

Kullanım kılavuzu

Check-Direct CPE for BD MAX™

Saf Enterobakteri kolonilerinden karbapenemaz genlerinin tespiti ve ayrıştırılması

Versiyon 1.6

Yayın tarihi: 20.07.2017

REF

18-0082



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 test programı v.4.30B veya daha yüksek sürümün oluşturulması	8
Ek 2: Performans Özellikleri	9

Kullanım amacı

Check-Direct CPE for BD MAX™, *Enterobakterilerde* karbapenemaz genlerin hızlı tespiti ve ayrıştırılmasına yönelik kalitatif *in vitro* diagnostik testtir. Test, klinik örneklerden kültürlenmiş bakteriler için kullanılmak amacıyla tasarlanmıştır. Check-Direct CPE, 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 universal reaktifler; takiben gerçek zamanlı PCR için tek kullanımlık malzemelerle birlikte temin edilen reaktifler kullanılır. Check-Direct CPE for BD MAX™, karbapenemaz üreten ve sağlık hizmeti ortamlarında hastaları kolonize eden *Enterobakterilerin* tespiti, önlenmesi ve kontrolüne yardımcı olarak kullanılabilir. Check-Direct CPE for BD MAX™, karbapenemaz üreten *Enterobakteriler* içeren enfeksiyonları teşhis etmek veya bu enfeksiyonların tedavisine rehberlik etmek ya da tedaviyi izlemek amacıyla tasarlanmamıştır. Epidemiyolojik tipin belirlenmesi amacıyla organizmaların elde edilmesi, suseptibilite 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, örneğin. 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). Ayrıca CPE, birçok ilaca karşı ve pan ilaç direncine sahip izolatlarla sonuçlanan diğer β -laktam olmayan direnç belirleyicilerine sahiptir.

Check-Direct CPE; 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 probaları tarafından PCR amplifikasyon ürünlerinin akümüasyonunun eş zamanlı tespitine dayalıdır. KPC, VIM, OXA-48 ve NDM için birçok gen varyantı mevcuttur ve Check-Direct CPE varyantların tamamını güvenilir bir biçimde tespit etmek amacıyla tasarlanmıştır. Check-Direct CPE for BD MAX™, beş farklı floresan tipte prob içermekte olup 4 karbapenemaz genin saptanması ve ayrıştırılması ile DNA ekstraksiyonu ve PCR amplifikasyonunu izleyen hedef SPC'nin kontrolünü sağlar.

Kit içeriği (24 reaksiyon için)

Bileşenler (Mat. No.)	Açıklama
CPE reaktif tüpleri (9-0062)	24 kapaklı tüp (mor kapak)
CPE pozitif kontrol (9-0060)	1 tüp (mor kapak) 100 μ l
Kullanım Kılavuzu (9-0079)	Broşür - web sitesinden indirin

Gerekli fakat kit içinde sağlanmamış malzemeler

Tedarik Malzemeleri	Donanım
<ul style="list-style-type: none">BD MAX™ ExK DNA-1 Extraction Kit (Ref:442818)BD MAX™ DNA MMK Master Mix (Ref: 442848)BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)Tek kullanımlık laboratuvar (pudrasız) eldivenleri/Laboratuvar önlüğü10 ila 1000 μL hacimler için pipetler ve tek kullanımlık (filtreli) uçlarSerum Fizyolojik (150 mM NaCl veya %0,9 w/v NaCl)Milli-Q su veya aqua bidest	<ul style="list-style-type: none">Gerçek zamanlı PCR cihazı: BD MAX™ Sistemi, yazılım sürümü 4.30B veya daha yüksekBakteriyel süspansiyonlar için uygun dansitometreVorteks mikser

Saklama ve stabilite

Check-Direct CPE for BD MAX™ Testi bileşenleri 2 ila 25 °C'de belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Check-Direct CPE for BD MAX™ Reaktif Tüpleri 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 25 °C'de 14 güne kadar stabildir.

Uyarılar ve Önlemler

- Check-Direct CPE 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 for BD MAX™'nin 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 for BD MAX™ Test 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

Bakteriler için kültürden test hazırlığı

1. Nutrient agar plakalarını klinik örneklerle veya test edilecek bakteriyel suşlarla aşılayın ve 37 °C'de gece boyunca inkübe edin. Tipik büyüme maddeleri arasında kanlı agar, MacConkey agar ve Triptik Soy agar yer almaktadır.
2. 1 veya 10 µL öze kullanarak her plakanın bir veya daha fazla kolonisinden 0,5 – 1,0 McFarland Serum Fizyolojik ($\approx 1 - 2 \times 10^8$ CFU/mL) içeren bakteriyel hücre süspansiyonu hazırlayın.
3. 10 µL bakteriyel süspansiyonu ($\approx 1 - 2 \times 10^6$ CFU/mL) ve 500 µL Milli-Q su ya da aqua bidesti DNA Sample Buffer Tüp SB-1'e pipetleyin. (BD tarafından DNA ekstraksiyon kiti ile temin edilir bkz. *Gereken fakat kitte sağlanmayan malzemeler*).
4. Sample Buffer Tüpü mavi septum kapak ile kapatın ve düşük hızda 10 saniye boyunca tüpü vorteksleyin.
5. Analiz edilecek bakteriyel hücre süspansiyonları içeren Sample Buffer Tüplerini PCR odasına aktarın.

Kontrol reaksiyonlarının hazırlanması

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

- **Pozitif kontrol:**
Pozitif kontrolün 10 µL'sini ve 500 µL Milli-Q su veya aqua bidesti bir Sample Buffer Tüpüne pipetleyin. 10 saniye vorteksleyin.
- **Negatif kontrol:**
500 µL Milli-Q su veya aqua bidesti bir Sample Buffer Tüpüne 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 "Check-Direct CPE" olarak oluşturun.

2. BD MAX™ tepsi kurulumu

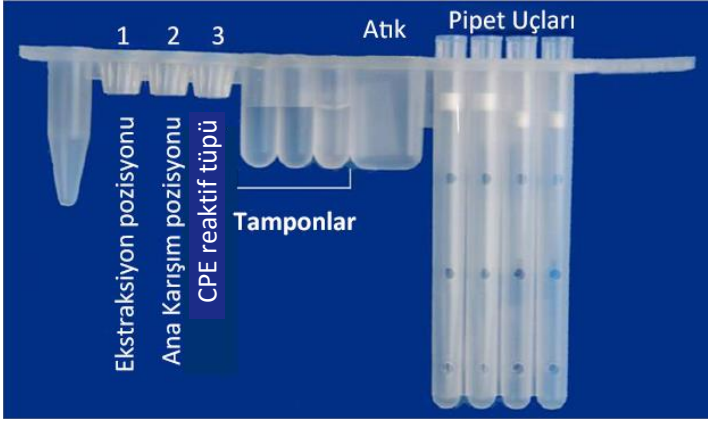
2.1. BD MAX™ sistemi tepsiyerini, test edilecek örnek sayısı için gereken sayıda DNA Ünitelendirilmiş Reaktif Stripi ile yükleyin. Tüm sıvıların haznenin alt kısmında olduğundan emin olmak için her stripe hafifçe vurun.

2.2. Ünitelendirilmiş Reaktif Striplerini Hazırlayın:

2.2.a. DNA ekstraksiyon BD Exk-1 Reaktif tüpünü (beyaz kapak) DNA Stripindeki pozisyon 1'e oturtun, bkz. Şekil 1.

2.2.b. DNA MMK Master Mix tüpünü (yeşil/sarı kapak) DNA Stripteki yerine 2 oturtun, bkz. Şekil 1.

2.2.c. CPE reaktif tüpünü (mavi/mor kapak) DNA Stripteki yerine 3 oturtun, bkz. Şekil 1.



Şekil 1: DNA Ünitelendirilmiş Reaktif Stripi ayarı.

3. BD MAX™ cihazında test kurulumu

- 3.1 BD MAX™ Sistemi yazılım v4.30B veya üzerindeki Run (Çalıştır) sekmesini açın ve **Worklist**'i (İş Listesi) doldurun.
- 3.2 Test "Check-Direct CPE" ögesini seçin. Test menüsünde bulunmaması halinde "Check-Direct CPE" testini oluşturmak için Ek 1'e bakın.
- 3.3 Barkod tarayıcıyı kullanarak **Sample Buffer Tüp** barkodunu girin (barkodu manuel olarak da girebilirsiniz). Tepsi A'nın 1. pozisyonuyla başlayın. Her Sample Buffer Tüpü BD MAX™ tepsilerindeki (septum kapağıyla) ilgili pozisyonlarına yerleştirin.
- 3.4 Örnek veya hasta kimlik bilgilerini iş listesinin **Accession** (Erişim) kutusuna girin. Her örnek veya hasta bilgisinin Tepsideki spesifik Sample Buffer Tüpe karşılık geldiğini kontrol edin.
- 3.5 Tepsiyi BD MAX™ Sistemine yükleyin. (Tepsi A, aletin 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) ögesini 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 yöntemine 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 gerçek zamanlı Check-Direct CPE için kriterler gösterilmektedir. Kontrollerin C_T değerleri beklenen şekilde değilse SSS ve Sorun Giderme bölümlerine bakın "3".

Tablo 2: Check-Direct CPE testi ile geçerli çalışma için kriterler. (N.R. = ilgili değil)

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	30 ±3	29 ±3	31 ±3	N.R.
Negatif örnek	-1	-1	-1	-1	29 ±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. Çözümlenmemiş çalışmalar yeniden test edilmelidir.

Bakteriyel hücrelerle elde edilen Ct- değerleri, genellikle, test için giriş malzemesi olarak kullanılan hücrelerin miktarının iyi tanımlanmış olması nedeniyle her hedef için spesifik Ct-penceresinde olacaktır. Ancak Ct-değerlerinin ayrı suşlar arasında önemli düzeyde farklılık gösterebileceğini unutmayın. **Tablo 3** bu C_T-penceresinin üst sınırını belirler; yüksek C_T-değeri örneğin kontamine olduğunu veya suşun saf olmadığını belirtir. Bu nedenle "Çözümlenmemiş" sonuç olarak değerlendirilir.

Tablo 3: Bakteriyel hücreler için veri yorumlama talimatları (N.R. = ilgili değil)

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	Yorumlama
≤33	≤27	≤26	≤32	N.R.	Pozitif
-1	-1	-1	-1	29 ±3	Negatif
> 33	>27	>26	>32	N.R.	Unresolved (Çözümlenmemiş)
-1	-1	-1	-1	-1	Unresolved (Çözümlenmemiş)

ÖNEMLİ NOTLAR:

- 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

- 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.
 - BD DNA MMK'nin 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.
- 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.
- Gerçek zamanlı sonuçlar pozitif kontrol için C_T değeri göstermiyor veya yorumlama örneğin çözümlenmemiş olduğunu bildiriyor.**
Olası nedenler ve sorun giderme:
 - Pozitif kontrol çözümü eklenmemiştir.
 - BD DNA MMK'nin tarihi geçmiş olabilir.
 - Pozitif kontrolün PCR reaksiyon bölgesinde hava kabarcıkları oluşmuş olabilir.
- Gerçek zamanlı sonuçlar tüm örneklerde ve SPC sinyali dahil olmak üzere dedektör kanallarında oldukça düşük floresan sinyali gösteriyor.**
Olası nedenler ve sorun giderme:
 - Floresan probler ve primerler içeren CPE reaktif tüpleri azaltılabilir. Lütfen son kullanma tarihini kontrol edin ve CPE 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.
- The BD MAX™ Sistemi bir hata veya arıza bildiriyor.**
BD MAX™ cihazı kullanım kılavuzuna bakın veya BD yerel temsilcinizle iletişime geçin.
- Check-Direct CPE testi 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.

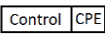








Kısıtlamalar

Check-Direct CPE, klinik açıdan en yaygın karbapenemazları temsil eden KPC, NDM, OXA-48 ve VIM karbapenemaz genlerinin varlığını tespit etmek için spesifik 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 saf bakteriyel hücrelerle kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Örnek DNA'sının kalitesi, Check-Direct CPE ile güvenilir sonuçlar elde etmek için önemli bir faktördür. Hücre süspansiyonları için doğru hücre yoğunlukları, güvenilir sonuçlar elde etmek için önemli bir faktördür ve bu kılavuzda açıklanan prosedür kesinlikle takip 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, 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.

Bir örnekte birden fazla bakteri türünün bulunması testin yorumlanmasını engelleyebilir. Diğer diyagnostik 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
	CPE kontrolü
	<i>In Vitro</i> 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* 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 test programı v.4.30B veya daha yüksek sürümün oluşturulması

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) ögesini seçin ve aşağıdaki talimatları uygulayın:

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

- **Test Name** (Test Adı): *Check-Direct CPE*.
- **Extraction Type** (Ekstraksiyon Tipi): *Exk DNA-1* (Plasma/Serum) seçin
- **Master Mix Format** (Ana Karışım Formatı): *Tip 1'ü seçin: BD MMK veya MMK(SPC)* ve Kuru Primerler ve Problar
- **Sample Extraction Parameters** (Örnek Ekstraksiyon Parametreleri): *Default settings* (Varsayılan ayarlar) ögesini seçin, bkz. Tablo A.
- **C_T Hesaplama**: *Call C_T at inflection point* (C_T'yi dönüm noktasında çağır) ögesini 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)	937.5
Wash Volume (Yıkama Hacmi)	500
Neutralization Volume (Nötralizasyon Hacmi)	12.5
DNase Heat Time (DNase Isıtma Süresi)	---

Tablo B: *Gain parameters* (Kazanım parametreleri).

Dedektör	Alias (Kısa Ad)	Gain (Kazanım)	Threshold (Eşik)
475/520	KPC	40	100
530/565	VIM	80	150
585/630	OXA-48	30	150
630/665	NDM	80	150
680/715	SPC	40	150

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

	False Receiving Channel (Yanlış Alan Kanal)				
	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Uyarı Kanalı)	475/520		0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0		0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0		7.4
	630/665	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)	45	15	98	HAYIR
			62	60	EVET

Ek 2: Performans Özellikleri

Simülatif Özgüllük

Check-Direct CPE for BD MAX™ gerçek zamanlı diagnostik testinin özgüllüğü, doğru primer ve probların 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 problarla %100'lük sekans eşleşmesi belirtilen her varyantın güvenli saptamasını garanti etmek amacıyla ön görülmüştür. Bazı varyantlarda primer ve problarla 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 problar 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 for BD MAX™ gerçek zamanlı diagnostik testinin analitik özgüllüğü, yüksek miktarda hedef olmayan organizmalar içeren örneklerle çapraz reaktivitenin test edilmesi suretiyle belirlenmiştir. Bu suşlara ait bir genel bakış, aşağıdaki tabloda ana hatlarıyla belirtilmiştir. Daha önceden Check-Points microarray diagnostik testi Check-MDR CT103 (Check-Points Health) ile test edilmiş, 9 farklı gram negatif türden oluşan 100 bakteriyel suş ile retrospektif bir çalışma yürütülmüştür.

Check-Direct CPE for BD MAX™ Testi 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>Citrobacter freundii</i>	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	24
<i>Escherichia coli</i>	47
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2

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 94 bakteriyel suş ile retrospektif bir çalışma yürütülmüştür. 94 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 sonucu	Sonuçları Dahil Etme
19	KPC	KPC	100 %
14	NDM	NDM	100 %
36	VIM	VIM	100 %
23	OXA-48	OXA-48	100 %
1	NDM + OXA-48	NDM + OXA-48	100 %
1	VIM + OXA-48	VIM + OXA-48	100 %

Klinik performans

Check-Direct CPE for BD MAX™ Testinin Klinik Performansı, coğrafi olarak çeşitli klinik merkezlerden gönderilen karbapenem hassas olmayan bakteriyel izolatlar kullanılarak merkezi referans laboratuvarında değerlendirilmiştir. Toplam 450 izolat seçilmiş olup bunlar 438 Enterobacteriaceae ve 12 *Pseudomonas spp*'den oluşmuştur. Referans için bu izolatlardaki karbapenemazların varlığı ve tespiti, gene özel PCR ve/veya Check-Points Check-MDR CT102 Testi ile değerlendirilmiştir. İzolatlar 10 mg ertapenem disk ile MacConkey agar plakalarında kültürlenmiş ve bu Kılavuzdaki prosedür kullanılarak işlenmiştir.

Referans yöntemle kıyasla, Check-Direct CPE testi, uyarılama ve prospektif örnekler üzerinde sırasıyla %100 ve %100 oranında genel hassasiyet ve özgüllük göstermiştir (aşağıdaki tabloya bakın).

Bakteriyel izolat Panelinin Türleri ve Karbapenemaz genleri

Türler	CPE spesifik genleri						
	KPC	NDM	VIM	OXA-48	NDM + OXA-48	IMP	YOK
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	62	52	55	59	2	0	7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	0	12	3	0	1	0
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0	0	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	9	28	8	29	0	2	5
<i>Enterobacter spp.</i>	18	14	16	8	0	8	10
<i>Pseudomonas spp.</i>	0	0	0	0	0	11	1
Diğerleri*	5	6	9	1	0	1	1
Toplam	100	100	100	100	2	24	24

**Citrobacter spp*'den oluşan 23 izolat. (n=15), *Raoultella spp.* (n=3), *Leclercia adecarboxylata* (n=2), *Serratia marcescens* (n=2) ve *Kluyvera georgiana* (n=1).

Referans yöntemle karşı genel Check-Direct CPE performansları

CPE		Referans		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	402	0	402
	-	0	48	48
Toplam		402	48	450

Hassasiyet: 100%

Özgüllük: 100%

KPC için referans yöntemle karşı Check-Direct CPE performansı

KPC		Referans		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	100	0	100
	-	0	350	350
Toplam		100	350	450
Hassasiyet:		100%		
Özgüllük:		100%		

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

OXA-48		Referans		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	102	0	102
	-	0	348	348
Toplam		102	348	450
Hassasiyet:		100%		
Özgüllük:		100%		

VIM için referans yöntemle karşı Check-Direct CPE performansı

VIM		Referans		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	100	0	100
	-	0	350	350
Toplam		100	350	450
Hassasiyet:		100%		
Özgüllük:		100%		

NDM için referans yöntemle karşı Check-Direct CPE performansı

NDM		Referans		Toplam
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	102	0	102
	-	0	348	348
Toplam		102	348	450
Hassasiyet:		100%		
Özgüllük:		100%		

Referans:

Findlay, J., Hopkins, K.L., Meunier, D. and Woodford, N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 2015 Mayıs;70(5):1338-42. doi: 10.1093/jac/dku571. Epub 27 Ocak 2015.