

Kat No: BS-SE-MX30S-100

# Sepsis qPCR MX-30S Panel



## Kullanım Talimatı

### 100 Test

#### 1. Kit İçeriği

**Raf ömrü:** 12 ay; kutunun üzerindeki son kullanma tarihine bakınız. Depolama sıcaklığında saklanan her bir reaktif, üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Kitin son kullanma tarihi reaktiflerin son kullanma tarihine göre belirlenmektedir.

Tablo 1a. Kit içeriği

Saklama Sıcaklığı: -20°C, Taşıma Sıcaklığı: +2- 8°C					
Bileşen	Miktar (100 Test)	İçerik/Kullanım Amacı			
2X qPCR Mix	10 x 1250 µL	DNA polimeraz, dNTP Mix ve reaksiyon tamponu			
SE Strip	120 Adet		A: SPVC Oligo Mix	FAM	<i>Staphylococcus aureus</i>
				HEX	<i>Pseudomonas spp.</i>
				ROX	VanA-Vankomisin direnci
				CYS	<i>Candida krusei</i>
			B: CRVS Oligo Mix	FAM	<i>Candida glabrata</i>
				HEX	Dahili Kontrol (IC); İnsan RNase P
				ROX	VanB- Vankomisin direnci
				CYS	<i>Staphylococcus spp.</i>
			C: KPAC Oligo Mix	FAM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
				HEX	<i>Candida albicans</i>
				ROX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				CYS	<i>Acinetobacter baumannii</i>
			D: HKOC Oligo Mix	FAM	<i>Haemophilus influenzae</i>
				HEX	<i>Klebsiella oxytoca</i>
				ROX	<i>Candida parapsilosis</i>
				CYS	OXA-48-Karbapenem direnci
			E: CRE Oligo Mix	FAM	KPC-Karbapenem direnci
				HEX	NDM-Karbapenem direnci
				ROX	VIM-Karbapenem direnci
				CYS	IMP-Karbapenem direnci
			F: LEMC Oligo Mix	FAM	<i>Listeria monocytogenes</i>
				HEX	<i>Enterococcus faecalis</i>
				ROX	MecA+C-Metisilin direnci
				CYS	<i>Candida tropicalis</i>
			G: SES Oligo Mix	FAM	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
				HEX	-
				ROX	<i>Enterobacteriaceae</i>
				CYS	<i>Streptococcus spp.</i>
			H: ENES Oligo Mix	FAM	<i>Enterococcus faecium</i>
				HEX	<i>Escherichia coli</i>
				ROX	<i>Neisseria meningitidis</i>
				CYS	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Saklama Sıcaklığı: -20°C, Taşıma Sıcaklığı: +2- 8°C			
NTC	2 x 1000 µL	Negatif Kontrol (Nükleaz içermeyen su) <b>(Kontaminasyon kontrolü amacıyla, her işletimde test ediniz.)</b>	
PC-SE Strip	20 Adet	<b>Strip</b>	
		<b>İçerik (Reaktif stabilite kontrolü için, her işletimde test ediniz)</b>	
		<b>PC-SE</b> ●	
		<b>A</b>	A: Pozitif Kontrol + SPVC Oligo Mix
		<b>B</b>	B: Pozitif Kontrol + CRVS Oligo Mix
		<b>C</b>	C: Pozitif Kontrol + KPAC Oligo Mix
		<b>D</b>	D: Pozitif Kontrol + HKOC Oligo Mix
		<b>E</b>	E: Pozitif Kontrol + CRE Oligo Mix
		<b>F</b>	F: Pozitif Kontrol + LEMC Oligo Mix
<b>G</b>	G: Pozitif Kontrol + SES Oligo Mix		
<b>H</b>	H: Pozitif Kontrol + ENES Oligo Mix		

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 $\geq 3$ °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 mikrosantrifüj tüpü ile uyumlu) 4. Vorteks	<b>Kullanılması önerilen ekstra ekipmanlar:</b> 5. PCR kurulumu için UV kabini 6. Soğuk Tüp Standı (mikrosantrifüj tüpleri ve PCR tüp/stripleri için) 7. Tek kullanımlık, pudrasız, nitril eldiven.

## 2. Kiti 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 hızlı 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. "Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S Panel", Tablo 1a'da verilen bakteriyel ve fungal sepsis etkenlerinin ve antimikrobiyal direnç genlerinin tam kan veya pozitif kan kültürlerinde hızlı ve doğru tanı amacıyla kullanılmaktadır. "Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S Panel" kullanılarak pozitif kan kültürleri veya tam kan örneklerinde hem bakteriyel hem de fungal sepsis ajanları ve antimikrobiyal direnç genleri hızlı ve doğru bir şekilde teşhis edilebilmektedir. Kit tam kan ve pozitif kan kültürü 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 1 saatten kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir.**

## 3. Kiti Analitik Özellikleri

"Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S Panel", Bio-Rad CFX96 Touch™ Real Time PCR Sistemi ile 20 µL qPCR hacim için valide edilmiştir. "Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S Panel" kiti "Zybio EXM3000 Nükleik Asit İzolasyon Sistemi (Kat No: ZBI-EXM3000)" ve "Zybio Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Kat No: ZBI-B200)" ile tam kan ve kan kültürü örnekleri için valide edilmiştir. Tablo 1a'da verilen etkenlerin referans suşları ve saha izolatları üzerinde yapılan analitik spesifikite çalışmalarında herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmemiştir. Kiti içerdği oligonükleotid setlerinin tespit limiti (LoD), dahil edicilik ve dışlayıcılık çalışmaları T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı (HSGM) tarafından gerçekleştirilmiştir. 615 farklı klinik örnek ile pozitif kan kültürü için testin analitik duyarlılığı %99,23 ve özgüllüğü %99,71; tam kan için testin analitik duyarlılığı %98,72 ve özgüllüğü %98,84 olarak belirlenmiştir. Kiti LoD değerleri tüm hedef etkenler için tam kanda 1000 cfu/mL; pozitif kan kültüründe 500 cfu/mL olarak belirlenmiştir.

## 4. Nükleik Asit Ekstraktlarının Toplanması, Saklanması ve Transferi

Tam kan örnekleri steril EDTA'lı kan tüpleri içerisine alınır. EDTA'lı tüpler içerisindeki tam kan örnekleri tercihen +2-8°C'de saklanır ve en geç 24 saat içerisinde laboratuvara transfer edilir. Uzun süreli saklama için numuneler -20 °C'de depolanmalıdır. Kan kültürü örnekleri uygun kan kültürü şişeleri içerisine alınarak uygun

Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.

Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.

koşullarda inkübe edilerek alınır ve saklanır. İnkübasyondan önce kan kültürü şişeleri oda sıcaklığında tutulmalıdır. Kan kültürü şişelerinin, soğutulması veya dondurulması mikroorganizmaların ölümüne neden olabilir ya da etkenin büyümesi ve üremesi gecikebilir.

## 5. Uyarılar

1. Numune işleme ulusal biyolojik güvenlik tavsiyelerine uygun olarak gerçekleştirilmelidir.
2. Potansiyel enfekte materyalleri hemen %0,5-1 (w/v) sodyum hipoklorit (%10-20 v/v çamaşır suyu) ile temizlenmeli ve temizlik malzemeleri biyolojik olarak tehlikeli atık deposuna atılmalıdır. Yerel, bölgesel ve federal düzenlemelere uygun olarak atıkların imhası gerçekleştirilmelidir.
3. Test prosedürlerini uygulayan tüm personel PCR ve mikrobiyoloji ile çalışmak üzere eğitilmelidir. Örneklem yeterli bilgi ve deneyime sahip personel tarafından yapılmalıdır.
4. Kit nükleik asit kaynaklarından ve qPCR amplikonlarından uzakta saklanmalıdır.
5. Sıvı transferleri dışında nükleik asit ve pozitif kontrol tüpleri daima kapalı tutulmalıdır.
6. Reaksiyon karışımının önceden amplifiye edilmiş hedef diziler tarafından kontaminasyonunu önlemek için ayrı çalışma alanları ve özel ekipmanlar sağlanmalıdır. PCR öncesi ve sonrası farklı laboratuvar önlükleri giyilmelidir.
7. PCR mikserlerini ve template nükleik asitleri pipetlemek için kullanılan pipetler ayrı olmalıdır. Filtreli ve nükleaz içermeyen uçlar kullanılmalıdır.
8. Kit içindeki bileşenler farklı lot numaraları veya aynı adı taşıyan ancak farklı üreticilerin kimyasalları ile karıştırılmamalıdır.
9. Kit bileşenleri kullanımdan önce yavaşça karıştırılmalıdır. PCR kurulumu esnasında ana stok reaktifleri soğuk blokta tutulmalıdır.
10. Kit ile kullanılan tüm alet ve ekipmanlar için bakım/kalibrasyon aralığı belirlenmelidir.
11. Amplifiye materyalden kaynaklanan yanlış pozitifleri önlemek için PCR' si tamamlanan reaksiyon tüpleri laboratuvarda açılmadan atılmalıdır.
12. Odaların, tezgahların ve cihazların silinebilir yüzeyleri taze seyreltilmiş %10' luk çamaşır suyu (%0,5 NaClO) ile düzenli olarak temizlenmelidir.

## 6. qPCR Uygulama Protokolü

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

Tablo 2. Reaksiyon Kurulumu

Reaksiyon Tipi	Kullanılacak Strip	Aşağıda verilen bileşenler, belirtilen miktarlarda bir tüp içerisinde birleştirilir, pipetajla karıştırılır, sağ kolonda verilen miktarda strip kuyularına dağıtılır.		8 strip kuyusuna dağıtılacak miktar
		Kullanılacak Bileşen	1 Strip için hazırlanacak miktar (µL / strip)	1 kuyu için pipetlenecek miktar (µL / kuyu)
Hasta Numunesi	SE Her hasta için 1 strip	2X qPCR 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 qPCR Mix	90 µL	15 µL
		NTC	45 µL	
		Toplam	135 µL	
Pozitif Kontrol (PC)	PC-SE Her işletim için 1 strip	2X qPCR Mix	-	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-3 dk	95°C-5 sn	55°C-30 sn	FAM/HEX/ROX/CY5

## 7. Test Sonuçlarının Yorumlanması

Threshold döngü sayısını (Cq) hesaplamak için önerilen threshold (eşik) seviyesi CFX96 Touch™ cihazı için 200 RFU'dur. 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.**

**Herhangi bir hedef için eşiğin altında sigmoidal eğriye 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-çöz işleminden sonra problem devam ederse yeni bir numune istenmelidir.**



**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.

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≤38.0 = Geçerli
İnsan mRNA*	IC	Örneklem, RNA bütünlüğü, nükleik asit ekstraksiyonu, ve ters transkripsiyon ve qPCR inhibisyonu kontrolü	Cq≤34.0 = Geçerli IC Cq>34.0, ise fakat hedef Cq≤38.0 ise, IC geçerli

**\* Internal kontrolün bulunduğu multipleks reaksiyonda herhangi bir etken pozitif çıktığında internal kontrol (IC) negatif çıksa dahi hedef pozitif olarak yorumlanır. Internal kontrolün bulunduğu multipleks reaksiyonda herhangi bir etken pozitif değil ise internal kontrol (IC) pozitif sonuç vermemelidir.**

Herhangi bir kontrol yukarıda açıklandığı gibi çalışmazsa, çalışma geçersiz sayılır ve test tekrarlanır.

1. Geçersiz PC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.
2. Geçersiz NRC: Üretici ile iletişime geçiniz, reaktifleri yenileyiniz ve reaksiyonu tekrarlayınız.

**Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.**

**Sadece laboratuvarlarda profesyonel kullanım içindir.**

3. Geçersiz NTC: "**Uyarılar**" bölümüne dikkat ederek analizi tekrarlayınız.
4. Geçersiz IC: Analizi tekrarlayınız. Sorun devam ederse, PCR template'yi geçersiz olarak kabul ediniz.

Tüm kontroller geçerliyse, sonuçların yorumlanmasına geçiniz.

#### Tam kan örnekleri için;

- Gen hedeflerinin Cq değeri  $\leq 38$  ise, **pozitif** olarak sonuçlandırınız.
- Gen hedeflerinin Cq değeri  $> 38$  ise, **negatif** olarak sonuçlandırınız.

Nihai sonuç pozitif çıktığında aşağıdaki şekilde raporlandırılır:

- a.  $32 \leq Cq \leq 38$  = Düşük pozitif
- b.  $25 \leq Cq < 32$  = Pozitif
- c.  $18 \leq Cq < 25$  = Yüksek pozitif
- d.  $Cq < 18$  = Çok yüksek pozitif

#### Kan kültürü örnekleri için;

- İlaç direnç geni hedefleri (VanA, VanB- Vankomisin direnci, OXA-48, KPC, NDM, VIM, IMP-Karbapenem direnci, MecA+C-Metisilin direnci) ve Candida krusei, Candida glabrata, Candida albicans, Candida parapsilosis, Candida tropicalis geni hedeflerinin;
  - Cq değeri  $\leq 35$  ise, **pozitif** olarak sonuçlandırınız.
  - Gen hedeflerinin Cq değeri  $> 35$  ise, **negatif** olarak sonuçlandırınız.
- Diğer tüm gen hedefleri için;
  - Cq değeri  $\leq 28$  ise, **pozitif** olarak sonuçlandırınız.
  - Gen hedeflerinin Cq değeri  $> 28$  ise, **negatif** olarak sonuçlandırınız.

Bir kan kültürü örneğinde **birden fazla parametre pozitif** sonuç verdiğinde, aşağıdaki değerlendirme sürecinden sonra nihai raporlandırma gerçekleştirilir:

1. En düşük Cq veren parametre belirlenir = Min Cq
2. (Diğer parametrenin Cq değeri) – (Min Cq)  $< 7$  ise diğer parametre için pozitif sonuç verilir
3. (Diğer parametrenin Cq değeri) – (Min Cq)  $\geq 7$  ise diğer parametre için negatif sonuç verilir.

#### 8. Sınırlamalar

- *Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S Panel'in* performansı sadece tam kan ve pozitif kan kültürü örnekleri için belirlenmiştir.
- *Bio-Speedy® Sepsis RT-qPCR MX-30S Panel'in* hedeflediği bölge içindeki mutasyonlar, primer ve/veya prob bağlanmasını etkileyerek hedef varlığının saptanamamasına 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.

#### 9. Sembollerin Açıklaması

Sembol	Anlam	Sembol	Anlam	Sembol	Anlam
	Avrupa Uygunluğu CE işareti		In Vitro Teşhis Kullanımı için		Güneş ışığından uzak tutun
	Üretici		Lot numarası		Isı ve radyoaktif kaynaklardan koruyun
	Son Kullanım Tarihi YYYY-AA		Katalog Numarası		Paket hasarlıysa kullanmayınız ve kullanım talimatlarına bakınız.
	Negatif Kontrol		Steril Değil		Su/ Nem uzak tutun
	Pozitif Kontrol		Kullanım Talimatlarına bakın veya elektronik kullanım talimatlarına bakın		Kırılabilir dikkatli taşıyınız
	Sıcaklık sınırı (Saklama sıcaklığı)		Dikkat		Dik tutun

#### 10. Üretici ve Teknik Destek



**Bioeksen AR-GE Teknolojileri Anonim Şirketi**

**Adres:** Reşitpaşa Mh., Katar Cd., 4/B-105, 34469, Sarıyer, İstanbul, TÜRKİYE

**Tel:** +90 (212) 285 10 17, **Faks:** +90 (212) 285 10 18, **Web:** www.bioeksen.com.tr, **E-posta:** info@bioeksen.com.tr,

**Teknik destek:** support@bioeksen.com.tr

**Kullanıcıya Bildirim:** Ürün ile ilişkili olumsuz olayları 24 saat içerisinde "[vigilance@bioeksen.com.tr](mailto:vigilance@bioeksen.com.tr)" adresinden tarafımıza iletiniz.

TÜM HAKKI SAKLIDIR