

Sepsis qPCR MX-30S Panel

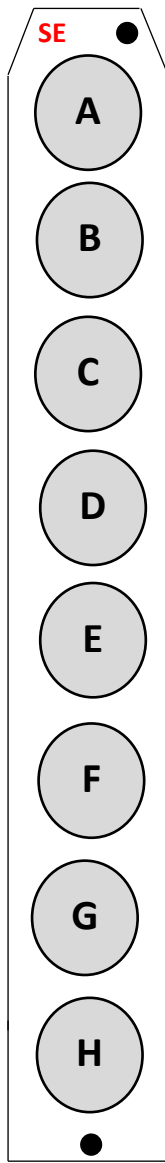
100 Test

Kullanım Kılavuzu

Kat. No: BS-SE-MX30S-100
Kılavuz Versiyon: 201221-1
Kullanım Onay Tarihi: 21.12.2020

*Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.
Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.*

Tablo 1. Kit içeriği

Raf Ömrü: 18 ay ^[1] ; Saklama Sıcaklığı: -20°C, Taşıma Sıcaklığı: +2°C- +8°C					
Bileşen	Miktar (100 Test)	İçerik / Kullanım Amacı			
2X Prime Script Mix	9 x 1250 µL	DNA polimeraz, dNTP miks, reaksiyon tamponu			
NTC	2 x 1000 µL	Negatif Kontrol (Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.)			
SE Strip	120 Adet		A: SE- SVAC Oligo Mix	FAM	<i>Staphylococcus aureus</i>
				HEX	-
			B: SE-SIVBL Oligo Mix	ROX	VanA - Vankomisin direnci
				CY5	<i>Candida krusei</i>
				FAM	<i>Staphylococcus spp.</i>
			C: SE-PCKA Oligo Mix	HEX	Dahili Kontrol (IC); insan <i>RNase P</i>
				ROX	VanB - Vankomisin direnci
				CY5	<i>Listeria monocytogenes</i>
			D: SE-HKCO48 Oligo Mix	FAM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
				HEX	<i>Candida albicans</i>
				ROX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
			E: SE-KARB Oligo Mix	CY5	<i>Acinetobacter baumannii</i>
				FAM	<i>Haemophilus influenzae</i>
				HEX	<i>Klebsiella oxytoca</i>
			F: SE-CANMEC Oligo Mix	ROX	<i>Candida parapsilosis</i>
				CY5	OXA-48 - Karbapenem direnci
				FAM	KPC - Karbapenem direnci
			G: SE-EPES Oligo Mix	HEX	NDM - Karbapenem direnci
				ROX	VIM - Karbapenem direnci
				CY5	IMP - Karbapenem direnci
			H: SE-SENS Oligo Mix	FAM	<i>Candida glabrata</i>
				HEX	MecA+C - Metisilin direnci
				ROX	<i>Candida tropicalis</i>
				FAM	<i>Enterococcus spp.</i>
				HEX	<i>Pseudomonas spp.</i>
				ROX	<i>Enterobacteriaceae</i>
				CY5	<i>Streptococcus spp.</i>
				FAM	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
				HEX	<i>Escherichia coli</i>
				ROX	<i>Neisseria meningitidis</i>
				CY5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

		Strip	İçerik (Reaktif stabilite kontrolü için, her işletimde test ediniz.)
PC-SE Strip	20 Adet		A: Pozitif Template Kontrol + SE- SVAC Oligo Mix
			B: Pozitif Template Kontrol + SE-SIVBL Oligo Mix
			C: Pozitif Template Kontrol + SE-PCKA Oligo Mix
			D: Pozitif Template Kontrol + SE-HKCO48 Oligo Mix
			E: Pozitif Template Kontrol + SE-KARB Oligo Mix
			F: Pozitif Template Kontrol + SE-CANMEC Oligo Mix
			G: Pozitif Template Kontrol + SE-EPES Oligo Mix
			H: Pozitif Template Kontrol + SE-SENS Oligo Mix

Kullanıcı Tarafından Sağlanacak Olan Cihaz ve Ekipmanlar

- 1) Real-Time PCR Cihazı: FAM/HEX/ROX/Cy5 (Green/Yellow/Orange/Red) kanallı, Ramp rate ≥ 3 °C/sec.
- 2) 1-10 µL mikropipet ve uyumlu pipet ucu (DNaz ve RNaz içermeyen)
- 3) Spin Santrifüj: min. 3000 rpm (8'li Strip ve 2 mL mikrotüp ile uyumlu)
- 4) Vorteks

Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:

- 5) PCR kurulumu için UV kabini
- 6) Soğuk Tüp standı (2 mL ve 0,2 mL)
- 7) Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.

^[1] **Raf ömrü:** 18 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.

Kullanım Amacı ve Test Prensipleri

Sepsis hastanede uzun yatış süreleri ve ölümlere neden olmaktadır. Uygun tedavi ve hızlı iyileşme süreci, sepsis etkeninin erken teşhisiyle mümkün olabilmektedir. Sepsiste yaşama şansı tedavi başlangıcı geciktikçe ani şekilde düşmektedir. Bir hasta teşhisin ilk saatinde doğru antimikrobiyal tedavi görürse, yaşama şansı %80'e yakındır; bu oran her geciken saat için %7,6 oranında düşmektedir. Kit, Tablo 1'de verilen bakteriyel ve fungal solunum sepsis etkenlerinin ve antimikrobiyal direnç genlerinin tam kan veya pozitif kan kültürlerinde hızlı ve doğru tanısı amacıyla kullanılmaktadır. Kit klinik örneklerden elde edilen nükleik asit izolatlarına uygulanmaktadır. Kit ile hızlı tanı, hedef etkene özgü DNA bölgelerini hedefleyen gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile gerçekleştirilmektedir. Kit ile tanı 60 dk'dan kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir.

Kitin Analitik Özellikleri

Kit Roche LightCycler® 96, Cobas Z 480, ABI 7500 / 7.500 Fast (Thermo), Bio-Rad CFX96 Touch™, Qiagen Rotor-Gene® 5 Plex, Real Time PCR sistemleri ile valide edilmiştir ve bu sistemler ile tam uyumludur. Tablo 1'de verilen etkenlerin referans suşları

ve saha izolatları üzerinde yapılan analitik spesifite çalışmalarında herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmemiştir. Kitin tespit limiti (LoD), %95 ihtimalle tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonudur. Kitin tüm hedefler için tespit limiti (LoD) 1 kopya genom/reaksiyon'dur. Kit, *RINA™ M14 Kan ve Doku Nükleik Asit İzolasyon Sistemi* ve kiti (*Kat No: RN-NA-14-102-192*) ve *Bio-Speedy® Kan ve Dokudan Nükleik Asit İzolasyon Kiti* (*Kat No: BS-NA-102-100*) ile kullanıldığında, tam kan örneklerinde LoD değeri 10 kopya etken/mL, pozitif kan kültürü örneklerinde ise LoD değeri 1 kopya etken/mL'dir. Kitin rölatif duyarlılığı ve özgüllüğü Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) protokollerine uygun şekilde, 500 klinik örnek üzerinde test edilmiştir. Kitin tam kan örnekleri için rölatif duyarlılığı %89, rölatif özgüllüğü %97; pozitif kan kültürü örnekleri için ise rölatif duyarlılığı %100, rölatif özgüllüğü %97'dir.

Uyarılar

- 1) Kit, nükleik asit kaynaklarından ve qPCR ampikonlarından uzak bir yerde muhafaza edilmelidir.
- 2) Kit içeriğindeki bileşenler farklı lot numaralı bileşenler ile ya da aynı isimli fakat farklı üreticilere ait kimyasal maddeler ile karıştırılmamalıdır.
- 3) PCR kurulumu mümkünse soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmelidir.
- 4) qPCR mikslerinin tüplere dağıtıldığı alan ile, kalıp nükleik asitlerin tüplere eklendiği alanın ayrı odalarda ya da farklı tezgahlarda olması sağlanmalıdır.
- 5) Stripler, kalıp nükleik asit dağıtıldıktan sonra spin santrifüj ile çeperde kalan sıvıların dipte toplanması sağlandıktan sonra PCR cihazına yüklenmelidir.
- 6) Kalıp nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri, sıvı transferleri dışında sürekli kapalı tutulmalıdır.
- 7) Analizin gerçekleştirildiği odalar, tezgahlar ve cihazların silinebilir yüzeyleri düzenli olarak %10 NaClO ile temizlenmelidir.
- 8) qPCR'ı tamamlanmış reaksiyon tüpleri laboratuvarında açılmadan bertaraf edilmelidir.

Reaksiyon kurulumunu Tablo 2'de belirtildiği şekilde gerçekleştiriniz ve qPCR cihazını Tablo 3'e göre programlayınız. qPCR tüplerini kapatınız, qPCR cihazına yerleştiriniz ve işletimi başlatınız.

Table 2. Reaksiyon kurulumu

Reaksiyon Tipi	Kullanılacak Strip	1 adet 2X Prime Script Mix tüpünün içerisine aşağıda verilen miktarlarda örnek eklenir, pipetajla karıştırılır, sağ kolonda verilen miktarda strip kuyularına dağıtılır		A, B, C, D, E ve F kuyularına dağıtılacak miktar
Hasta Numunesi	SE Her hasta için 1 strip	2X Prime Script Mix	90 µL	15 µL
		Hasta örneği nükleik asit ekstraktı	45 µL	
		Toplam	135 µL	
Negatif Kontrol (NTC)	SE Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	90 µL	15 µL
		NTC	45 µL	
		Toplam	135 µL	
Pozitif Kontrol (PC)	PC- SE Her işletim için 1 strip	2X Prime Script Mix	90 µL	10 µL

Tablo 3. Real-Time PCR Programı; Reaksiyon hacmini 20 µL olarak ayarlayınız

Ön İnkübasyon- 1 döngü	Çoğalma- 40 döngü		
	Denatürasyon	Bağlanma ve Uzama	Floresan Okuma
95°C - 180 sn	95°C - 10 sn	55°C - 40 sn	FAM / HEX / ROX / Cy5 (Green/Yellow/Orange/Red)

Test Sonuçlarının Yorumlanması

FAM/HEX/ROX/Cy5(Green/Yellow/Orange/Red) kanallarında elde edilen çoğalma eğrilerinin şekli incelenir ve sigmoidal olmayan eğriler "Negatif" olarak kaydedilir. Bir örneğe cihaz tarafından eşik döngü sayısı (Cq) atanmış ancak eğri sigmoidal

değilse, sonuç “Negatif” olarak kaydedilmelidir. Cq<38 ise sonuç “Pozitif” olarak kaydedilir. Cq≥38 ise aynı nükleik asit örneği kullanılarak test tekrarlanır, eğer yine Cq≥38 ise hastadan alınan yeni bir örnek ile tüm analiz tekrarlanır.

Tablo 4. Sonuçların Yorumlanması

Template:	NA İzolatı		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		Yorum
Hedef	Hedef	IC	Hedef	IC	Hedef	IC	
Durum 1	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Pozitif
Durum 2	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Neg	Hedef Pozitif: Örnek pozitif sonuç verdiği için kitin çalıştığı sonucuna varılır, hasta sonucu rapor edilir. Pozitif kontrolde sorunun devam etmesi durumunda, üretici ile irtibata geçip, yeni bir pozitif kontrol talep edilir.
Durum 3	Poz	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Pozitif
Durum 4	Neg	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg	Hedef Negatif
Durum 5	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Kontaminasyon Problemi: Uyarılar bölümündeki hususlara dikkat edilerek deney tekrarlanır.
Durum 6	Neg	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Hedef Negatif: Hedef negatif çıktığı için kontaminasyon problemi yoktur. Kit içeriği ile birlikte sağlanan ve negatif kontrol örneğine eklenen NTC kontamine olmuş olabilir. Sorunun devam etmesi durumunda, üretici ile irtibata geçip, yeni bir negatif kontrol talep edilir.
Durum 7	Neg	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	Örneklem/Ekstraksiyon/İnhibisyon Problemi: Nükleik asit izolatı 1/10 seyreltilip, deney tekrarlanır. Seyreltilen örnek HEX kanalında pozitif sonuç vermezse yeni örnek istenir.
Durum 8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Reaktif Problemi: Üretici ile irtibata geçilerek, reaktifler yenilenir ve reaksiyon tekrarlanır.
Durum 9	Neg	Poz	Poz	Poz	Neg	Poz	Eğer negatif kontrol reaksiyonundaki IC Cq değeri, NA izolatından elde edilen IC Cq değerinden 3 döngü veya daha yüksekse, sonuç değerlendirilir, negatif olarak rapor edilir. Aksi takdirde, örneklem/ekstraksiyon/inhibisyon problemi sonucuna varılır.
Durum 10	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg	Poz	Hedef Pozitif: Negatif kontrolde hedef negatif, NA izolatında hedef pozitif olduğu için, IC'deki kontaminasyon göz önüne alınmadan, örnek pozitif olarak rapor edilir.



UYARI: QR kod ile bağlantısı verilen web sayfasında, farklı cihaz tipleri için, sigmoidal ve sigmoidal olmayan eğri örnekleri verilmiştir. Bu örnekler incelenmeden, bu kit ile elde edilen sonuçlar **KESİNLİKLE** yorumlanmamalıdır.