

1. Kitin Kullanım Amacı ve Test Prensipleri

Kit, Tablo 1a'da verilen viral etkenlerin klinik örneklerde hızlı ve doğru tanısı amacıyla kullanılmaktadır. Kit, servikal, penis ve vajinal sürüntü numunelerinden elde edilen nükleik asit izolatlarına uygulanmaktadır. Kit ile hızlı tanı, hedef etkene özgü genomik DNA bölgelerini hedefleyen gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile gerçekleştirilmektedir. Kit ile tanı 1 saatten kısa bir sürede* gerçekleştirilebilmektedir. Kit, sağlık hizmeti sunucuları tarafından hastalık şüphesi olan bireylerden alınan servikal, penis veya vajinal sürüntü örneklerine uygulanır.

*Bio-Rad CFX96 Touch ile

2. 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.

2.1. Kit Saklama Sıcaklığı

Kit, saklama sıcaklığı (-15°C ile -25 °C arasında) korunduğu sürece, ambalaj üzerinde yazılı olan son kullanma tarihine kadar stabil kalabilmektedir.

Tablo 1a. Kit İçeriği

İçerik/Kullanım Amacı	Kanal	İçerik	Miktar(10 µL Reaksiyon)	Birim Reaksiyon Tüketim
			250 Reaksiyon	
DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu ve ribonükleaz inhibitörü	-	2X Master Mix	4 x 1250 µL	5 µL
HPV 39 HPV 52 HPV 35 IC; Internal Kontrol, (İnsan RNase P geni)	FAM HEX ROX CY5	Primer Mix 1	1 x 625 µL	2,5 µL
HPV 33 HPV 54 HPV 68 IC; Internal Kontrol, (İnsan RNase P geni)	FAM HEX ROX CY5	Primer Mix 2	1 x 625 µL	2,5 µL
HPV 51 HPV 56 HPV 31 IC; Internal Kontrol, (İnsan RNase P geni)	FAM HEX ROX CY5	Primer Mix 3	1 x 625 µL	2,5 µL
HPV 66 HPV 58 HPV 59 IC; Internal Kontrol, (İnsan RNase P geni)	FAM HEX ROX CY5	Primer Mix 4	1 x 625 µL	2,5 µL

Tablo 1b. Kit İçeriği-Kontroller

Saklama Sıcaklığı: 2-8°C; Transfer Sıcaklığı: 2-8°C Bileşenler donmuşsa -20°C'de saklayınız. İlk çözdürmeden sonra 2-8°C'de saklayınız.			
Negatif Kontrol (Nükleaz İçermeyen Su) Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz. **Her bir primer mix için ayrı bir reaksiyon	NTC	1 x 1000 µL	2,5 µL
Pozitif Kontrol: Hedef gen bölgelerini içeren plazmit Reaktif stabilite kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz. **Her bir primer mix için ayrı bir reaksiyon	PC	1x 500 µL	2,5 µL



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 ≥ 3 °C/sec. 2. 1-10 μ L mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve Rnaz içermeyen) 3. Spin Santrifüj: min.3000 rpm (8'li strip ve 2 mL mikrosantrifüjtüpü ile uyumlu) 4. Vorteks	5. PCR kurulumu için UV kabini 6. Soğuk Tüp standı (mikrosantrifüj tüpleri ve PCR tüp/stripleri için) 7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.

3. Valide qPCR Cihazları

SBT DiaPatogen CerviX12 HPV Genotiplendirme Kiti **Tablo 2**'de verilen cihazlar ile valide edilmiştir.

Tablo 2. Valide qPCR cihazına özgü plastik sarf malzemeleri

CFX96 Touch*	Rotor-Gene® Q
Kat#: 1845098; CFX Kalifikasyon plate ve filmi(96 kuyu)	Kat#: 981103; Qiagen Strip Tüpü ve Kapağı 0.1 mL (4 kuyu)
Kat#: BS2001 Ultra optik yarı etekli qPCR plateve filmi (96 kuyu)	
Kat#: TLS0851; Beyaz Strip (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) 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. **Laboratuvara VTM içinde gelen örnekler nükleik asit ekstraksiyonuna tabii tutulmalıdır.**

6. Analitik Performans

SBT DiaPatogen CerviX12 HPV Genotiplendirme Kiti pre-klinik optimizasyonu ve validasyonu Karolinska Enstitüsü Uluslararası İnsan Papillomavirüsü Referans merkezi pozitif kontrol klonlarının sekansları (K02718, X05015, J04353, M12732, X74477, M62849, X74479, M62877, X74481, U37488, X74483, D90400, X77858, U31794, X67161) kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmalarda tekrarlanabilirlik, hassasiyet, özgüllük, lineerlik, parametreleri incelenmiş ve optimize edilmiştir.

7. 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!
4. 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	Hacim	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
2X Master Mix	5 µL	1	95°C	3 dk
Hedef Primer Mix	2,5 µL	39	95°C	10 sn
Örnek Nükleik Asit	2,5 µL		60 °C	15 sn
Toplam reaksiyon hacmi	10 µL	FAM / HEX / ROX / CY5 Okuma		

8. Test Sonuçlarının Yorumlanması

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 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.**

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 ≤ 36.0 = Geçerli	
İnsan RNaseP	IC	Örnekleme, DNA bütünlüğü, nükleik asit ekstraksiyonu ve ters transkripsiyon ve qPCR inhibisyonu kontrolü	Cq ≤ 34.0 = Geçerli	IC Cq ≥ 34.0, ise fakat hedef Cq ≤ 36.0 ise IC geçerli

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.

Tüm kontroller geçerliyse, sonuçların yorumlanmasına geçiniz.

- Gen hedeflerinin Cq değeri ≤ 36 ise, **pozitif** olarak sonuçlandırınız.
- Gen hedeflerinin Cq değeri > 36 ise, **negatif** olarak sonuçlandırınız.

9. Sınırlamalar

- SBT DiaPatogen CerviX12 HPV Genotiplendirme Kiti performansı servikal, penis ve vajinal sürüntü 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.
- İnhibitörler veya diğer enterferans etkenler yanlış negatif sonuç alınmasına neden olabilir. Numunede yetersiz sayıda hedef organizma bulunduğu durumlarda da yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir.