

DIAGNOVITAL

DIAGNOVITAL INFLUENZA A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Real Time PCR Kit

Qualitative RT-PCR-based detection of Influenza A/B, SARS-CoV-2, RSV

For in vitro diagnostic use. For professional use only.



REF



09078025

25 tests

09078050

50 tests

09078100

100 tests

İÇİNDEKİLER

Kullanım Amacı	3
Ürün Tanımı	3
SARS-COV-2, INFLUENZA A/B ve RSV'nin Gerçek Zamanlı Pcr-Esaslı Tespiti	3
Sağlanan Materyaller	4
Gerekli Olan İlave Materyaller	4
Saklama	4
Analitik Duyarlılık	4
Tekrarlanabilirlik	5
Teşhis özgüllüğü	5
Tablo 5: SARS-CoV-2, Influenza A / B, RSV tanı özgüllük verilerinin orofaringeal sürüntü tanımlayıcı istatistikleri.Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Çapraz Reaktivite	5
Başlamadan Önce Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar	6
Örnek Hazırlığı	6
Reaksiyon Ayarı	7
Analiz ve Sorun Giderme	8
BIORAD CFX96; Eşik seviyesi, çalışırken en yüksek RFU'ya sahip numunenin% 10 RFU'su için ayarlanmalıdır. Çalışmaya bağlı olarak, Ayar bölümündeki taban çizgisi ayarı ve ardından Floresan Kayma Düzeltmesini Uygula ayarı seçilir.	10
Sorun Giderme	10
Sınırlamalar	10
Ticari Markalar	11
Semboller	11

Kullanım Amacı

Bu döküman, SARS-CoV-2, Influenza A virüs, Influenza B virüs ve RSV (Respiratuar Sinsiyal Virüs) virüslerinin genetik materyalinin COVID-19 ile uyumlu belirtiler gösteren, viral solunum yolu enfeksiyonundan şüphelenilen bireylerden alınmış üst veya alt solunum yolu örneklerinden (nazofaringeal, orofaringeal ve burun swabları) eşzamanlı kalitatif tespiti ve farklılaşması için tasarlanmış gerçek zamanlı RT-PCR testinin kullanımını açıklamaktadır. SARS-CoV-2, Influenza A/B ve RSV'ye bağlı solunum yolu viral enfeksiyonu semptomları benzer olabilir.

SARS-CoV-2, Influenza A/B ve RSV den elde edilen RNA, genellikle enfeksiyonun akut evresinde solunum yolu numunelerinden ayrıştırılabilir. Pozitif sonuçlar SARS-CoV-2, Influenza A/B ve RSV'ye ait RNA varlığını gösterir; hastanın enfeksiyon durumunu tespit etmek için hasta öyküsü ve diğer tanısal bilgilerin klinik olarak uyumlu olması gereklidir. Pozitif sonuçlar bakteri enfeksiyonu ya da diğer virüslerle eşzamanlı enfeksiyonun olmadığını göstermez.

DIAGNOVITAL Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit BIO-RAD CFX96, QuantStudio 5 ve QuantStudio 5Dx Real-Time PCR Tespit Sistemleri kullanılarak nazofaringeal, orofaringeal ve nazal swablarda SARS-CoV-2, Influenza A / B ve RSV'nin kalitatif tespiti için kullanılan bir gerçek zamanlı PCR kiti'dir.

Kit, CDC'nin ve WHO'nun en son tespit yönergelerine uygundur.

Ürün Tanımı

DIAGNOVITAL Influenza A/B, SARS-CoV-2, RSV Multiplex Gerçek Zamanlı PCR kiti solunum örneklerinde SARS-CoV-2, Influenza A/B ve RSV'nin kalitatif tespiti için kullanılan bir in vitro nükleik asit amplifikasyon testidir.

SARS-CoV-2, mevsimsel akut solunum yolu hastalığına neden olan yaygın görülen insan koronavirüslerinden (229E, NL63, OC43, HKU1) genetik olarak farklı yeni bir tip insan koronavirüsü olarak kabul edilir. Ayrıca, genetik olarak iki yeni insan koronavirüsü olan MERS-CoV ve SARS-CoV'den de farklıdır. Influenza virüsü, matris proteini (M1) ve nükleoprotein (NP) gibi çekirdek proteinlerindeki antijenik farklılıklara bağlı olarak dört türe (A, B, C ve D) sınıflandırılır. Tip A ve B, dolaşımdaki en yaygın influenza virüsü türleridir ve tip A, influenza epidemilerinin çoğundan sorumludur. Respiratuar sinsiyal virüs (RSV), Pneumoviridae ailesinin bir parçası olup negatif yönlü ve tek sarmallı RNA virüsüdür. Mevsimsel salgınlar sırasında RSV, grip ve diğer solunum virüslerini geride bırakarak 5 yaş ve altındaki çocuklarda poliklinik konsültasyonları, acil servis ziyaretleri ve akut solunum yolu enfeksiyonları için hastaneye yatışların önde gelen nedenidir. SARS-CoV-2, Influenza ve RSV virüsleri, geniş bir yaş aralığında tüm popülasyonu etkileyebilir, ancak yaşlıların ve bağışıklığı baskılanmış kişilerin özellikle ciddi hastalıklar ve komplikasyonlar geliştirme riski altında oldukları bilinmektedir.

Bu virüsler ateş, öksürük ve baş ağrısı gibi çok benzer semptomlara neden olabilir. Bu nedenle, mümkün olan en kısa sürede yeterli bir teşhisin elde edilmesi önemlidir, çünkü SARS-CoV-2 durumunda ortaya çıkan bir patojen olduğu için, çevreleme önlemleri almak ve popülasyonda yayılmasını önlemek hayati önem taşımaktadır.

Texas RED kanalında, SARS-CoV-2'nin tespiti için korunmuş bölge olan Nucleocapsid (N) genindeki N bölgesini tespit etmektedir. **FAM** kanalında, Influenza A'nın tespiti için korunmuş bölge olan Matrix 1 (M1) genini ve Influenza B'nin tespiti için korunmuş bölge olan Nonstructural 2 (NS2) genini tespit etmektedir. **Cy5** kanalında, RSV'nin tespiti için korunmuş bölge olan Matrix (M) bölgesini tespit etmektedir. **HEX** kanalında, insan ekstraksiyon kontrolünü içeren RNase P gen bölgesini tespit etmektedir.

Ek olarak, bulaşıcı olmayan bir pozitif kontrol ve negatif bir insan ekstraksiyon kontrolü kite dahildir. İnsan ekstraksiyon kontrolü uygun RNA ekstraksiyonu, ters transkripsiyonu ve reaksiyona dahil olan tüm reaktiflerin kontrolünü sağlamak için kullanılır. PCR ana karışımı, ekstraksiyon adımı sırasında örnekten ekstrakte edilen bir dahili insan hedefi (RNaseP) için primerler ve prob içerir. İnsan ekstraksiyon kontrolü (HEC) ekstraksiyon sırasında elde edildiğinden, ekstraksiyon kontrolü olarak harici bir DNA veya RNA'nın eklenmesi gerekli değildir. Pozitif kontrol, testlerin işlevselliğini ve genel PCR performansını doğrulamak için kullanılır.

SARS-COV-2, INFLUENZA A/B ve RSV'nin Gerçek Zamanlı Pcr-Esaslı Tespiti

SARS-CoV-2, Influenza A/B ve RSV'nin tespitindeki ilk adım, viral RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesidir. Daha sonra, SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV ve insan ekstraksiyon kontrolüne özgü hedef sekanslar, floresan etiketli problemlerin kullanımıyla gerçek zamanlı olarak izlenen amplifikasyon ile özel olarak amplifiye edilir: yeni amplifiye edilmiş DNA zincirleriyle birleştiğinde, florofor salınır ve floresan sinyalinde artış görülür.

RNA virüslerinin intrinsik mutasyon oranı nedeniyle, zamanla hedef sekansla mutasyonların oluşması ve birikmesi mümkündür. Bu, PCR esaslı tespiti ile hatalı negatif sonuçlara yol açabilir. **DIAGNOVITAL Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit** değişmiş hedef sekansın yol açtığı hatalı negatif sonuç olasılığını en aza indirmek için evrimsel olarak iyi korunmuş viral sekansları hedef olarak bu sorunu ortadan kaldırır.

SARS-CoV-2, INFLUENZA A/B ve RSV için orijinal hedef sekansları içeren, bulaşıcı olmayan bir hedef pozitif kontrol (TPC) testin bütünlüğünü kontrol etmek amacıyla dahil edilmiştir.

DIAGNOVITAL Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit, kalibre edilmiş **FAM™**, **TEXAS RED**, **Cy5** ve **HEX/VIC** kanallı her qPCR ile uyumludur.

RTA.KK.703 Revizyon Tarihi/Revizyon No:

Sağlanan Materyaller

	Reaktifler	Miktarı ve Hacmi (25 test)	Miktarı ve Hacmi (50 test)	Miktarı ve Hacmi (100 test)
1	Diagnovital® Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex PCR Ana Karışımı	1 x 375 µl	1 x 750 µl	1 x 1500 µl
2	Diagnovital® Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Pozitif Kontrol (TPC)	1 x 45 µl	1 x 75 µl	1 x 150 µl
3	Nükleaz içermeyen dH ₂ O (NTC)	1 x 150 µl	1 x 150 µl	1 x 150 µl



ÖNEMLİ! Yukarıdaki tablo standart kit renk şemasını yansıtmaktadır. COVID-19 krizi sırasındaki tedarikçi sorunları nedeniyle, mevcut olması nedeniyle ayrı tüp kapağı renkleri ikame edilebilir. Kullanmadan önce daima reaktifin etiketini kontrol edin.

Gerekli Olan İlave Materyaller

- Nükleik asit ekstraksiyonu için uygun aletler ve ekipmanlar kullanılmalı.
- FAM™, ROX, CY5 ve HEX tespiti için donatılmış gerçek zamanlı PCR tespit sistemi kullanılmalı.
- Ayarlanabilir pipetler ve filtreli pipet uçları kullanılmalı.
- Potansiyel olarak enfeksiyöz örneklerle çalışmak için uygun kişisel koruyucu ekipman ve çalışma alanları kullanılmalı.
- DNAzap™ (Life Technologies), DNA Away™ (Fisher Scientific), RNase Away™ (Fisher Scientific), %10 çamaşır suyu (1:10 seyreltilmiş ticari %5,25-6,0 sodyum hipoklorit) benzeri yüzey dekontaminantları kullanılmalı.
- Dilüsyonları, ana karışımları vs. hazırlamak için nükleaz içermeyen tüpler / şeritler / plaklar kullanılmalı.
- PCR cihazına uygun nükleaz içermeyen tüpler / şeritler / plaklar kullanılmalı.
- Reaktifler ve örnekler için uygun saklama seçenekleri (4°C, -20°C, -70°C) bulunmalı.

Saklama

- Tüm bileşenleri -20°C'de saklayın ve tekrarlayan şekilde dondurup çözdüremekten kaçının.
- Işığa uzun süreli maruz kalma floroforların performansını düşürebileceğinden, qPCR ana karışımını ışıktan koruyun.
- Nakliye sırasında kit bileşenleri hasar görmüşse, RTA Laboratuvarları ile iletişime geçin. Performansı düşebileceği için, kullanmayın.
- Kontaminasyonu önlemek için reaktifleri örnek materyalinden ayrı tutun.
- Belirtilen son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın.

Performans Özellikleri

Analitik Duyarlılık

NP / OP SWABS için analitik duyarlılık, benzer sonuçlar elde etmek için aynı numunenin bir seyreltme serisi testinin kullanılmasıyla analiz edilmiştir, Seracare AccuPlex™ SARS-CoV-2, Flu A / B kullanımına karşılık gelen 3xLoD ile hazırlanmış numuneler kullandık ve RSV Referans Malzeme Kiti, Kat: 0505-0174). 1800, 630, 210 ve 70 kopya / ml'lik nihai konsantrasyonları verecek şekilde bir Referans numunesinin seyreltme serisi hazırlandı. Dilüsyonlar, RTA Viral RNA İzolasyon Kiti El Kitabına göre RTA Viral RNA İzolasyon Kiti (Kat No: 09010) ile ekstrakte edildi. Her seyreltme Biorad CFX96 cihazında test edildi. Alt limit, PASW Statistics 18 programı ile yapılan probit analizi ile hesaplandı. Her genotip / alt tip için Saptama Sınırı (LoD) değerleri ve % 95 güven aralıkları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Hedef Gen	Tespit Limiti (kopya sayısı/ml)	95% Güven Alt sınırı	95% Güven Üst Sınırı
SC2	156	150	160
M1(INFA)+NS2(INFB)	1000	950	1050
M (RSV)	1000	950	1050

Tablo 1: Diagnovital® Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit - Tespit sınırı (LoD) değerleri ve %95 güven aralığı

Kesinlik

Benzer sonuçlar elde etmek için aynı numunenin tekrarlanan testi olan hassasiyeti belirlemek için, Seracare AccuPlex SARS-CoV-2, Flu A / B ve RSV Referans Malzeme Kiti, Kat. 0505-0174. Örnekler 15 replikat olarak işlendi ve RTA Viral RNA İzolasyon Kiti El Kitabına göre RTA Viral RNA İzolasyon Kiti

RTA.KK.703 Revizyon Tarihi/Revizyon No:

(Kat No: 09010) ile ekstrakte edildi. Ek olarak, Seracare AccuPlex SARS-CoV-2, Flu A / B ve RSV Negatif Referans örneklerinin 15 kopyası da çalışmaya dahil edildi. 3xLoD'ye karşılık gelen tekrarlanan pozitif numunelerin benzer sonuçlar verdiği sonucuna varıldı. Ayrıca, tüm negatif referans örnekleri negatif sonuçlar verdi. Sonuçlar Tablo 3'te özetlenmiştir.

Target gene	Mean	Std. Deviation	Variance	Coefficient of variation (%)
SC2	34,61	0,139	0,019	0,595
M1(INFA)+NS2(INFB)	33,66	0,084	0,007	0,340
M (RSV)	34,96	0,092	0,009	0,478

Tablo 2. DIAGNOVITAL Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit kesinlik verilerinin genel tanımlayıcı istatistikleri

Tekrarlanabilirlik

DIAGNOVITAL INFLUENZA A / B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Real Time PCR Testinin tekrarlanabilirliği, 20 kopyaya karşılık gelen düşük bir pozitif (3 x LoD) örnek kullanılarak değerlendirilmiştir. Numune, RTA Viral RNA İzolasyon Kiti El Kitabına göre RTA Viral RNA İzolasyon Kiti (Kat No: 09010) ile ekstrakte edildi. PCR reaksiyonları DIAGNOVITAL INFLUENZA A / B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Real Time PCR Test ile DIAGNOVITAL INFLUENZA A / B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Real Time PCR Test Handbook'a göre ayarlanmıştır. BIO-RAD CFX96-Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sistemi amplifikasyon, tespit ve analiz için kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler IBM SPSS Statistics programı ile analiz edildi. Varyasyon katsayısı (%) aşağıdaki formülle hesaplandı: standart sapma * 100 / ortalama.

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Variance	Coefficient of Variation (%)
SC2 (TEXAS RED)	20	34,996	0,45	0,20	1,28
M1(INFA)+NS2(INFB) (FAM)	20	34,24	0,23	0,35	1,02
M (RSV) (Cy5)	20	33	0,36	0,52	0,98

Tablo 3: DIAGNOVITAL Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit tekrarlanabilirlik verilerinin tanımlayıcı istatistikleri

Teşhis özgüllüğü

INFLUENZA A / B SARS-CoV-2 RSV RNA negatif klinik örnekler, DIAGNOVITAL INFLUENZA A / B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit'in tanısal özgüllüğünü belirlemek için analiz edilmiştir. 30 SARS-CoV-2, INFLUENZA A / B ve RSV RNA negatif klinik nazofaringeal sürüntü örneği kullanıldı. 30 negatif klinik örneğin hiçbiri SARS-CoV-2, INFLUENZA A / B ve RSV için pozitif değildi. DIAGNOVITAL INFLUENZA A / B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit'in tanısal özgüllüğü% 100'dür. özgüllüğü% 100'dür. Tüm testlerde, tüm dahili kontroller (IC) pozitif sonuç verdi.

Tablo 6: SARS-CoV-2, Influenza A / B, RSV tanı özgüllük verilerinin nazofaringeal sürüntü tanımlayıcı istatistikleri.

Descriptive Statistics						
Nasopharyngeal Swab		N	Mean	Std. Deviation	Variance	Coefficient of Variation (%)
	SC2 (TEXAS RED)	30	NA	NA	NA	NA
	M1(INFA)+NS2(INFB) (FAM)	30	NA	NA	NA	NA
	M (RSV) (Cy5)	30	NA	NA	NA	NA
	Rp (HEX / VIC)	30	32,17	0,43	0,189	1,33

Çapraz Reaktivite

Bir testin özgüllüğünü incelemek için, potansiyel çapraz reaktif belirteçleri için çapraz reaktivite çalışmaları yapılmalıdır. Bu çalışmada, 8 referans organizma test edilerek testin özgüllüğü değerlendirilmiştir.

DIAGNOVITAL Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit aşağıdaki tablo 8'de verilen diğer potansiyel çapraz reaktif belirteçleriyle herhangi bir çapraz reaktivite göstermemektedir:

Örnek	Kaynak
İnsan Adenovirüsü	NIBSC (Cat. No: 16/324)

Örnek	Kaynak
İnsan Metapnömovirüsü (hMPV)	ATCC VR-3250SD
İnsan Enterovirüsü V71	ATCC VR-1432
İnsan Korona virüsü NL63	ATCC VR-3263SD
İnsan Korona virüsü HKU1	ATCC VR-3262SD
İnsan Korona virüsü 229E	ATCC VR-740
Betacoronavirus 1 OC43	ATCC VR-1558D
MERS Koronavirüs	ATCC VR-3248SD

Tablo 8: Çalışmada test edilen potansiyel çapraz reaktif belirteçleri

Başlamadan Önce Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

BIYOGÜVENLİK

- Klinik örnek üzerinde çalışırken uygun kişisel koruyucu ekipman (örn. önlük, pudrasız eldiven, koruyucu gözlük) takın/giyin.
- Örnek işleme, onaylı bir Sınıf II biyolojik güvenlik kabininde, biyogüvenlik düzeyi 2 veya daha üstü yönergelerle uygun şekilde gerçekleştirilmelidir.
- Daha fazla bilgi için, bkz.:
2019 Yeni Koronavirüs (SARS-CoV-2) için İnceleme Altında Bulunan Hastalardan (PUI'ler) Klinik Örnekleri Alma, İşleme ve Test Etmeye Yönelik Ara Yönergeler <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
- İnfluenza için Araştırma Altındaki Hastalardan (PUI'ler) Klinik Örnekleri Toplama, İşleme ve Test Etmeye Yönelik Ara Yönergeler <https://www.who.int/influenza/en/>
- Mikrobiyolojik ve Biyomedikal Laboratuvarlarda Biyolojik Güvenlik Yönergelerinin 5. Baskısı için: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications>
- RSV için Araştırma Altındaki Hastalardan (PUI'ler) Klinik Örnekleri Toplama, İşleme ve Test Etmeye Yönelik Ara Yönergeler <https://www.who.int/influenza/rsv/en/>
- Mikrobiyolojik ve Biyomedikal Laboratuvarlarda Biyogüvenlik 5. Baskı şu adresten temin edilebilir: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications>
- **Diagnovital® İnfluenza A/B SARS-CoV-2, RSV Multiplex Kitin** kullanımı sadece eğitimli laboratuvar personeli ile sınırlıdır.

ÖRNEKLER

Aşağıda belirtilenler gibi yalnızca test için uygun örnekler kullanın:

- Orofarenks ve nazofarenks sürüntüleri ve bronkoalveoler lavaj dahil solunum yolu örnekleri.
- Sürüntü örnekleri yalnızca plastik gövdeli, sentetik uçlu (polyester veya Dacron® gibi) sürüntü çubuklarıyla alınmalıdır. Ahşap gövdeli kalsiyum aljinatlı veya pamuk uçlu sürüntü çubukları kullanılamaz.

ÖRNEKLER- KULLANIM VE SAKLAMA

- Örnekler, alındıktan sonra 2°C-8°C'de 72 saate kadar saklanabilir.
- Ekstraksiyonda bir gecikme bekleniyorsa, örnekleri -20°C'de veya tercihen -70°C'de saklayın.
- Ekstrakte edilen nükleik asitler -20°C veya altı sıcaklıklarda saklanmalıdır.

Aşağıdaki durumlarda örnekleri kullanmayın:

- 2-4°C'de (≤3 gün) saklanmamış ya da -70°C ya da altındaki sıcaklıklarda dondurulmamışsa.
- Yeterince etiketlenmemiş veya belgeleri eksikse.
- Bu amaca uygun değilse (uygun örnek materyali için yukarıya bakın).
- Örnek hacmi yeterli değilse.

Örnek Hazırlığı

- RT-PCR testlerinin performansı, büyük oranda örnekteki RNA miktarına ve kalitesine bağlıdır. Örnekleri test etmeden önce, RNA ekstraksiyon prosedürlerinin geri kazanım ve saflık bakımından değerlendirilmesi ve doğrulanması tavsiye edilir.

- DIAGNOVITAL DETEKSİYON KİTLERİ ile birlikte kullanılabilen Generotex96, Ziexpress32 gibi uygun nükleik asit ekstraksiyon sistemleri yanı sıra: RTA Viral Nükleik Asit İzolasyon kiti, RTA Viral RNA İzolasyon kiti, bioMérieux NucliSens® sistemleri, QIAamp® Viral RNA Mini Kit, QIAamp® MinElute Virus Spin Kit veya RNeasy® Mini Kit (QIAGEN), EZ1 DSP Virus Kit (QIAGEN), Roche MagNA Pure Compact RNA RNA İzolasyon Kit, Roche MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit ve Roche MagNA Pure 96 DNA ve Viral NA Small Volume Kit ve Invitrogen ChargeSwitch® Total RNA Cell Kitleri ile de çalışmaktadır.
- Uyumlu Gerçek Zamanlı PCR Sistemleri: QuantStudio5 and QuantStudio5Dx Biorad CFX Connect, Biorad CFX96, Biorad CFX Touch ,Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Qiagen Rotor Gene Q, Qiagen Rotor Gene Series, Corbett Realtime PCR, BMS Mic., Applied Biosystem ABI 7500, Applied Biosystem ABI 7500 Fast, Applied Biosystem ABI StepOne, Applied Biosystem ABI StepOne Plus., Slan Realtime PCR, Tianlog Gentier 96E, Tianlong Gentier 96R, Stratagene Mx3500p, Azure Biosystems™ Cielo™ 3 ve 6 real-time PCR Systems.
- Kalan örnekleri ve ekstrakte edilmiş nükleik asitleri -20/ -80°C’ de saklayın ve koruyun.
- Yalnızca tek bir günde test edilecek sayıda örnek ekstraktını çözündürün.
- Her bir dondurma/ çözündürme eylemi RNA kalitesini düşüreceğinden, test etmeden önce ekstraktları birden fazla kez dondurup çözdüremeyin.
- Örnek tipine bağlı olarak, hasta örneklerini doğrudan kullanmak mümkündür. Ancak bu, reaksiyon inhibe edilmeden kullanılabilen örnek miktarı üzerinde bir ön lizis aşaması ve titrasyon gerektirebilir.

Reaksiyon Ayarı

1. Deneyle başlanmadan önce gerekli tüm ekipmanların ve cihazların uygun, kalibre edilmiş ve çalışır durumda olduğundan emin olun.
2. Ekipmanı ve çalışma alanını dekontamine edin ve iş akışını kısa ve tekrarlanabilir tutmak için aşağıdaki deney için gerekli olan tüm malzemeleri hazırlayın.
3. PCR deteksiyon cihazını açın ve gecikmeleri önlemek için önceden termal profili/ protokolü programlayın.
4. **DIAGNOVITAL İnfluenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kiti**n buzda tüm bileşenlerini çözündürün ve bileşenlerin eşit şekilde dağılmasını sağlamak için yavaşça ve altüst ederek karıştırın. Karıştırdıktan sonra, mikro santrifüj ile kısa çevirerek kapakta kalan solüsyonların tüpe geçmesini sağlayın.
5. PCR ana karışımı **DIAGNOVITAL İnfluenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kiti**n Gerçek-Zamanlı PCR kitiyle temin edilmiştir ve kullanıma hazırdır. Her bir örnek için bir reaksiyon hazırlanır. Negatif kontrol (NTC) ve pozitif kontrol (PC) için de ayrı reaksiyon hazırlanmalıdır.


Bileşenler	Reaksiyon Başına Hacim
PCR Ana Karışımı	15 µl
İzole örnek RNA/ PC/ NTC	5 µl
Toplam	20 µl

6. 15 µl PCR Ana Karışımını striplerinize/ PCR plağınıza dağıtın ve 5 µl örneklerinizi ekleyin. (Şekil 1’de örnek bir kurulum verilmiştir).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ö1	Ö9	Ö17	Ö25	Ö33	Ö41	Ö49	Ö57	Ö65	Ö73	Ö81	PC
B	Ö2	Ö10	Ö18	Ö26	Ö34	Ö42	Ö50	Ö58	Ö66	Ö74	Ö82	Ö89
C	Ö3	Ö11	Ö19	Ö27	Ö35	Ö43	Ö51	Ö59	Ö67	Ö75	Ö83	Ö90
D	Ö4	Ö12	Ö20	Ö28	Ö36	Ö44	Ö52	Ö60	Ö68	Ö76	Ö84	Ö91
E	Ö5	Ö13	Ö21	Ö29	Ö37	Ö45	Ö53	Ö61	Ö69	Ö77	Ö85	Ö92
F	Ö6	Ö14	Ö22	Ö30	Ö38	Ö46	Ö54	Ö62	Ö70	Ö78	Ö86	Ö93
G	Ö7	Ö15	Ö23	Ö31	Ö39	Ö47	Ö55	Ö63	Ö71	Ö79	Ö87	Ö94
H	Ö8	Ö16	Ö24	Ö32	Ö40	Ö48	Ö56	Ö64	Ö72	Ö80	Ö88	NTC

Şekil 1: Örnekler ile ana karışımların dağıtımı için örnek pipetleme şeması (Ö: Örnek)

7. Reaksiyonları PCR cihazına aktarın, ardından aşağıdaki yönergelere göre ilerleyin:

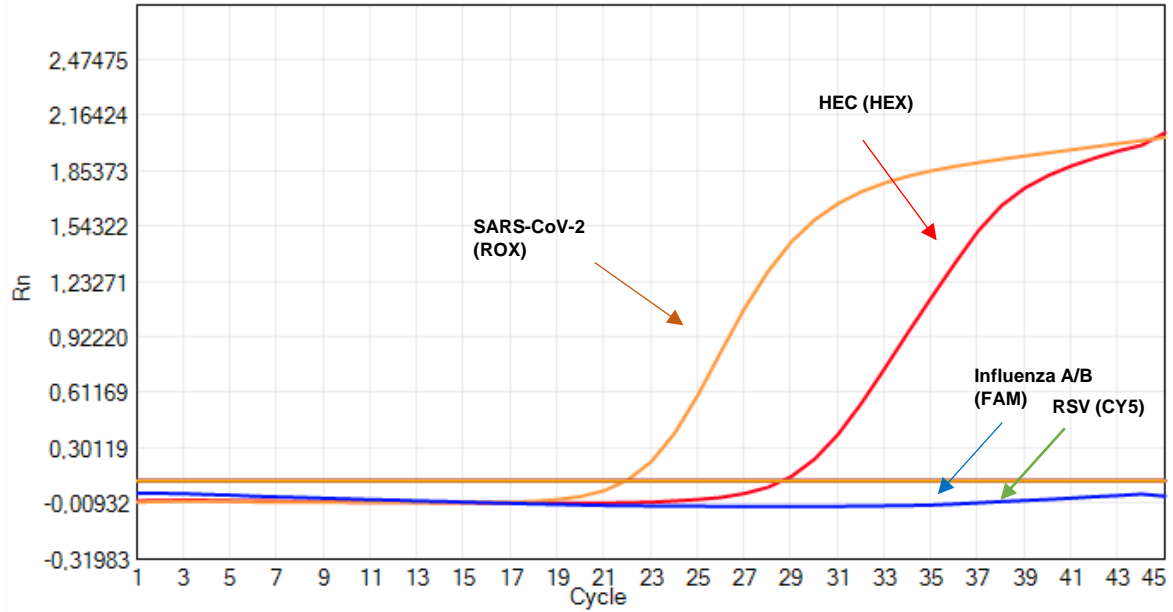
Adım	Döngüler	Sıcaklık	Süre
Ters Transkripsiyon	1	45°C	10 dakika
İlk Denatürasyon	1	95°C	2 dakika
Amplifikasyon	45	95°C	10 saniye
		 55°C*	30 saniye

*Veri toplama için **FAM™** (INFA/B), **HEX/ VIC** (HEC), **TEXAS RED** (SARS-CoV-2) ve **Cy5** (RSV) kanallarını seçin. Kanal tespit için kullanıldığından TEXAS RED'u pasif referans olarak ayarlamayın.

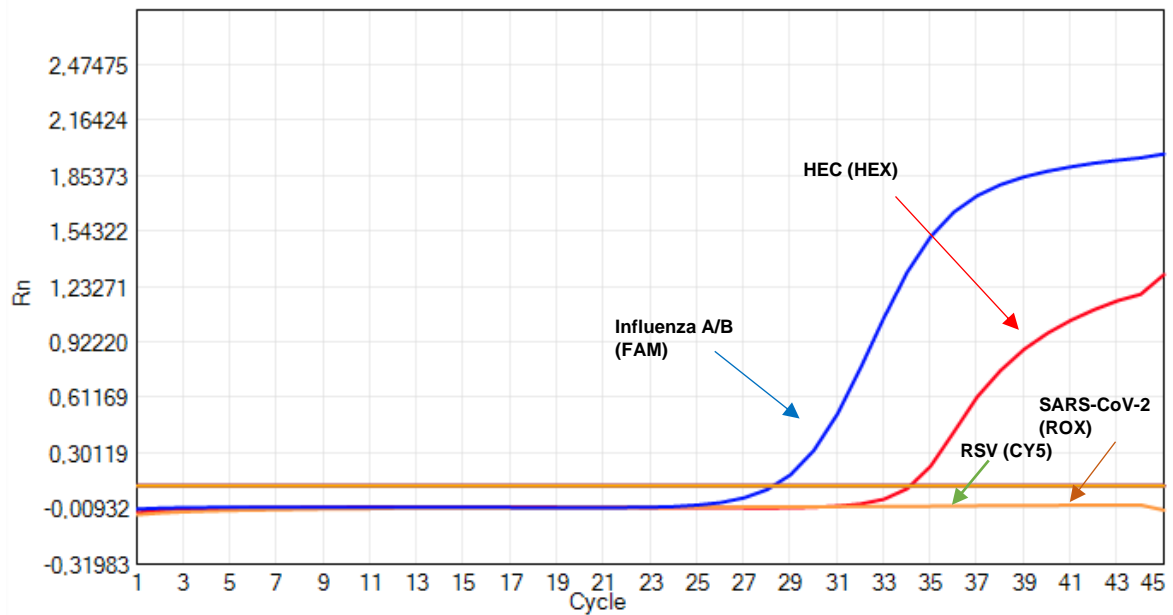
- Çalışma bittiğinde, kontaminasyonu önlemek amacıyla reaksiyon tüplerini/ PCR plakasını açmayın ve yerel yönetmeliklere ve düzenlemelere göre atın. Laboratuvar ekipmanını ampliconlarla kontamine edebileceğinden otoklavlamayın.

Analiz ve Sorun Giderme

ÖRNEK SONUÇ

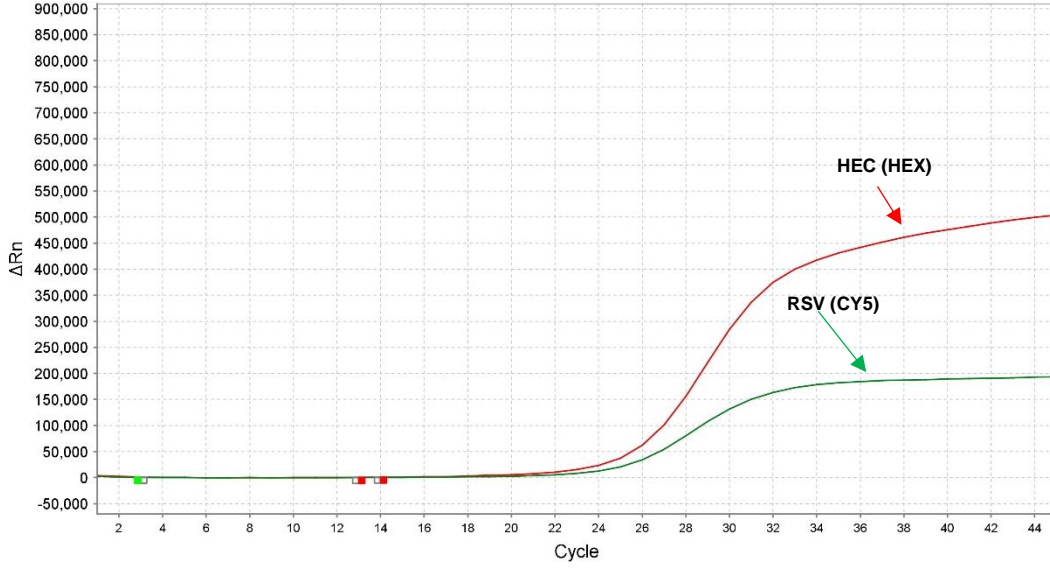


Şekil 1: Pozitif SARS-CoV-2 örneğinin amplifikasyon eğrisi



Şekil 2: Pozitif Influenza A/B örneğinin amplifikasyon eğrisi

Amplification Plot



Şekil 3: Pozitif RSV örneğinin amplifikasyon eğrisi

- **dh2O kontrolleri (NTC) hiçbir test için pozitif Ct vermemelidir.** Böyle bir durumda karşılaşırsa reaksiyon, örnek RNA/DNA'sı ile kontamine olmuştur. Ekipmanı ve çalışma alanını dekontamine edin ve reaksiyonları tekrarlayın.
- **Bir örneğin SARS-CoV-2 için pozitif kabul edilebilmesi için TEXAS RED kanalındaki SARS-CoV-2 testleri pozitif bir Ct<40 değeri vermelidir. HEX kanalında HEC amplifikasyonu Ct <35 beklenir.** HEC amplifiye olmazsa, örnek yine de pozitif kabul edilmelidir.
- **Bir örneğin Influenza A/B için pozitif kabul edilmesi için FAM kanalındaki Influenza A/B testleri pozitif bir Ct<40 değeri vermelidir. HEX kanalında HEC amplifikasyonu Ct <40 beklenir.** HEC amplifiye olmazsa, örnek yine de pozitif kabul edilmelidir.
- **Bir örneğin RSV için pozitif kabul edilmesi için CY5 kanalındaki RSV testleri pozitif bir Ct<40 değeri vermelidir. HEX kanalında HEC amplifikasyonu Ct <35 beklenir.** HEC amplifiye olmazsa, örnek yine de pozitif kabul edilmelidir.
- **Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV izolatu için negatif olan tüm reaksiyonlar, HEC testi için pozitif Ct değerleri vermelidir. Ct değerleri <35 döngü olmalıdır.** Negatif insan ekstraksiyon kontrolünün(NTC) amplifiye edilememesi, hatalı bir RNA ekstraksiyonunu veya RNaz kontaminasyonu nedeniyle RNA izolatu kaybını gösterir. Örnek yeterli değildir, sonuçlar yorumlanamaz.
- **TPC'yi kullanırken, FAM, TEXAS RED ve CY5 kanallarında pozitif bir Ct gözlemlenmemelidir. TPC için Ct değeri tüm kanallarda <35 döngü olmalıdır.** Ct değeri beklenen değere karşılık gelmiyorsa veya tüm testler pozitif kontroller pozitif sonuç vermediyse, PCR çalışmamıştır. Reaksiyon kurulumunu ve PCR cihazı ayarlarını kontrol edin ve reaksiyonları tekrarlayın. Tekrarlanan dondurma ve çözündürme döngüleri, TPC'nin kalitesinden ödün vererek geç Ct değerlerine neden olabilir.
- **Herhangi bir testte hiçbir amplifikasyon sinyali gözlenmezse, PCR inhibe edilmiştir.** Reaksiyonun ve cihazın ayarlarını kontrol edin ve gerekirse RNA ekstraksiyonunu tekrarlayın. Sonuçlar geçersizdir ve yorumlanamaz.

Influenza A/B	SARS-CoV-2	RSV	HEC	Yorum
+	-	-	+ veya -	Influenza A/B hedef sekansları tespit edildi. Örnek Influenza A/B için pozitif kabul edilir.
-	+	-	+ veya -	SARS-CoV-2 hedef dizisi tespit edildi. Örnek, SARS-CoV-2 için pozitif kabul edilir.
-	-	+	+ veya -	RSV hedef dizisi tespit edildi. Örnek, RSV için pozitif kabul edilir.

+	+	-	+ veya -	İnfluenza A/B ve SARS-CoV-2 hedef sekansları tespit edildi. Örnek, İnfluenza A/B ve SARS-CoV-2 için pozitif kabul edilir.
-	-	-	+ (<35 Ct)	Yalnızca dahili kontrol hedef dizisi tespit edildi. Örnek, İnfluenza A/B ve SARS-COV-2, RSV için negatif kabul edilir.*
-	-	-	- (≥35 Ct)	Sonuç geçersizdir. Ekstraksiyon ve / veya qPCR'ı tekrarlanmalı veya yeni bir örnek alınmalı.**

* 2019-nCoV'un neden olduğu enfeksiyonlar sırasında en yüksek viral düzeyler için optimum örnek türleri ve zamanlama belirlenmemiştir. Yanlış negatif sonuç olasılığı, özellikle hastanın yakın zamanda maruz kalması veya klinik görünümü 2019-nCoV enfeksiyonunun mümkün olduğunu gösteriyorsa ve diğer hastalık nedenleri (ör. Diğer solunum yolu hastalıkları) için tanı testleri negatifse dikkate alınmalıdır. 2019-nCoV enfeksiyonundan hala şüpheleniliyorsa, halk sağlığı yetkililerine danışarak yeniden test yapılması düşünülmelidir.

** Numune RNA'sının yetersiz miktarları veya kalitesi nedeniyle veya numune veya RNA ekstraktı içindeki inhibe edici maddeler nedeniyle geçersiz numune sonuçları oluşturulabilir. Örnek tekrar testi sadece RT-PCR'den denenebilir, ancak RT-PCR tekrar tekrar geçersiz ise örneğin yeniden ekstraksiyonu gereklidir. Yeterince saklanırsa örnek materyal üzerinde bırakılırsa yeniden ekstraksiyon denenebilir. Ek malzeme yoksa veya yeniden ekstrakte edilen numune hala geçersizse, yeni bir numune talep edilmelidir.

Eşik Değeri (Threshold) Ayarlama

Amplifikasyon eğrisi eşik değeri, PCR sonuçlarını etkileyebilecek parametrelerden biridir. Eşik değerinin yanlış ayarlanması durumunda, gerçek bir amplifikasyon meydana gelmemiş olsa bile bir Ct değeri görüntülenebilir. **DIAGNOVİTAL İnfluenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit** ile Otomatik Eşik Değeri (Autothreshold) kullanılabilir. Herhangi bir kanaldaki numunenin floresans artışı, aynı kanaldaki en yüksek floresans değerinin % 10'undan daha azise, bu artış **NEGATİF** olarak kabul edilir.

BIORAD CFX96; Eşik seviyesi, çalışırken en yüksek RFU'ya sahip numunenin % 10 RFU'su için ayarlanmalıdır. Çalışmaya bağlı olarak, Ayar bölümündeki taban çizgisi ayarı ve ardından Floresan Kayma Düzeltmesini Uygula ayarı seçilir.

Sorun Giderme

PROBLEM	POTANSİYEL SEBEPLER	ÇÖZÜM
İç kontrol için negatif sonuç çıkması	PCR ana karışımı homojen olmamış olabilir.	PCR ana karışımı iyice pipetleme ile karıştırılmalıdır.
	RNA izolasyonu gerçekleşmemiş olabilir.	Çalışma izolasyondan başlayarak tekrar edilmelidir.
	İzolat inhibitör içerebilir.	Gerçek Zamanlı PCR kurulumu örnekler 1/10 dilüsyon yapılarak tekrar edilmelidir.
Negatif kontrolde pozitif artış gözlemlene	Kontaminasyon olmuş olabilir.	Kontaminasyon çalışma alanından sarf malzemelere kadar birçok etkenden kaynaklanmış olabilir. Böyle durumlarda kontamine alandaki sarf malzemeler atılıp yenisi kullanılmalı ve ortam ilk önce 10% NaClO solüsyonu ardından 70% Alkol ile temizlenmelidir.
Düşük Ct'de sonuç gözlemlene	Ct > 35 sonuçlar için	Çalışma tekrarlanmalıdır. Eğer yine aynı sonuç alınırsa örnek negatif olarak değerlendirilmelidir.

Sınırlamalar

- Güvenilir sonuçlar için, bu kılavuzda verilen yönergelere uyulması önemlidir. Reaksiyon ayarındaki veya döngü protokolündeki değişiklikler, başarısız deneylere yol açabilir.
- Örnek matrisine bağlı olarak, izole edilmiş RNA'da inhibitörler olabilir ve ters transkripsiyonu ve/veya PCR amplifikasyonunu devre dışı bırakabilir. Böyle bir durumda, başka bir örnek tipi veya izolasyon yöntemi faydalı olabilir.
- Hedef sekans içinde gerçekleşen spontan mutasyonlar, hedef sekansın tespit edilmesini engelleyebilir.
- Sonuçlar, daima örnekten alınan diğer tüm veriler göz önünde bulundurularak yorumlanmalıdır. Yorumlama, eğitimli ve bu tip deneyler konusunda deneyimli personel tarafından yapılmalıdır.









RTA.KK.703 Revizyon Tarihi/Revizyon No:

Ticari Markalar

DIAGNOVITAL Influenza A/B SARS-CoV-2 RSV Multiplex Kit, NucliSens® (bioMérieux), QIAamp®, RNeasy® (QIAGEN), ChargeSwitch® (Invitrogen), ROX™, FAM™ (Life Technologies), DNAzap™, DNA Away™, RNase Away™

Özellikle belirtilmemiş olsa bile, bu dokümanda kullanılan tescilli isimlerin, ticari markaların vb. yasalar tarafından koruma altında olmadıkları düşünülmemelidir.

Semboller

-  Geçerlilik Tarihi
-  Parti/Seri
-  Katalog Numarası
-  Sıcaklık Limiti
-  Dikkat; ekteki dokümana bakın
-  Üretici
-  *In vitro* Diagnostik Tıbbi Cihaz
-  Kullanma Kılavuzuna bakınız
-  (n) sayıda test için yeterlidir



**RTA LABORATUVARLARI BİYOLOJİK
ÜRÜNLER İLAÇ VE MAKİNE SAN. TİC. A.Ş.**

Geposb Cumhuriyet Cad. No:3
41400 Gebze / Kocaeli / Turkey

Tel: +90 262 648 5300

E-mail: rta@rtalabs.com.tr

Web: www.rtalabs.com.tr