gönderilmelidir. Numunelerden ekstrakte edilen nükleik asitler -70°C'de dondurulmalı ve kuru buz ile nakledilmelidir.

#### 5. Uyarılar

1. Numune işleme ulusal biyolojik güvenlik tavsiyelerine uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
2. Potansiyel enfekte materyalleri hemen %0,5-1 (w/v) sodyum hipoklorit (%10-20 v/v çamaşır suyu) ile temizlenmeli ve temizlik malzemeleri biyolojik olarak tehlikeli atık deposuna atılmalıdır. Yerel, bölgesel ve federal düzenlemelere uygun olarak atıkların imhası gerçekleştirilmelidir.
3. Test prosedürlerini uygulayan tüm personel PCR ve mikrobiyoloji ile çalışmak üzere eğitilmelidir. Örneklem yeterli bilgi ve deneyime sahip personel tarafından yapılmalıdır.
4. Kit nükleik asit kaynaklarından ve qPCR amplikonlarından uzakta saklanmalıdır.
5. Sıvı transferleri dışında nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri daima kapalı tutulmalıdır.
6. Reaksiyon karışımının önceden amplifiye edilmiş hedef diziler tarafından kontaminasyonunu önlemek için ayrı çalışma alanları ve özel ekipmanlar sağlanmalıdır. PCR öncesi ve sonrası farklı laboratuvar önlükleri giyilmelidir.
7. PCR mikserlerini ve template nükleik asitleri pipetlemek için kullanılan pipetler ayrı olmalıdır. Filtreli ve nükleaz içermeyen uçlar kullanılmalıdır.
8. Kit içindeki bileşenler farklı lot numaraları veya aynı adı taşıyan ancak farklı üreticilerin kimyasalları ile karıştırılmamalıdır.
9. Kit bileşenleri kullanımdan önce yavaşça karıştırılmalıdır. PCR kurulumu esnasında ana stok reaktifleri soğuk blokta tutulmalıdır.
10. Kit ile kullanılan tüm alet ve ekipmanlar için bakım/kalibrasyon aralığı belirlenmelidir.
11. Amplifiye materyalden kaynaklanan yanlış pozitifleri önlemek için PCR' si tamamlanan reaksiyon tüpleri laboratuvarda açılmadan atılmalıdır.
12. Odaların, tezgahların ve cihazların silinebilir yüzeyleri taze seyreltilmiş %10'luk çamaşır suyu (%0,5 NaClO) ile düzenli olarak temizlenmelidir.

#### 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	Aşağıda verilen bileşenler, belirtilen miktarlarda bir tüp içerisinde birleştirilir, pipetajla karıştırılır, sağ kolonda verilen miktarda strip kuyularına dağıtılır.		8 strip kuyusuna dağıtılacak miktar
		Kullanılacak Bileşen	1 Strip için hazırlanacak miktar	1 kuyu için pipetlenecek miktar
Hasta Numunesi	GE 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)	GE Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	90 µL	15 µL
		NTC	45 µL	
		Toplam	135 µL	
Pozitif Kontrol (PC)	PC-GE Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	-	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-5 sn	55°C-30 sn	FAM/HEX/ROX/CYS

#### 7. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold döngü sayısını (Cq) hesaplamak için önerilen threshold (eşik) 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 değerlendirmede kullanılabilir. **Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak kaydedilmelidir.** Bir numuneye bir Cq değeri atanmışsa, ancak eğri sigmoidal değilse, **sonuç negatif olarak kaydedilmelidir.**

**Herhangi bir hedef için eşik altında sigmoidal eğriye 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-çöz işleminden 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 vermemelidir.

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.

Bir örnekte birden fazla parametre pozitif sonuç verdiğinde, aşağıdaki değerlendirme sürecinden sonra nihai raporlandırma gerçekleştirilir:

- En düşük Cq veren parametre belirlenir = Min Cq
- (Diğer parametrenin Cq değeri) – (Min Cq) <7 ise diğer parametre için pozitif sonuç verilir
- (Diğer parametrenin Cq değeri) – (Min Cq) ≥7 ise diğer parametre için negatif sonuç verilir

## 8. Sınırlamalar

- Bio-Speedy® Gastroenterit RT-qPCR MX-24S Panel'in performansı dışı ve rektal sürüntü örneklerinde belirlenmiştir.
- Kitin hedef bölgelerindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyebilir ve virüsün, bakterinin ve parazitin varlığının tespit edilememesine 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		Su/ Nem uzak tutun
	Son Kullanım Tarihi YYYY-AA		Katalog Numarası		Kırılabilir 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" adresinden tarafımıza iletiniz.

TÜM HAKKI SAKLIDIR