

Kullanım kılavuzu

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™

Rektal sürüntülerde Enterobakterilerden karbapenemaz genlerinin tespiti ve ayrıştırılması

Versiyon 1.5

Yayın tarihi: 20.07.2017

REF

18-0051



24

CE IVD

İçindekiler

Kullanım amacı.....	2
Yöntemin tanıtımı ve prensibi	2
Kit içeriği (24 reaksiyon için).....	2
Gerekli fakat kit içinde sağlanmamış malzemeler.....	2
Saklama ve stabilite.....	2
Uyarılar ve Önlemler	3
Kullanım Talimatı	4
Örnek hazırlama prosedürleri	4
BD MAX™'ı çalıştırma	4
Sonuçların Yorumlanması.....	5
Sık Sorulan Sorular (SSS) ve Sorun Giderme	6
Kısıtlamalar	7
Kullanılan sembollerin açıklaması.....	7
Teknik yardım.....	7
Ek 1: Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ test programı v.4.30B veya daha yüksek sürümü oluşturma.....	8
Ek 2: Performans Özellikleri	9

Kullanım amacı

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, rektal sürüntülerde *Enterobakterilerden* karbapenemaz genlerinin hızlı tespiti ve ayrıştırılmasına yönelik kalitatif *in vitro* diagnostik testtir. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, şu anda *Enterobakterilerde* karbapenemaz üretiminin ana nedeni olan KPC, NDM, VIM ve OXA-48 karbapenemaz genlerinin varlığını tespit eder. Testte, DNA ekstraksiyonu için BD MAX™ sistemi ve üniversal reaktifler; takiben gerçek zamanlı PCR için tek kullanımlık malzemelerle birlikte temin edilen reaktifler kullanılır. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, karbapenemaz üreten ve sağlık hizmeti ortamlarında hastaları kolonize eden *Enterobakterilerin* tespiti, önlenmesi ve kontrolüne yardımcı olarak kullanılabilir. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, karbapenemaz üreten *Enterobakterileri* içeren enfeksiyonları teşhis etmek veya bu enfeksiyonların tedavisine rehberlik etmek ya da tedaviyi izlemek amacıyla tasarlanmamıştır. Epidemiyolojik tipin belirlenmesi amacıyla organizmaların elde edilmesi, duyarlılık testi veya daha ileri doğrulayıcı tanımlama için paralel kültürler gereklidir.

Yöntemin tanıtımı ve prensibi

Enterobakteriler arasında karbapenem direncinin dünya çapında ortaya çıkması ve yayılması, kamu sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu organizmalar yüksek mortalite oranları ile ilişkilendirilmekte olup geniş çapta yayılma potansiyeline sahiptir. *Enterobakterilerde* karbapenem direncinin en yaygın nedeni, karbapenemaz ekspresyonu, yani *i.e.* Karbapenemaz Üreten *Enterobakteriler* veya CPE'dir. CPE, karbapenemler veya diğer β-laktam antibiyotiklerin birçoğuna karşı yüksek ya da tam dirence sahiptir. Şu anda, CPE'nin büyük çoğunluğu aşağıda belirtilen plazmid şifreli karbapenemazlardan biriyle ilişkilendirilmektedir: KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz), VIM (Verona integron şifreli metallo-β-laktamaz), NDM (Yeni Delhi metallo-β-laktamaz) veya OXA-48 (Oxacillinase-48 ve OXA-48 benzer varyantları). Ayrıca CPE, birçok ilaca karşı ve pan ilaç direncine sahip izolatlarla sonuçlanan diğer β-laktam olmayan direnç belirleyicilerine sahiptir.

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™; KPC, OXA-48, NDM ve VIM karbapenemaz genlerinin tespiti için multipleks ve gerçek zamanlı PCR testidir. Test, hedef sekansların PCR ile spesifik tanınması ve amplifikasyonu, floresan DNA problemleri tarafından PCR amplifikasyon ürünlerinin akümüülasyonunun eş zamanlı tespitine dayalıdır. KPC, VIM, OXA-48 ve NDM için birçok gen varyantı mevcuttur ve Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ varyantların birçoğunu güvenilir bir biçimde tespit etmek amacıyla tasarlanmıştır. Her direnç geni için tespit edilen veya tespit edilmesi tahmin edilen varyantlar, *simülasyon* olarak Ek 2'de özgüllük paragrafında verilmiştir. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, beş farklı floresan tipte prob içermekte olup 4 karbapenemaz geninin tespiti ve ayrıştırılması ile DNA ekstraksiyonu ve PCR amplifikasyonunu izleyen hedef SPC'nin kontrolünü sağlar.

Kit içeriği (24 reaksiyon için)

Bileşenler (Mat. No.)	Açıklama
CPE Screen for BD MAX™ reaktif tüpleri (9-0121)	24 kapaklı tüp (mavi kapak)
CPE pozitif kontrol (9-0061)	1 tüp (mor kapak) 100 µl
CP Mastermix (9-0122)	1 tüp (yeşil kapak) 330 µl
Kullanım Kılavuzu (9-0124)	Broşür - web sitesinden indirin

Gerekli fakat kit içinde sağlanmamış malzemeler

Tedarik Malzemeleri	Donanım
<ul style="list-style-type: none">BD MAX™ ExK DNA-1 Ekstraksiyon Kiti (Ref:442818)BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)Tek kullanımlık laboratuvar (pudrasız) eldivenleri10 ve 25 µL hacimler için pipetler ve tek kullanımlık (filtreli) uçlarPCR sınıfı su (örn. Milli-Q veya aqua bidest)Rektal numune toplanmasına uygun swablar ve nakil aracı. Önerilen sürüntü toplama cihazı: Copan ESwab, Cat.No. 480CE	<ul style="list-style-type: none">Gerçek zamanlı PCR aleti: BD MAX™ Sistemi, yazılım sürümü 4.30B veya daha yüksekVorteks mikser

Saklama ve stabilite

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ kiti, ortam sıcaklığında temin edilmekte olup alındıktan sonra karanlıkta ve 2 ila 8 °C'de saklanmalıdır. Reaktifler 2 ila 8 °C'de belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ reaktif tüpleri, PCR Mastermix ve pozitif kontrol kapalı poşet içerisinde temin edilir. Reaktifleri nemden korumak için, poşeti açtıktan hemen sonra tekrar sıkıca kapatın. Reaktif tüpleri, poşetin ilk açılışından ve tekrar kapatılmasından sonra 2 ila 8 °C'de 14 güne kadar stabildir.

Uyarılar ve Önlemler

- Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ *in vitro* Diagnostik Kullanım içindir.
- Bu ürün sadece BD MAX™ Sisteminde kullanılabilir.
- Dış kartonu mühürleyen etiket bozulmuşsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu poşetler geldiklerinde açık veya yırtıksa reaktifleri kullanmayın.
- Reaktiflerin koruyucu poşetini her kullanımdan sonra fermuar şeklinde kapanan mühürle hemen kapatın. Mühürlemeden önce varsa poşetlerdeki fazla havayı çıkarın.
- Reaktif striplerini uygun sıvı dolması açısından kontrol edin (sıvıların tüplerin alt kısmında olmasını sağlayın).
- Tüm pipet uçlarının var olduğundan emin olmak için reaktif striplerini kontrol edin.
- Reaktif poşetlerinden kurutucuyu çıkarmayın.
- Reaktifleri reaktif poşetleri içinde kurutucu yoksa veya açılmışsa kullanmayın.
- Reaktifleri folyo bozulmuş veya hasarlıysa kullanmayın.
- Farklı poşetler ve/veya kitler ve/veya lotlardan reaktifleri karıştırmayın.
- Kontaminasyon oluşacağından ve test sonuçlarını olumsuz etkileyebileceğinden kapakları birbirleriyle değiştirmeyin veya tekrar kullanmayın.
- Master Mix ve Ekstraksiyon Tüpü barkod okunabilirliği bozulabileceğinden kimyasal solüsyonları kullanırken dikkatli davranın.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifler ve/veya materyalleri kullanmayın.
- Bu testin düzgün yapılması için uygun laboratuvar tekniği şarttır. Testin yüksek analitik hassasiyeti nedeniyle tüm malzemelerin ve reaktiflerin saflığını korumak için büyük dikkat gösterilmelidir.
- Amplikonlar tarafından kontaminasyonu önlemek için kullanım öncesinde BD MAX™ PCR Kartuşlarını açmayın. BD MAX™ PCR kartuşlarının mühürleri kontaminasyonu önleyecek şekilde tasarlanmıştır.
- Check-Direct CPE Screen for BD MAX™'in önerilen süre aralıklarının dışına çıkması geçersiz sonuçlara neden olabilir. Belirtilen süreler içinde yapılmayan testler yeni bir örnek ile tekrarlanmalıdır.
- Yerel, bölgesel ve/veya ulusal yönetmelikler veya sertifikasyon sağlayan kurumların gereklilikleri veya kılavuz ilkelere göre ek kontroller test edilebilir.
- Kültür veya diğer PCR testlerinin aynı laboratuvarda gerçekleştirilmesi durumunda, Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ bileşenleri, test için gerekli tüm reaktifler ve BD MAX™ Sistemi'nin kontamine olmamasına dikkat edilmelidir. Her zaman reaktiflerin mikrobiyal ve deoksiribonükleaz (DNase) kontaminasyonunu önleyin. Reaktifler ve kartuşlar kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir.
- Örnekleri her zaman bulaşıcı olabilirlermiş gibi ve CLSI Belgesi M2911'de ve Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories'te tanımlandığı şekilde güvenli laboratuvar prosedürlerine göre kullanın.
- Tüm reaktifleri kullanırken koruyucu giysiler ve tek kullanımlık eldivenler kullanın.
- Testi yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Örneklerin veya kit reaktiflerinin kullanıldığı yerlerde sigara içmeyin, bir şey içmeyin, çiğnemeyin veya yemeyin.
- Kullanılmamış reaktifleri ve atığı yerel, eyalet, bölgesel ve/veya federal yönetmeliklere göre atın.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı Kılavuzuna başvurun.

Teste başlamadan önce lütfen tüm protokolü okuyun

Kullanım Talimatı

Örnek hazırlama prosedürleri

Rektal swablar için test hazırlığı

Not: Örnek toplama ve saklama prosedürü, yeterli düzeyde örnek toplama cihazları kullanılarak dikkatli bir şekilde izlenmelidir (bkz. bölüm *Gerekli fakat sağlanmamış malzemeler*). Rektal sürüntüler örnek toplama prosedürüne bağlı olarak farklı miktarlarda fekal malzeme içerecektir. Testin rutin kullanımından önce Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ ile örnek toplama ve işleme yönteminizi doğrulamak için Check-Points önerileri:

1. Rektal örneği yerel yönetmeliklere ve swab üreticisinin tavsiyelerine göre toplayın.
2. Swabları sıvı transport besiyeri içeren tüplere aktarın.
3. Analiz edilecek rektal sürüntü örneklerini PCR odasına aktarın veya swab üreticisinin önerisi ve/veya yerel yönetmelikler uyarınca bir sonraki kullanıma kadar saklayın.
4. Her tüpü rektal örnekle kısa süreliğine karıştırın ve transport besiyerinin 25 µL'sini bir DNA Sample Buffer Tube SB-1'e aktarın.
5. Sample Buffer Tube'ü mavi bir septum kapak ile kapatın ve orta hızda 10 saniye boyunca tüpü vorteksleyin.

Kontrol reaksiyonlarının hazırlanması

Çalışmayı doğrulamak için her Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ PCR çalışması için pozitif ve negatif kontrol reaksiyonu gerçekleştirin. Pozitif kontrol kit içerisinde temin edilir.

- **Pozitif kontrol:**
Pozitif kontrolün 10 µL'sini bir Sample Buffer Tube'e pipetleyin. 10 saniye vorteksleyin.
- **Negatif kontrol:**
PCR için uygun suyun 10 µL'sini bir Sample Buffer Tube'e pipetleyin. 10 saniye vorteksleyin.

BD MAX™'i çalıştırma

1. Multipleks gerçek zamanlı PCR kurulumu

Tablo 1, BD MAX™ sisteminin her bir dedektör kanalında tespit edilen hedeflerle birlikte multipleks gerçek zamanlı PCR ayarını temsil etmektedir.

Tablo 1: Multipleks qPCR ayarı

Dedektör	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Channel (Kanal)	1	2	3	4	5
Hedef	KPC	VIM	OXA-48	NDM	SPC*

*SPC: Örnek İşleme Kontrolü

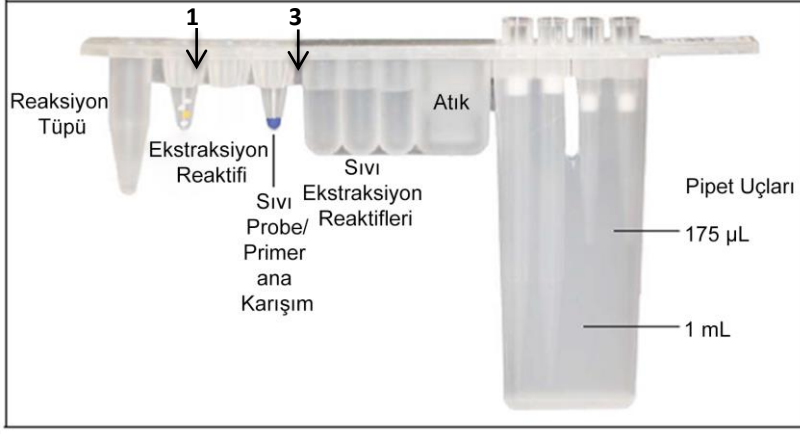
Test işlemi ilk defa gerçekleştirildiğinde PCR test programını Ek 1'de açıklandığı üzere "C-D CPE Screen" olarak oluşturun.

2. BD MAX™ tepsi kurulumu

2.1. BD MAX™ sistemi tepsilerini, test edilecek örnek sayısı için gereken sayıda DNA Ünitelendirilmiş Reaktif Stripi ile yükleyin. Tüm sıvıların haznenin alt kısmında olduğundan emin olmak için her stripe hafifçe vurun.

2.2. Ünitelendirilmiş Reaktif Striplerini Hazırlayın:

- 2.2.a. Ünitelendirilmiş Reaktif Striplerini BD MAX™ tepsinde yerlerine koyun. Stripleri "yerlerine oturtmayın".
- 2.2.b. DNA ekstraksiyon BD Exk-1 Reaktif tüpünü (beyaz kapak) DNA Stripindeki **1** pozisyon 1'e oturtun, bkz. Şekil 1.
- 2.2.c. CPE Screen reaktif tüpünü (mavi kapak) DNA Stripteki yerine **3** oturtun, bkz. Şekil 1.
- 2.2.d. CPE Screen reaktif tüpünün mavi kapağını **3**, *örn.* tek kullanımlık pipet ucu ile yerinde delin. Ardından hava baloncukları oluşturmamaya dikkat ederek 12,5 µL CP Mastermix karışımını tüpün alt kısmına boşaltın.
- 2.2.e. Strip hazırlığı tamamlandığında Ünitelendirilmiş Reaktif Striplerini raf konumlarına oturtun.



Şekil 1: DNA Ünitelendirilmiş Reaktif Stripi ayarı.

3. BD MAX™ cihazında test kurulumu

- 3.1 BD MAX™ Sistemi **software v4.30B** (yazılım v4.30B) veya üzerindeki **Run** (Çalıştır) sekmesini açın ve **Worklist**'i (İş Listesi) doldurun.
- 3.2 “C-D CPE Screen” Testini seçin. Test menüsünde bulunmaması halinde “C-D CPE Screen” testini oluşturmak için Ek 1'e bakın.
- 3.3 Barkod tarayıcıyı kullanarak **Sample Buffer Tube** barkodunu girin (barkodu manuel olarak da girebilirsiniz). Raf A'nın 1. pozisyonuyla başlayın. Her Sample Buffer Tube'u BD MAX™ raflarındaki (septum kapağıyla) ilgili pozisyonlarına yerleştirin.
- 3.4 Örnek veya hasta kimlik bilgilerini iş listesinin **Accession** (Erişim) bölümüne girin. Her örnek veya hasta bilgisinin tepsideki spesifik Sample Buffer Tube'a karşılık geldiğini kontrol edin.
- 3.5 Tepsiyi BD MAX™ Sistemine yükleyin. (Tepsi A, cihazın sol tarafına ve Tepsi B sağ tarafına yerleştirilir).
- 3.6 BD MAX™ PCR kartuşu/kartuşlarını yükleyin.
- 3.7 Cihazın kapağını kapatın ve **Start Run** (Çalışmayı Başlat) öğesini seçin.

Sonuçların Yorumlanması

Başlamadan önce önemli noktalar: Verilerin analiz yöntemine ilişkin ayrıntılı açıklamalar için *BD MAX™ Sistemi Kullanıcı kılavuzuna* bakın.

Test edilen her örnek için amplifikasyon grafiğini yazılımla elde edilen C_T değerlerine karşı daima görsel olarak inceleyin.

1. Bildirilen sonuçlar

BD MAX™ yazılımı aşağıdaki yöntemle test edilen her örneğin her bir dedektör kanalı için C_T değerleri ve amplifikasyon eğrilerini rapor eder:

- C_T 0 değeri, belirlenen Eşik Değeri (bkz. Ek 1) ile hesaplanan C_T değeri bulunmadığını ifade eder. "0" C_T değeri gösteren örneğin amplifikasyon eğrisi manuel olarak kontrol edilmelidir.
- C_T -1 değeri, geçerli amplifikasyon işlemi gerçekleşmediğini belirtir. Örnek için grafik sonuçlarda C_T -1 değerine sahip amplifikasyon eğrisi bulunmadığını kontrol edin.
- Diğer C_T değerleri amplifikasyon eğrisiyle korelasyon içinde ve Tablo 2 ve 3'te belirtilen yorumlama talimatlarına göre yorumlanmalıdır.

2. Yorumlama

2.1 Çalışma doğrulaması

Sonuçları yorumlamadan önce gerçek zamanlı PCR çalışmasının geçerli olduğunu doğrulayın. BD MAX™ Sistem hatası raporu bulunmadığından emin olun. Varsa pozitif ve negatif kontrol amplifikasyon eğrilerini kontrol edin. Tablo 2'de BD MAX™ Sisteminde geçerli Check-Direct CPE Screen için kriterler gösterilmektedir. Kontrollerin C_T değerleri beklenen şekilde değilse SSS ve Sorun Giderme bölümlerine bakın “3”.

Tablo 2: Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ testi ile geçerli çalışma için kriterler.

Örnek Tipi*	C _T 475/520 KPC	C _T 530/565 VIM	C _T 585/630 OXA-48	C _T 630/665 NDM	C _T 680/715 SPC
Pozitif kontroller	32 ±3	29 ±3	28 ±3	31 ±3	28 ±3
Negatif örnek	-1	-1	-1	-1	28 ±3

2.2 Sonuçların yorumlanması

Çalışma doğrulanmışsa sonuçları örneklerden alınan C_T değerleri ile Tablo 3'te özetlenen talimatlara uygun biçimde pozitif, negatif veya çözümlenmemiş olarak yorumlayın. Lütfen her örneğin amplifikasyon eğrisinin C_T değerleri ve yazılım tarafından sunulan sonuç yorumlamasına uygun olduğunu her zaman kontrol edin. Çözümlenmemiş çalışmalar yeniden test edilmelidir.

Tablo 3: Rektal sürüntüler için veri yorumlama talimatları.

KPC, VIM, OXA, NDM C _T değerleri	SPC C _T değerleri	Yorumlama
EVET	EVET	Pozitif örnek
-1	28 ± 3	Negatif örnek
-1	< 25 veya > 32	Unresolved (Çözümlenmemiş)
-1 veya EVET	-1	Unresolved (Çözümlenmemiş)

ÖNEMLİ NOTLAR:

- "EVET", C_T değerinin gözlemlendiği ve sonuçlar tablosunda verildiği anlamına gelir.
- Pozitif bir test sonucu test edilen örnekte canlı organizmaların mutlaka bulunduğu anlamına gelmez.
- Rektal swabların C_T değerleri, fekal malzemedeki farklılıklar ve transport besiyerindeki rektal swabların "bakteriyel yükü" nedeniyle büyük oranda farklılık gösterebilir.
- BD MAX™, sistem arızası nedeniyle Belirlenmemiş veya Tamamlanmamış sonuçlar (IND veya INC) verirse lütfen yerel BD temsilcinizle iletişime geçin.

Sık Sorulan Sorular (SSS) ve Sorun Giderme

Ek bilgiler için BD MAX™ Sistemi Kullanım Kılavuzunun "sorun giderme" bölümüne bakın

1. **Gerçek zamanlı sonuçlar C_T değeri göstermiyor veya yorumlama örneğin çözümlenmemiş olduğunu ifade ediyor**
Olası nedenler ve sorun giderme:
 - PCR reaksiyonu eksojen veya endojen maddeler tarafından inhibe edilmiştir. Lütfen örnek testini tekrarlayın. Halen inhibe edilmiş olması halinde daha az miktarda örnek ile sonuçlar iyileştirilebilir.
 - SPC'nin tespit edilmemesi nedeniyle DNA ekstraksiyonu başarısız olmuştur.
 - CPE Screen reaktifi veya CP Mastermix karışımının kullanım tarihi geçmiş olabilir.
 - Sıvı işlemede bir hata meydana gelmiştir: sıvı işleme sorununun nerede oluştuğunu belirlemek için ünitelendirilmiş reaktif striplerini ve PCR kartuşunu kontrol edin (örneğin: kartuşta hava kabarcığı) ve örneği yeniden test edin. Sorun devam ederse, yerel BD temsilcinizle bağlantı kurun.
2. **Çözümlenmemiş sonuçlar için sorun giderme.**
Çözümlenmemiş sonuçlar için: Yeni Sample Buffer Tube hazırlayarak testi orijinal örnekle tekrarlayın. Alternatif olarak yeni toplanan örneği test edin veya daha az miktarda örnek kullanın.
3. **Gerçek zamanlı sonuçlar pozitif kontrol için C_T değeri göstermiyor veya yorumlama örneğin çözümlenmemiş olduğunu bildiriyor.**
Olası nedenler ve sorun giderme:
 - Pozitif kontrol eklenmemiştir.
 - CPE Screen reaktifi veya CP Mastermix karışımının kullanım tarihi geçmiş olabilir.
 - Pozitif kontrolün PCR reaksiyon bölgesinde hava kabarcıkları oluşmuş olabilir.
4. **Gerçek zamanlı sonuçlar tüm örneklerde ve SPC sinyali dahil olmak üzere dedektör kanallarında oldukça düşük floresan sinyali gösteriyor.**
Olası nedenler ve sorun giderme:
 - Floresan probalar ve primerler içeren CPE Screen reaktif tüpleri azaltılabilir. Lütfen son kullanma tarihini kontrol edin ve CPE Screen tüplerinin düzgün biçimde saklandığından emin olun.
 - BD MAX™ Sistemi bu sonuçlardan sorumlu olabilir. Lütfen BD MAX™ Kullanım kılavuzuna bakın veya BD yerel temsilcinizle iletişime geçin.
5. **BD MAX™ Sistemi bir hata veya arıza bildiriyor.**
BD MAX™ cihazı kullanım kılavuzuna bakın BD yerel temsilcinizle iletişime geçin.
6. **Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ ile test edilen kopya örnekler özdeş sonuçlar üretmiyor.**
Özdeş örneklerin C_T değerleri ayrı reaksiyonlar arasında farklılık gösterebilir. Büyük varyasyonlar > 2 C_T değerleri, kopya örnekler arasında pipetleme hataları veya diğer farklılıklar olduğunu belirtir.

Kısıtlamalar

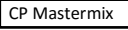









Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, klinik açıdan en yaygın karbapenemazları temsil eden KPC, NDM, OXA-48 ve VIM karbapenemaz genlerinin varlığını tespit etmek için çeşitli DNA işaretleri kullanır. Test, yalnızca *Pseudomonas aeruginosa* içinde bulunan nadir bir varyant olan VIM-7 dışında halihazırda bilinen tüm KPC, NDM, OXA-48 ve VIM varyantlarını tespit eder. Diğer nadir karbapenemaz geni ailelerinin de tespit edilmediği unutulmamalıdır. Test, örnek olarak yalnızca transport besiyerindeki rektal swablar için kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Örnek DNA'sının kalitesi, Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ ile güvenilir sonuçlar elde etmek için önemli bir faktördür. DNA, bu kılavuzda açıklanan cihazlar ve prosedürler kullanılarak rektal swablardan ekstrakte edilmelidir. Test; *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Pseudomonas* gibi gram negatif bakterilerden saflaştırılmış DNA ile kapsamlı bir biçimde gerçekleştirilmiş olup mükemmel sonuçlar elde edilmiştir. Ancak diğer Gram-negatif bakterilerin veya yukarıdaki türlerin belirli tiplerinin yetersiz sonuçlar verebileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, tüm gram-negatif türlerde, alt türlerde, tiplerde veya tüm klinik örneklerde karbapenemaz genlerini doğru bir biçimde tespit etme kapasitesine sahip olduğuna dair herhangi bir beyan ya da garanti vermemektedir. Sonuçların belirli durumlarda ek metodolojilerle onaylanması gerekebilir (örn. düzenleyici örnekler için). Bakteriyel genomların yüksek değişkenliği nedeniyle belirli alt türler tespit edilemeyebilir. Test, Check-Points Health B.V'nin mevcut bilgisini yansıtmaktadır.

Pozitif bir test sonucu, test edilen örnekte canlı organizmaların mutlaka bulunduğu anlamına gelmez. Karbapenemaz DNA'sı canlılığını yitirmiş organizmalardan tespit edilmiş olabilir.

Bir örnekte birden fazla bakteri türünün bulunması testin yorumlanmasını engelleyebilir. Diğer diagnostik testlerde olduğu gibi bu testin sonuçları yalnızca sorumlu kişiye verilen ek laboratuvar verileri ve klinik verilerle birlikte yorumlanabilir. Bu testin kullanımı DNA bazlı moleküler tespit yöntemleri konusunda iyi eğitim almış ve uygun biçimde kalifiye personelle sınırlandırılmıştır.

Kullanılan sembollerin açıklaması

Sembol	Tanım
	CP Mastermix (CP Ana Karışım)
	CPE kontrolü
	In Vitro Diagnostik Kullanım için
	Katalog numarası
	Parti kodu
	YYYY-AA tarihinden önce kullanın
	Kullanım talimatına bakınız
	Üretici
	Sıcaklık sınırlaması
	İçindekiler < n > testi için yeterlidir

Teknik yardım

support@check-points.com

+31 317 453 908

Protokolün geliştirilmesi ve hazırlanmasında son derece dikkatli olunmasına karşın Check-Points burada yer alan hatalar, eksiklikler ve/veya gelecekteki değişiklikler için herhangi bir sorumluluk almamaktadır.

Literatür Alıntısı: Bu ürünü kullanarak yayın için bir prosedür açıklaması yaparken ürünü "Check-Direct CPE Screen" olarak belirtin.

Alıcı Bildirimi:

Bu ürün PHRI Properties lisansı altında satılmakta olup yalnızca insan vücut dışı tıbbi tanı testleri, gıda testi, veterinerlik testi veya araştırma amacıyla PHRI Properties patent hakları tahtında kullanılabilir. Bu üründeki boya ve söndürücü bileşikleri Biosearch Technologies, Inc. lisansı altında satılmakta olup verilmiş veya uygulamadaki ABD ve dünya çapındaki patentler ile korunmaktadır. Lisans ataması insan *in vitro* diagnostik (vücut dışı tıbbi tanı) (IVD) uygulamalarını kapsar.

Ticari Markalar

BD, BD MAX™; Becton Dickinson GmbH'nin ticari markalarıdır.

Check-Points Health BV
Binnenhaven 5
6709 PD Wageningen
Hollanda

Tel: +31 317 453 908
Faks: +31 317 210 147
info@check-points.com
www.check-points.com



Ek 1: Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ test programı v.4.30B veya daha yüksek sürümü oluşturma

Başlamadan önce önemli noktalar: BD MAX™ Sistemi ve yazılım sürümü 4.30B ya da daha yüksek sürümün çalıştırma yöntemine ilişkin ayrıntılı talimatlar için BD MAX™ Sistemi Kullanım Kılavuzuna bakın.

Yeni bir Test oluşturmak için **Test Editor** (Test Düzenleyici) sekmesinde **Create** (Oluştur) öğesini seçin ve aşağıdaki talimatları uygulayın:

1. **Basic Information** (Temel Bilgiler) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin:

- **Test Name** (Test Adı): *C-D CPE Screen*.
- **Extraction Type** (Ekstraksiyon Tipi): *Exk DNA-1* (Plasma/Serum) seçin.
- **Master Mix Format** (Ana Karışım Formatı): *Tip 3'*ü seçin: *Primer ve Problar içeren Sıvı MM*.
- **Sample Extraction Parameters** (Örnek Ekstraksiyon Parametreleri): *User defined* (Kullanıcı tanımlı) öğesini seçin ve *Sample volume* (örnek hacmi) 600 µL olarak ayarlayın, bkz. Tablo A.
- **Ct Hesaplama**: *Call Ct at inflection point* (Ct'yi dönüm noktasında çağır) öğesini seçin.

Save parameters (Parametreleri kaydet)

2. **PCR Settings** (PCR Ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin:

- **Alias** (Kısa ad), **PCR Gain** (PCR Kazanımı) ve **Threshold** (Eşik Değer): her kanal dedektörü için Tablo B'de açıklanan doğru parametreleri girin.
- **Color compensation** (Renk dengelemesi): Tablo C'de açıklanan doğru parametreleri girin.

Save parameters (Parametreleri kaydet)

3. **Test Steps** (Test Adımları) sekmesinde Tablo D'de açıklandığı üzere PCR adımlarını girin.

Save parameters (Parametreleri kaydet)

Tablo A: *Sample Extraction Parameters* (Örnek Ekstraksiyon Parametreleri).

Parameters (Parametreler)	Value (Değer)
Lysis Heat Time (Lizis Isıtma Süresi)	10
Lysis Temperature (Lizis Sıcaklığı)	37
Sample Tip Height (Örnek Uç Yüksekliği)	1600
Sample Volume (Örnek Hacmi)	600
Wash Volume (Yıkama Hacmi)	500
Neutralization Volume (Nötralizasyon Hacmi)	----
DNase Heat Time (DNase Isıtma Süresi)	----

Tablo B: *Alias* (Kısa Adı), *PCR Gain* (PCR Kazanımı), *Threshold* (Eşik) parametreleri.

Detector (Dedektör)	Alias (Kısa Adı)	Gain (Kazanım)	Threshold (Eşik)
475/520	KPC	80	100
530/565	VIM	80	100
585/630	OXA-48	30	100
630/665	NDM	80	100
680/715	SPC	40	100

Tablo C: *Spectral cross-talk* (Spektral çapraz bulaş) parametreleri.

	False Receiving Channel (Yanlış Alan Kanalı)				
	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Uyarı Kanalı)	475/520	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	7.4	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	4.4

Tablo D: Test PCR Steps (Test PCR Adımları) parametreleri.

Step Name (Adım)	Profile Type (Profil Tipi)	Cycles (Döngüler)	Time (s) (Süre(ler))	Temp(°C) (Sıcaklık)	Detect (Saptama)
Denaturation (Denatürasyon)	Hold (Tutma)	1	600	98	HAYIR
Amplification & Detection (Amplifikasyon ve Saptama)	2 - temperature (sıcaklık)	50	15	98	HAYIR
			62	60	EVET

Ek 2: Performans Özellikleri

Rektal Swablarda Saptama Sınırı

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™'nin analitik saptama sınırı (LoD), iyi tanımlanmış hedef bakteri miktarlarına sahip rektal swablar kullanılarak belirlenmiştir. E-swab Amies taşıma maddesi (Copan), tipik rektal sürüntü örneğine benzer yaklaşık 10 mg/mL insan dışkı ile "numunelendirilmiştir". Hedef karbapenemaz genlerini içeren suşlar yetiştirilmiş ve hücre süspansiyonları 0,5 McFarland yoğunluğa sahip Milli-Q su içinde hazırlanmıştır. Bu hücre süspansiyonları, iyi belirlenmiş miktarda fekal malzeme ve hedef bakteriye sahip örnekler oluşturmak amacıyla yapay rektal swabları kirletmek için kullanılmıştır.

Bu Kullanım Kılavuzunun 4 ve 5. sayfalarında açıklandığı üzere protokol uyarınca analitik saptama sınırını (LoD) değerlendirmek amacıyla yukarıda açıklanan şekilde oluşturulan büyük bir örnek grubu kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki Tabloda gösterilmiştir. SBT, BD MAX™ Sample Buffer Tube anlamına gelir.

Hedef	SBT başına CFU	CFU/PCR	Başarı Oranı
KPC	116	13	100%
KPC	12	1	0 %
VIM	104	13	100 %
VIM	8	1	67%
OXA-48	176	22	100%
OXA-48	23	3	67%
NDM	119	14	100%
NDM	12	1	43%

Simülatif Özgüllük

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ gerçek zamanlı diagnostik testinin özgüllüğü, doğru primer ve problemlerin seçiminin yanı sıra sıkı reaksiyon koşullarının seçilmesi ile sağlanmaktadır. Primer ve Prob sekansları, aşağıdaki Tabloda belirtilen gen varyantlarını özel olarak tanımlamak amacıyla tasarlanmıştır. *Simülatif* analize göre primer ve problemlerle %100'lük sekans eşleşmesi belirtilen her varyantın güvenli saptamasını garanti etmek amacıyla ön görülmüştür. Bazı varyantlarda primer ve problemlerle tekli uyumsuzluklar mevcuttur; bunlar nedeniyle saptamanın tehlikeye gireceğini düşünmüyoruz. Bu, söz konusu varyantların %100 homolog oldukları varyantlarla karşılaştırmalı olarak test edilmesiyle onaylanmıştır.

Primer ve Prob sekansları, 1 Nisan, 2014 tarihinde uluslararası gen bankasında bulunan tüm gen sekansları kullanılarak olası homolojiler için diğer organizmalara ait genler için (GenBank, NIH genetik sekans veri tabanı) sekans karşılaştırma analizi kullanılarak test edilmiştir. Seçilen primer ve problemler için diğer organizmalarda çapraz homoloji bulunmamıştır.

Karbapenemaz geni	Variants detected (Tespit edilen varyantlar)
KPC	1 – 17
NDM	1 – 10
VIM	1 – 6 ve 8 – 38
OXA-48	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247, 370

Analitik Özgüllük

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ gerçek zamanlı diagnostik testinin analitik özgüllüğü, yüksek miktarda hedef olmayan organizmalar içeren örneklerle çapraz reaktivitenin test edilmesi suretiyle belirlenmiştir. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ testinin özgüllüğünü ölçmek için 103 karbapenemaz negatif suş kullanılmıştır. Bu suşlara ait bir genel bakış, aşağıdaki tabloda ana hatlarıyla belirtilmiştir. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ ve dahili kontrol ile negatif test edilen tüm izolatlar tüm örneklerde güvenilir biçimde saptanmıştır. Test edilen referans suşlar temelinde özgüllük %100'dür.

Türler	Test edilen suşlar
<i>Campylobacter jejuni</i>	2
<i>Citrobacter freundii</i>	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	23
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	42
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Salmonella typhimurium</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1

Analitik Dahil Olma

Daha önceden Check-Points microarray diagnostik testi Check-MDR CT103 (Check-Points Health) ile karbapenemaz pozitif olduğu belirlenen, 14 farklı gram negatif türden oluşan 93 bakteriyel suş ile retrospektif bir çalışma yürütülmüştür. 93 bakteriyel suşun tamamı hedeflenen karbapenemaz genleri için doğru biçimde yazılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Test edilen suşlar için dahil olma %100'dür.

Test edilen suş sayısı	Check-MDR CT103 sonucu	Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ sonucu
19	KPC	KPC
16	NDM	NDM
33	VIM	VIM
23	OXA-48	OXA-48
1	NDM + OXA-48	NDM + OXA-48
1	VIM + OXA-48	VIM + OXA-48

Klinik performans

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ Testinin klinik performansı, Avrupa klinik merkezlerini içeren üç ayrı prospektif çalışmada değerlendirilmiştir. Salgın olmaması durumunda CPE'nin yaygınlığı (Karbapenemaz Üreten Enterobakteriler) düşüktür ve CPE içeren taze örnek almak zordur. Bu nedenle, düşük miktardaki pozitif örneği telafi etmek için prospektif örnekler benzer örneklerle desteklenmiştir (negatif rektal sürüntü matrisine sokulan iyi karakterize edilmiş izolatlar). Rutin hasta bakımının bir parçası olarak toplanan rektal örnekler Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ ile test edilmiş olup referans kültür yöntemi (ChromID ESBL veya ChromID Carba Smart selektif kültür maddesi) ile karşılaştırılmıştır. Prospektif kültür pozitif klinik örnekler, gene özel PCR testleri ile doğrulanmıştır.

Toplam 1203 rektal sürüntü örneği test edilmiştir; bunlardan 30 örnek (%2,5) belirleyici olmayan sonuçlar vermiştir ve bu nedenle aşağıda belirtilen sonuçlara dahil edilmemiştir. Sonuçlara dahil edilen 1173 örneğin 41'i, iyi karakterize edilmiş KPC, VIM, OXA-48 veya NDM pozitif bakteriyel suşlar içeren uyarılma örneklerdir. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ için hedefe göre genel performans ve performanslar aşağıda rapor edilmiştir.

Referans yöntemle kıyasla, Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ testi, uyarılma ve prospektif örnekler üzerinde sırasıyla %98,5 ve %96,8 oranında genel hassasiyet ve özgüllük göstermiştir (aşağıdaki tabloya bakın).

Referans yöntemle karşı genel Check-Direct CPE Screen performansları

CPE		Kültür		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	67	35	102
	-	1	1070	1071
Toplam		68	1105	1173

Hassasiyet: 98.5% (67/68)
Özgüllük: 96.8% (1070/1105)

KPC için referans yöntemle karşı Check-Direct CPE Screen performansı

KPC		Kültür		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	28	8	36
	-	1	1136	1137
Toplam		29	1144	1173

Hassasiyet: 96.6% (28/29)
Özgüllük: 99.3% (1136/1144)

OXA-48 için referans yöntemle karşı Check-Direct CPE Screen performansı

OXA-48		Kültür		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	13	8	21
	-	0	1152	1152
Toplam		13	1160	1173

Hassasiyet: 100% (13/13)
Özgüllük: 99.3% (1152/1160)

VIM için referans yöntemle karşı Check-Direct CPE Screen performansı

VIM		Kültür		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	15	19	34
	-	0	1139	1139
Toplam		15	1158	1173

Hassasiyet: 100% (15/15)
Özgüllük: 98.4% (1139/1158)

NDM için referans yöntemle karşı Check-Direct CPE Screen performansı

NDM		Kültür		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	11	0	11
	-	0	1162	1162
Toplam		11	1162	1173

Hassasiyet: 100% (11/11)
Özgüllük: 100% (1162/1162)