

1. Ürün Açıklaması

TÜSEB DiaKit HighRisk HPV qPCR Tanı Kiti, in vitro tıbbi tanı kiti olarak 98/79/EC sayılı EC direktifine göre üretilmiştir. Klinik ve araştırma laboratuvarlarında profesyonel kullanım için tasarlanmıştır.

2. Yöntem

Bu kit, gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle HPV 16, 18, 45 türlerini ve 11 adet HPV tipinin tespitine dayanmaktadır. Korunmuş E1/E2 genlerine ait spesifik bölgelerin amplifikasyonu sonucu elde edilen floresan ışımının tespitiyle yapılmaktadır.

Kitin tespit edebildiği **Yüksek Riskli HPV** türleri: 31,33,35,39,51,52,56,58,59,66,68 (**Primer Mix-2**).

Yüksek riskli HPV türlerinin varlığı, FAM kanalına ait floresan artış ile gösterilmektedir. Kit aynı anda HPV 16, 18 ve 45 tipini farklı kanallarda tespitini mümkün kılmaktadır. *HPV16* türünü FAM floresan kanalında, *HPV 18* türünü HEX floresan kanalında ve *HPV 45* türünü ROX floresan kanalında tespit etmektedir. (**Primer Mix-1**). DNA ekstraksiyonu kalite kontrolü ve olası qPCR inhibisyon kontrolü için RNaseP geni internal kontrol olarak kullanılmaktadır. RNaseP geninin amplifikasyonu Primer Mix-1 için Cy5 floresan kanalında, Primer Mix-2 için HEX floresan kanalında tespit edilmektedir. Özel olarak yapılan moleküler dizayn, spesifik olmayan amplifikasyonları en aza indirerek maksimum hassasiyet sağlayan yeni baskılayıcı (quencher) teknolojilerinden yararlanmaktadır.

5. Kitin İçeriği

Kit içerikleri	Miktar
	1000 reaksiyon
2XMaster Mix	6 x 1670 µL
Primer Mix-1	2 x 1250 µL
Primer Mix-2	2 x 1250 µL
Pozitif kontrol	1 x 500 µL
Negatif kontrol	1 x 1000 µL

Tablo1. Kit içeriği

6. Nükleik Asit İzolasyonu

Belirli klinik materyallerden nükleik asit izolasyonu için ticari olarak kullanılan izolasyon kitleri ile yapılmalıdır.

7. qPCR Reaksiyon Kurulumu ve Amplifikasyon Profili

1 adet örnek için kurulum şu şekildedir:

- Eppendorf tüp içerisine 5 µL Master Mix ekleyiniz.
- Ardından 2,5 µL Primer Mix ekleyiniz.
- Elde edilen 7.5 µL reaksiyon karışımını strip veya plate içerisine dağıtınız. **Her bir Primer Mix için bu işlemi ayrı ayrı tekrarlayınız.**
- Daha sonra bu reaksiyon karışımı üzerine klinik örneklerden elde edilen izolasyon içeriğinden 2.5 µL ekleyiniz.
- Her bir kuyucuk içerisindeki son hacmin 10 µL olmasına dikkat edilmelidir. Sonuç olarak bir adet DNA izolatı için iki ayrı kuyuda iki ayrı PCR reaksiyonu kurulmalıdır.

ÖNEMLİ UYARI!

qPCR hazırlığı sırasında tüm bileşenlerin +2 °C ile +8 °C arasında tutulması gereklidir.

Bu aşamalardan sonra plate veya striplerin iyice kapatıldığından emin olduktan sonra cihaza yüklenmelidir. Her bir çalışma için, kit içerisinde bulunan Pozitif Kontrol ve Negatif Kontrol örnekleri ayrı ayrı dahil edilmelidir. Pozitif Kontrol materyali laboratuvar personeli

için herhangi bir kontaminasyon tehlikesi ihtiva etmemektedir. Fakat kurulum sırasında diğer tüpleri ve reaksiyon karışımlarını kontamine etmemek için dikkatli konulması tavsiye edilmektedir. Üretici, yanlış kullanım nedeniyle kitin bozulmasından sorumlu değildir.

7.qPCR Reaksiyon Kurulumu ve Amplifikasyon Profili, ekstrakte edilmiş saf DNA için geçerlidir. SBT DiaDirect qPCR Solüsyonu ile çalışmak için 8. SBT DiaDirect qPCR Solüsyonu için Reaksiyon Kurulumu ve Amplifikasyon Profili başlığını inceleyiniz.

qPCR Protokolü		
Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre
1	95°C	3 dk
40	95°C	5 sn
	60°C	10 sn
Floresan Okuma	FAM / HEX / ROX / CY5 (PRIMER MIX-1) FAM / HEX (PRIMER MIX-2)	

UYARI!! Floresan kanal adları, kullanılan cihazlara göre farklılık gösterebilmektedir. Uygun nanometre ile floresan kanallarını seçiniz.

8. SBT DiaDirect qPCR Solüsyonu için Reaksiyon Kurulumu ve Amplifikasyon Profili

SBT DiaDirect qPCR Solüsyonu, Viral Transport Medium (VTM) içerisinde bulunan klinik numunelerin herhangi bir nükleik asit saflaştırma işlemine gerek kalmadan qPCR çalışmalarında kullanılabilmesi için geliştirilmiştir. Özel formülasyonu sayesinde VTM içinde bulunan viral patojenlerin, PCR reaksiyonundaki ön denatürasyon basamağında parçalanmasını ve nükleik asitin açığa çıkmasını sağlar.

İçerik	Miktar	Son Konsantrasyon
2X Master Mix	7,5 µL	1X
Primer Mix	2,5 µL	-
SBT DiaDirect	2,5 µL	-
Örnek (VTM)	2,5 µL	-

2X Master Mix, Primer Mix ve SBT DiaDirect qPCR Solüsyonlarını oranları koruyarak örnek sayısına göre hesaplayıp, ayrı bir tüpte karıştırınız. *TÜSEB DiaKit HighRisk HPV qPCR Tanı Kiti'nde bulunan her bir Primer Mix için bu işlemi ayrı ayrı tekrarlayınız. Vortexlemeyiniz.* Yavaşça alt-üst ederek homojen hale getiriniz. Elde edilen karışımı PCR kuyularına 12,5 µL olacak şekilde dağıtınız. Daha sonra bu reaksiyon karışımı üzerine klinik örneklerden (VTM) 2.5 µL ekleyiniz. Her bir kuyucuk içerisindeki son hacmin 15 µL olmasına dikkat edilmelidir. Sonuç olarak bir adet klinik örnek için iki ayrı kuyuda iki ayrı PCR reaksiyonu kurulmalıdır.

qPCR Protokolü		
Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre
1	95°C	3 dk
35	95°C	10 sn
	60°C	45 sn
Floresan Okuma	FAM / HEX / ROX / CY5 (PRIMER MIX-1) FAM / HEX (PRIMER MIX-2)	

SBT DiaDirect qPCR Solüsyonu ile yapılan çalışmalarda;

- Grafik sonuçlarının yorumlanmasında PCR cihazının atadığı oto threshold kullanılmalıdır.
- Threshold altında kalan **lineer** grafikler negatif olarak değerlendirilmelidir.
- Threshold altında kalan ancak net bir şekilde **sigmoidal** yapıda olan grafikler için reaksiyon tekrar edilmelidir.
- Cihazın Ct değeri atadığı ancak **sigmoidal** yapıda olmayan grafikler negatif olarak değerlendirilmelidir.
- 33. döngüden sonra **lineer** grafikler görülebilir. Bu grafikler genellikle diğer boya kanallarının yansımasıdır. Bu şekilde olan grafikler negatif olarak değerlendirilmelidir.
- SBT DiaDirect qPCR Solüsyonu, ekstraksiyon basamağını ortadan kaldırır. Bundan dolayı PCR kuyularındaki protein kirliliği oranı artmaktadır. Bu durum, kullanılan qPCR kitinin hassasiyetini %1-2 oranında düşürebilmektedir.
- 5. Kitin İçeriği bölümünde bulunan miktarlar ekstrakte DNA çalışması için geçerli kit içeriğidir. SBT DiaDirect qPCR Solüsyonu ile kullanımı için üretici firma ile iletişime geçiniz.

Detaylı bilgi için SBT DiaDirect qPCR Solüsyonu kullanım kılavuzunu inceleyiniz.

9. Sonuçların Yorumlanması

PRIMER MIX-1 (16,18,45 türleri)				
FAM	HEX	ROX	Cy5	DEĞERLENDİRME
-	-	-	+	Hpv 16,18,45 Neg.
+	-	-	+	Hpv 16 poz.
-	+	-	+	Hpv 18 poz.
-	-	+	+	Hpv 45 poz.
-	-	-	-	Geçersiz

Diğer kanallar **negatif** olduğunda internal kontrol (Cy5) her zaman **pozitif** olmalıdır. Aksi takdirde test tekrarlanmalıdır. Diğer kanallardan herhangi birinde **pozitif** sonuç varsa ve internal kontrol **negatif** ise sonuç geçerli sayılır.

PRIMER MIX-2 (Yüksek Riskli Türler: 31,33,35,39,51,52,56,58,59,66,68)		
FAM	HEX	DEĞERLENDİRME
-	+	Yüksek Riskli Türler Neg.
+	+	Yüksek Riskli Türler Poz.
-	-	Geçersiz

!! Fam kanalında pozitif bir değer, yukarıda listelenen HPV tiplerinden en az biri için pozitif anlamına gelir. FAM kanalı **negatif** olduğunda internal kontrol (HEX) her zaman **pozitif** olmalıdır. Aksi takdirde test tekrarlanmalıdır. FAM kanalında **pozitif** sonuç varsa ve internal kontrol **negatif** ise sonuç geçerli sayılır.

UYARI

Kit için tek bir geçerli Kullanım Talimatı pakete dahil edilmiştir veya üreticiden belirli bir parti için istenecektir. Kitin özel güvenlik yönetmeliklerine tabi olabilecek tehlikeli, bulaşıcı veya toksik bileşenler içermediği ve ambalaj malzemelerinin kâğıt ve polipropilenden yapılmış olduğu göz önünde bulundurularak, kullanım sonrası mevcut yasal düzenlemelere göre imha edilmelidir.

Herhangi bir sorunuz varsa lütfen iletişime geçiniz.