

Manuale utente

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™

Per la rilevazione e la differenziazione dei geni di carbapenemasi da *Enterobacteriaceae* in tamponi rettali

Versione 1.5

Data di rilascio: 20.07.2017

REF

18-0051



24

CE IVD

Indice

Utilizzo previsto	2
Introduzione e principio del metodo.....	2
Contenuto del kit (per 24 reazioni).....	2
Materiali necessari ma non forniti con il kit	2
Conservazione e stabilità	2
Avvertenze e precauzioni	3
Istruzioni per l'uso.....	4
Procedure di preparazione del campione.....	4
Funzionamento BD MAX™	4
Interpretazione dei risultati	5
Domande frequenti (FAQ) e risoluzione dei problemi	6
Limitazioni.....	7
Legenda dei simboli utilizzati	7
Assistenza tecnica	7
Appendice 1: Creare il programma di test Check-Direct CPE Screen v.4.30B o superiori.....	8
Appendice 2: Caratteristiche di prestazione.....	9

Utilizzo previsto

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ è un test diagnostico qualitativo *in vitro* per la rilevazione rapida e la differenziazione dei geni delle carbapenemasi da *Enterobacteriaceae* in tamponi rettali. Check-Direct CPE Screen rileva la presenza dei geni delle carbapenemasi KPC, NDM, VIM e OXA-48, che rappresentano al momento la causa primaria della produzione di carbapenemasi nelle *Enterobacteriaceae*. Il test utilizza il sistema BD MAX™ per l'estrazione del DNA e la successiva PCR in tempo reale, utilizzando i reagenti forniti in combinazione con i reagenti universali e i prodotti monouso per il sistema BD MAX™. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ può essere utilizzato come un aiuto per identificare, prevenire e controllare la diffusione di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi che colonizzano i pazienti in ambienti sanitari. L'utilizzo del test Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ non è inteso allo scopo di diagnosticare infezioni causate da *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi né di dare indicazioni circa o monitorare il trattamento di queste infezioni. È necessario effettuare delle colture in parallelo per consentire la crescita degli organismi per la tipizzazione a scopi epidemiologici, i test di sensibilità e per ulteriori test di conferma di identificazione.

Introduzione e principio del metodo

La comparsa e la diffusione in tutto il mondo della resistenza ai carbapenemi tra le *Enterobacteriaceae* è una minaccia seria alla salute pubblica. Questi organismi sono associati ad alti tassi di mortalità e hanno la capacità di diffondersi in modo molto ampio. La causa più comune della resistenza ai carbapenemi nelle *Enterobacteriaceae* è l'espressione di carbapenemasi, questi organismi vengono anche detti *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi o CPE. I CPE hanno una resistenza elevata o completa ai carbapenemi e alla maggioranza degli altri antibiotici β-lattamici. Attualmente, la grande maggioranza dei CPE è associata alla presenza di una delle seguenti carbapenemasi codificate da plasmidi: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lattamasi), NDM (New Delhi metallo-β-lattamasi) o OXA-48 (Oxacillinasi-48 e varianti del tipo OXA-48). Inoltre, i CPE spesso hanno altri determinanti di resistenza non-β-lattamici che fanno sì che gli isolati diventino multi-resistenti o pan-resistenti ai farmaci. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ è un test multiplex in real-time PCR per la rilevazione dei geni delle carbapenemasi KPC, OXA-48, NDM e VIM. Il test si basa sul riconoscimento specifico e l'amplificazione delle sequenze target delle PCR e sulla rilevazione simultanea dell'accumulo di prodotti di amplificazione PCR mediante sonde fluorescenti DNA. Per KPC, VIM, OXA-48 e NDM esistono molte varianti geniche e Check-Direct CPE Screen è stato concepito per rilevare in modo affidabile la maggior parte di queste varianti. Le varianti rilevate e che si prevede di rilevare per ciascun gene di resistenza sono presentate nel paragrafo sulla specificità *in silico* nell'Appendice 2. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ utilizza cinque diverse sonde fluorescenti e consente di rilevare e discriminare i 4 geni delle carbapenemasi e il target di controllo SPC, che monitora l'estrazione del DNA e l'amplificazione delle PCR.

Contenuto del kit (per 24 reazioni)

Componenti (Materiali N.)	Descrizione
Provette di reagente CPE Screen (9-0121)	24 provette sigillate (sigillo blu)
Controllo positivo CPE (9-0061)	1 provetta (cappuccio viola) 100 µl
CP Mastermix (9-0122)	1 provetta (cappuccio verde) 330 µl
Manuale utente (9-0124)	Volantino - scaricare dal sito

Materiali necessari ma non forniti con il kit

Fornitura	Attrezzatura
<ul style="list-style-type: none"> BD MAX™ Kit Estrazione DNA-1 ExK™ (Rif: 442818) BD MAX™ Cartucce PCR (Rif: 437519) Guanti da laboratorio (senza polvere) monouso Pipette e puntali monouso (con filtri) per volumi di 10 e 25 µl Acqua di qualità per PCR (es. Milli-Q o acqua bidistillata) Tamponi e terreni di trasporto compatibili con la raccolta di campioni rettali. Dispositivo di raccolta tampone consigliato: Copan ESwab, Cat. N. 480CE 	<ul style="list-style-type: none"> Strumento PCR real-time: BD MAX™ System, versione software 4.30B o superiore Mixer Vortex

Conservazione e stabilità

Il kit Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ viene spedito a temperatura ambiente e deve essere conservato al buio a una temperatura compresa tra 2 e 8°C al momento della ricezione. I reagenti sono stabili a una temperatura compresa tra 2 e 8°C fino alla data di scadenza indicata. Non usare componenti scaduti.

Le provette di reagente di Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, il Mastermix PCR e il controllo positivo sono forniti in un sacchetto sigillato. Per proteggere i reagenti dall'umidità, risigillare il sacchetto subito dopo l'apertura. Le provette di reagente sono stabili per un massimo di 14 giorni a una temperatura compresa tra 2 e 8°C dopo l'apertura iniziale e la risigillatura del sacchetto.

Avvertenze e precauzioni

- Il test Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ è destinato a un uso diagnostico *in vitro*.
- Questo prodotto può essere utilizzato solo su sistema BD MAX™.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la confezione esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se i sacchetti protettivi sono aperti o danneggiati al momento dell'arrivo.
- Chiudere tempestivamente i sacchetti protettivi dei reagenti con il sigillo a zip dopo ogni utilizzo. Rimuovere qualsiasi eccesso d'aria nei sacchetti prima della sigillatura.
- Controllare che le strisce di reagente siano riempite con la quantità appropriata di liquido (assicurarsi che i liquidi siano sul fondo delle provette).
- Controllare le strisce di reagenti per assicurarsi che tutti i puntali delle pipette siano presenti.
- Non rimuovere l'essiccante dai sacchetti dei reagenti.
- Non utilizzare i reagenti se l'essiccante non è presente o è rotto all'interno dei sacchetti protettivi.
- Non utilizzare i reagenti se l'alluminio è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti provenienti da sacchetti e/o kit e/o lotti diversi.
- Non scambiare o riutilizzare i tappi, in quanto ciò può causare contaminazione e compromettere i risultati dei test.
- Procedere con cautela quando si usano soluzioni chimiche, in quanto la leggibilità dei codici a barre di Master Mix e della provetta d'estrazione potrebbero venire alterati.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Una buona tecnica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo test. A causa della elevata sensibilità analitica di questo test, bisogna avere estrema cura nel preservare la purezza di tutti i materiali e i reagenti.
- Per evitare la contaminazione da amplicon, non disgregare le cartucce PCR BD MAX™ dopo l'uso. I sigilli delle cartucce PCR BD MAX™ sono stati progettati per evitare la contaminazione.
- L'esecuzione del test Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ fuori dagli intervalli di tempo consigliati può restituire risultati non validi. I test eseguiti al di fuori degli intervalli di tempo specificati devono essere ripetuti con un nuovo campione.
- Possono essere effettuati ulteriori controlli in conformità con le linee guida o i requisiti locali, statali, provinciali e/o federali o di organizzazioni accreditate.
- Nei casi in cui la coltura o altri test PCR siano condotti in laboratorio, bisogna fare attenzione per garantire che i componenti del test Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, eventuali reagenti aggiuntivi necessari per il test e il sistema BD MAX™ non siano contaminati. Evitare in qualsiasi circostanza la contaminazione microbica e deossiribonucleasi (DNasi) dei reagenti. Cambiare i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce.
- Maneggiare sempre i campioni come se fossero contagiosi e in conformità con procedure sicure di laboratorio, come quelle descritte nel documento CLSI M2911 e nel manuale di Biosicurezza nei laboratori microbiologici e biomedici.
- Indossare indumenti protettivi e guanti monouso durante il trattamento di tutti i reagenti.
- Lavare accuratamente le mani dopo l'esecuzione del test.
- Non fumare, bere, masticare o mangiare nelle aree dove vengono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
- Smaltire i reagenti non utilizzati e i rifiuti in conformità con le norme locali, statali, provinciali e/o federali.
- Consultare il manuale utente del Sistema BD MAX™ per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure.

Si prega di leggere il protocollo completo prima di iniziare il test

Istruzioni per l'uso

Procedure di preparazione dei campioni

Preparazione test per tamponi rettali

Nota: La procedura di prelievo e conservazione dei campioni deve essere seguita con attenzione utilizzando dispositivi adeguati per il prelievo dei campioni (si veda la sezione *Materiali necessari ma non forniti con il kit*). I tamponi rettali conterranno quantità variabili di materiale fecale a seconda della procedura utilizzata per la raccolta del campione. Check-Points consiglia di convalidare il metodo di raccolta e di elaborazione del campione con Check-Direct CPE Screen prima di un uso di routine del test.

1. Raccogliere campioni rettali secondo le linee guida locali e le raccomandazioni del produttore del tampone.
2. Trasferire i tamponi nelle provette contenenti il terreno di trasporto liquido.
3. Trasferire i campioni del tampone rettale da analizzare nella stanza PCR o conservare fino a nuovo uso secondo le raccomandazioni del produttore del tampone e/o le normative locali.
4. Mescolare brevemente ciascuna provetta contenente il campione rettale e trasferire con una pipetta 25 µl una del terreno di trasporto in una provetta tampone per campioni DNA SB-1.
5. Chiudere la provetta tampone per campioni con un tappo a setto e agitare per 10 secondi a velocità media.

Preparazione delle reazioni di controllo

Per convalidare i risultati, effettuare un test con controllo positivo e negativo per ciascun a corsa effettuata con il test PCR Check-Direct CPE Screen. Il controllo positivo viene fornito con il kit.

- **Controllo positivo:**
Pipettare 10 µL di controllo positivo in una provetta tampone per campioni. Agitare per 10 secondi.
- **Controllo negativo:**
Trasferire con una pipetta 10 µL di acqua per PCR in una provetta tampone per campioni. Agitare per 10 secondi.

Funzionamento BD MAX™

1. Configurazione della PCR multiplex in real-time

La tabella 1 mostra la configurazione della PCR multiplex in real-time con i target rilevati in ciascun canale rilevatore del sistema BD MAX™.

Tabella 1: Configurazione qPCR Multiplex

Rilevatore	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Canale	1	2	3	4	5
Target	KPC	VIM	OXA-48	NDM	SPC*

*SPC: Controllo trattamento campioni

Quando il test viene eseguito per la prima volta, creare il programma di test PCR "C-D CPE Screen" come descritto nell'Appendice 1.

2. Configurazione Rack BD MAX™

- 2.1. Caricare i rack del sistema BD MAX™ con il numero di strisce reagenti unitarie a DNA necessarie per il numero di campioni da testare. Dare colpetti delicati su ciascuna striscia per assicurarsi che tutti i liquidi siano raccolti sul fondo della rispettiva provetta.
- 2.2. Preparare le strisce reagenti unitarie:
 - 2.2.a. Mettere le strisce reagenti unitarie nelle rispettive posizioni sul rack BD MAX™. Non bloccare le strisce in posizione.
 - 2.2.b. Inserire una provetta di reagente di estrazione DNA BD Exk-1 (sigillo bianco) nella posizione **1** della striscia, si veda la Figura 1.
 - 2.2.c. Inserire una provetta di reagente CPE Screen (sigillo blu) nella posizione **3** della striscia, si veda la Figura 1.
 - 2.2.d. Forare il sigillo blu della provetta di reagente CPE Screen nella posizione **3**, ad esempio con la punta di una pipetta monouso. Poi, dispensare con attenzione 12,5µl di CP MasterMix sul fondo della provetta assicurandosi che non si creino bolle d'aria.
 - 2.2.e. Inserire le strisce reagenti unitarie nelle rispettive posizioni sul rack una volta terminata la loro preparazione.

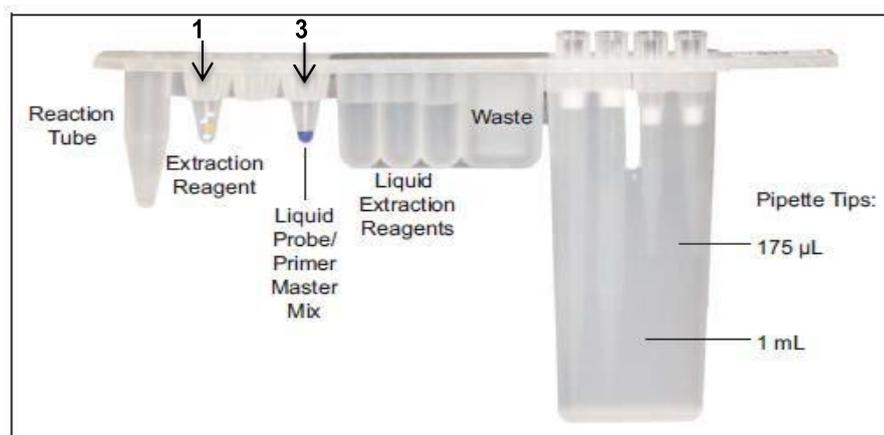


Figura 1: Setup striscia reagente unitaria a DNA.

3. Configurazione strumento BD MAX™

- 3.1 Aprire la scheda **Esegui** del **software v4.30B** o superiore del Sistema BD MAX™ e compilare la **Worklist**.
- 3.2 Selezionare il **Test "C-D CPE Screen"**. Si veda l'Appendice 1 per la creazione del test "C-D CPE Screen" se non è ancora nel menu Test.
- 3.3 Inserire il codice a barre della **provetta tampone per campioni** utilizzando lo scanner per i codici a barre (è possibile anche inserire il codice a barre manualmente). Iniziare con la posizione 1 del rack A. Posizionare ciascuna provetta tampone per campioni nella rispettiva posizione sui rack BD MAX™ (con tappo a setto).
- 3.4 Inserire le informazioni di identificazione del campione o del paziente sulla riga **Accession** della worklist. Controllare che le informazioni di ciascun campione o paziente corrispondano alle rispettive provette tampone per campioni sul Rack.
- 3.5 Caricare il/i Rack nel Sistema BD MAX™. (Il Rack A è posizionato a sinistra dello strumento e il Rack B a destra).
- 3.6 Caricare la cartuccia/e PCR BD MAX™.
- 3.7 Chiudere lo sportello dello strumento e selezionare **Inizia Corsa**.

Interpretazione dei risultati

Importante, prima di iniziare: Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al *Manuale utente Sistema BD MAX™*.

Controllare sempre il grafico di amplificazione di ogni campione testato in riferimento ai valori C_T ottenuti con il software.

1. Risultati riportati

Il software BD MAX™ riporta i valori C_T e le curve di amplificazione per ciascun canale rilevatore di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Un valore C_T di **0** indica che non è stato calcolato nessun valore C_T dal software con la Soglia specificata (si veda l'Appendice 1). La curva di amplificazione del campione che riporta un valore C_T pari a "0" deve essere controllata manualmente.
- Un valore C_T di **-1** indica che non si è verificato nessun processo di amplificazione valido. Controllare che non ci sia alcuna curva di amplificazione per il campione con un valore C_T di -1 sui risultati grafici.
- Qualsiasi altro valore C_T deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e secondo le linee guida di interpretazione delineate nelle tabelle 2 e 3.

2. Interpretazione

2.1 Convalida corsa

Verificare che la corsa PCR real-time sia valida prima di interpretare i risultati dei dati. Controllare che non ci sia nessun report d'errore del sistema BD MAX™. Se applicabile, controllare le curve di amplificazione del controllo positivo e negativo. La tabella 2 mostra i criteri per una corsa valida di Check-Direct CPE Screen sul Sistema BD MAX™. Se i valori C_T dei controlli differiscono da quelli previsti, consultare la sezione FAQ e Risoluzione dei problemi "3".

Tabella 2: Criteri per una corsa valida con il test Check-Direct CPE Screen.

Tipo di Campione*	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
Controlli positivi	32 ± 3	29 ±	28 ± 3	31 ± 3	28 ± 3
Campione negativo	-1	-1	-1	-1	28 ± 3

2.2 Interpretazione dei risultati

Se la corsa è stata convalidata, interpretare i risultati come positivi, negativi o irrisolti con i valori C_T ottenuti per i campioni seguendo le linee guida riassunte nella tabella 3. Si prega di controllare sempre che la curva di amplificazione di ciascun campione sia in accordo con i valori C_T e l'interpretazione dei risultati dati dal software. Corse irrisolte dovrebbero essere ritestate.

Tabella 3: linee guida di interpretazione dei dati per tamponi rettali.

KPC, VIM, OXA, NDM Valori C_T	SPC Valori C_T	Interpretazione
Sì	Sì	Campione positivo
-1	28 ± 3	Campione negativo
-1	<25 o >32	Irrisolto
-1 o Sì	-1	Irrisolto

NOTE IMPORTANTI:

- Sì significa che il valore C_T viene rispettato e registrato nella tabella dei risultati.
- Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali in un campione testato.
- I valori C_T dei tamponi rettali possono variare considerevolmente a causa delle differenze nel materiale fecale e nella "carica batterica" dei tamponi rettali nel terreno di trasporto.
- Se il sistema BD MAX™ restituisce risultati Indeterminati o Incompleti (IND o INC) a causa di un errore del sistema BD MAX™, si prega di contattare il proprio rappresentante BD.

Domande frequenti (FAQ) e risoluzione dei problemi

Fare riferimento alla sezione "risoluzione dei problemi" del Manuale utente del Sistema BD MAX™ per ulteriori informazioni

- 1. I risultati in real-time non mostrano valori C_T o l'interpretazione indica che il campione è irrisolto.** Possibili cause e risoluzione:
 - La reazione PCR è stata inibita da sostanze esogene o endogene. Si prega di ripetere il test sul campione. Se ancora inibito, una quantità minore di campione di partenza può migliorare i risultati.
 - L'estrazione del DNA è fallita dal momento che l'SPC non è stato rilevato.
 - Il reagente del CPE Screen o il CP MasterMix potrebbero essere scaduti.
 - Si è verificato un errore durante il processamento dei reagenti liquidi: controllare le strisce reagenti unitarie e la cartuccia PCR per determinare dove si è verificato il problema durante il processamento dei reagenti liquidi (esempio: bolla d'aria nella cartuccia) e testare nuovamente il campione. Se il problema persiste, contattare il proprio rappresentante BD
- 2. Risoluzione problemi per risultati irrisolti.**
Per risultati irrisolti: Ripetere il test con il campione originale preparando una nuova provetta tampone per campioni. In alternativa, testare il campione nuovamente prelevato o utilizzare una quantità minore di campione.
- 3. I risultati in real-time non mostrano valori C_T per il controllo positivo oppure l'interpretazione indica che il campione è irrisolto?**
Possibili cause e risoluzione:
 - Non è stata aggiunta la soluzione del controllo positivo.
 - Il reagente del CPE Screen o il CP MasterMix potrebbero essere scaduti.
 - Si sono verificate bolle d'aria nella camera di reazione PCR del controllo positivo.
- 4. I risultati in real-time mostrano segnali fluorescenti molto bassi in tutti i campioni e nei canali del rilevatore, compreso il segnale SPC.**
Possibili cause e risoluzione:
 - Le provette di reagente del CPE Screen contenenti probes e primers fluorescenti potrebbero essere deteriorate. Si prega di controllare la data di scadenza e di assicurarsi che le provette del CPE Screen siano state conservate in modo corretto.
 - Il sistema BD MAX™ potrebbe essere la causa di questi risultati. Si prega di fare riferimento al Manuale utente di BD MAX™ o di contattare il proprio rappresentante BD.
- 5. Il Sistema BD MAX™ mostra un errore o un guasto.**
Consultare il manuale utente dello strumento BD MAX™ o contattare il proprio rappresentante BD.
- 6. Campioni duplicati testati con il test Check-Direct CPE Screen non danno risultati identici.**
I valori C_T di campioni identici possono variare tra reazioni individuali. Variazioni significative, con valori $C_T > 2$, suggeriscono errori di pipettaggio o altre differenze tra i campioni duplicati.

Limitazioni

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ usa una gamma di marker specifici di DNA per rilevare la presenza dei geni delle carbapenemasi KPC, NDM, OXA-48 e VIM, che al momento rappresentano le carbapenemasi maggiormente prevalenti a livello clinico. Il test rileva tutte le varianti al momento conosciute di KPC, NDM, OXA-48 e VIM, tranne VIM-7, una variante rara trovata soltanto in *Pseudomonas aeruginosa*. Si noti inoltre che altre famiglie geniche rare di carbapenemasi non vengono rilevate. Il test è destinato ad essere utilizzato solo con tamponi rettali in un terreno di trasporto come materiale di partenza.

La qualità del DNA di partenza è un fattore importante per ottenere risultati affidabili con Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. Il DNA deve essere estratto da tamponi rettali utilizzando i dispositivi e le procedure descritte in questo manuale. L'analisi è stata testata in modo estensivo con DNA purificato da batteri Gram-negativi, come *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Pseudomonas*, con ottimi risultati. Tuttavia, non si può mai escludere che altri batteri Gram-negativi o alcuni ceppi delle specie di cui sopra possano dare scarsi risultati. Check-Direct CPE Screen non può e non dà alcuna dichiarazione o garanzia della sua capacità di rilevare correttamente i geni delle carbapenemasi in tutte le specie, sottospecie o tipi di gram-negativi o in tutti i campioni clinici. I risultati possono necessitare di conferma mediante metodologie supplementari in casi specifici (ad esempio per campioni regolatori). A causa dell'alta variabilità dei genomi batterici, è possibile che alcuni sottotipi non vengano rilevati. I test riflette lo stato delle conoscenze di Check-Points Health B.V.

Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali in un campione testato. Il DNA del gene di carbapenemasi potrebbe esser stato rilevato da organismi non vitali.

La presenza di più specie di batteri in un campione potrebbe ostacolare l'interpretazione del test. Come nel caso di altre analisi diagnostiche, i risultati di questo test possono essere interpretati solo in combinazione con dati clinici e di laboratorio supplementari accessibili alla persona responsabile. L'uso di questa analisi è limitato a personale adeguatamente qualificato, ben addestrato nell'esecuzione di metodi di rilevazione molecolare basati sul DNA.

Legenda simboli utilizzati

Simbolo	Definizione
	CP Mastermix
	Controllo CPE
	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Numero del catalogo
	Codice del lotto
	Utilizzare prima di AAAA-MM
	Consultare le istruzioni d'uso
	Produttore
	Limitazione di temperatura
	Contiene quantità sufficiente per <n> test

Assistenza tecnica

support@check-points.com

+31 317 453 908

Nonostante la massima cura nello sviluppo e nella preparazione del protocollo, Check-Points non può assumersi alcuna responsabilità per errori, omissioni e/o cambiamenti futuri nel presente documento.

Citazione di letteratura: Quando si descrive una procedura per la pubblicazione utilizzando questo prodotto, si prega di riferirsi allo stesso come *Check-Direct CPE Screen*.

Avviso all'acquirente:

Questo prodotto è venduto in licenza da PHRI Properties e può essere utilizzato sotto i diritti di brevetto di PHRI Properties solo per diagnostica umana *in vitro*, analisi di alimenti, analisi veterinaria o ricerca. Sostanze coloranti e inibenti in questo prodotto sono vendute con licenza Biosearch Technologies Inc. e protette da brevetti statunitensi e mondiali rilasciati o in fase di applicazione. La concessione di licenza copre le applicazioni diagnostiche umane *in vitro* (IVD).

Trademarks

BD, BD MAX™ sono marchi registrati di Becton Dickinson GmbH

Check-Points Health BV
 Binnenhaven 5
 6709 PD Wageningen
 Paesi Bassi

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



Appendice 1: Creare il programma di test Check-Direct CPE Screen v.4.30B o superiori

Importante, prima di iniziare: Fare riferimento al Manuale utente di Sistema BD MAX™ per istruzioni dettagliate sul funzionamento del sistema BD MAX™ e sulla **versione del software 4.30B o superiori**.

Per creare un nuovo test, nella scheda **Test Editor**, selezionare **Crea** e applicare la seguente procedura:

- Nella scheda **Informazioni di Base** inserire i seguenti parametri:
 - Nome Test:** *C-D CPE Screen*.
 - Tipo di Estrazione:** Selezionare *Exk DNA-1 (Plasma/Siero)*.
 - Formato Master Mix:** selezionare *Tipo 3: Liquido MM con Primers e Probes*.
 - Parametri Estrazione Campione:** selezionare *Definito dall'utente* e regolare il *volume del campione* a 600µl, si veda la tabella A.
 - Calcolo CT:** selezionare *Chiama CT al punto di flessione*.

Salvare i parametri

- Nella scheda **Impostazioni PCR** inserire i seguenti parametri:
 - Alias, Incremento PCR e Soglia:** per ciascun canale rilevatore inserire i parametri corretti specificati nella tabella B.
 - Compensazione di colore:** inserire i parametri corretti specificati nella Tabella C.

Salvare i parametri

- In **Passaggi del Test** inserire i passaggi PCR come specificato nella tabella D.

Salvare i parametri

Tabella A: Parametri di estrazione del campione.

Parametri	Valore
Tempo lisi a caldo	10
Temperatura lisi	37
Altezza pescaggio puntuale	1600
Volume campione	600
Volume lavaggio	500
Volume di neutralizzazione	----
Tempo calore DNasi	----

Tabella B: Parametri di Alias, Incremento PCR, Soglia

Rilevatore	Alias	Incremento	Soglia
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

Tabella C: Parametri di cross-talk degli spettri

	Canale ricevente falso					
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Canale d'eccitazione	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	

Tabella D: Parametri dei passaggi del test PCR

Nome del passaggio	Tipo di Profilo	Cicli	Tempo (s)	Temp (°C)	Rileva
Denaturazione	Mantenimento	1	600	98	NO
Amplificazione e Rilevazione	2 - Temperatura	50	15	98	NO
			62	60	Sì

Appendice 2: Caratteristiche di prestazione

Limite di rilevazione con tamponi rettali

Il limite analitico di rilevazione (LoD) del Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ è stato determinato utilizzando tamponi rettali addizionati con quantità ben definite di batteri target. Il terreno di trasporto E-swab Amies (Copan) è stato inoculato con circa 10mg/ml di feci umane imitando un tipico campione di tampone rettale. I ceppi che contengono i geni di carbapenemasi target sono stati coltivati durante la notte e le sospensioni cellulari sono state preparate in acqua Milli-Q con una densità di 0,5 McFarland. Queste sospensioni cellulari sono state utilizzate per addizionare i tamponi rettali artificiali per creare campioni con una quantità ben definita di materiale fecale e di batteri target.

Un'ampia raccolta di campioni creati come descritto sopra sono stati utilizzati per valutare il limite analitico di rilevazione (LoD) seguendo il protocollo come descritto alle pagine 4 e 5 di questo Manuale utente. I risultati sono illustrati nella tabella sottostante. SBT si riferisce alla provetta tampone per campioni (Sample Buffer Tube) BD MAX™.

Target	CFU per SBT	CFU/PCR	% Successo
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%

Specificità *in silico*

La specificità del test diagnostico in real-time Check-Direct CPE Screen è assicurata dalla selezione dei primer e dei probes appropriati, nonché dalla selezione di rigorose condizioni di reazione. Le sequenze di primer e probes sono state progettate per identificare in modo specifico le varianti geniche elencate nella tabella sottostante. Una corrispondenza di sequenza del 100% con primers e probes mediante analisi *in silico* è stata presupposta per garantire una rilevazione affidabile di ciascuna delle varianti raffigurate. Sono state riscontrate delle singole discrepanze dei primers e probes con alcune varianti, discrepanze ritenute comunque non compromettenti ai fini della rilevazione. La conferma si è avuta testando tali varianti a confronto con quelle varianti omologhe al 100%.

Le sequenze di primers e probes sono state testate per potenziali omologie con geni di altri organismi utilizzando tutte le sequenze di geni presenti nella banca internazionale dei geni al 1° aprile 2014 (GenBank®, database sequenze genetiche NIH), utilizzando un'analisi comparativa di sequenze. Non è stata trovata alcuna omologia incrociata con altri organismi per primers e probes selezionati.

Gene di carbapenemasi	Varianti rilevate
KPC	1 – 17
NDM	1-10
VIM	1-6 e 8-38
OXA-48	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247, 370

Specificità analitica

La specificità analitica del test diagnostico in real-time Check-Direct CPE Screen è stata determinata testando la reattività incrociata con campioni contenenti un'elevata quantità di organismi non-target. Sono stati utilizzati 103 ceppi carbapenemasi-negativi per testare la specificità del test in real-time Check-Direct CPE Screen. Una panoramica di questi ceppi è illustrata nella tabella sottostante. Tutti gli isolati sono risultati negativi con l'analisi Check-Direct CPE Screen e il controllo interno è stato rilevato in modo affidabile in tutti i campioni. La specificità è risultata essere del 100% sulla base dei ceppi di riferimento testati.

Specie	Ceppi testati
<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

Inclusività analitica

È stato eseguito uno studio retrospettivo con 93 ceppi batterici di 14 specie diverse di gram-negativi, che erano stati identificati in precedenza come carbapenemasi-positivi con il test diagnostico microanalitico di Check-Points Check-MDR CT103 (Check-Points Health). Tutti i 93 ceppi batterici erano stati identificati correttamente per i geni di carbapenemasi target. I risultati sono illustrati nella tabella sottostante. L'inclusività è risultata essere del 100% per i ceppi testati.

Numero di ceppi testati	Risultato Check-MDR CT103	Risultato Check-Direct CPE Screen
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

Prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche di Check-Direct CPE Screen per Analisi BD MAX™ sono state valutate in tre studi prospettici separati che hanno coinvolto quattro centri clinici europei. La prevalenza di CPE (*Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi) in assenza di un outbreak è bassa ed è difficile ottenere campioni freschi contenenti CPE. Pertanto, i campioni prospettici sono stati integrati con campioni artificiali (isolati ben caratterizzati addizionati nella matrice del tampone rettale negativo) per compensare la scarsa quantità di campioni positivi. I campioni di tamponi rettali raccolti come parte della routine di cura dei pazienti sono stati testati con Check-Direct CPE Screen per Analisi BD MAX™ e confrontati con un metodo di coltura di riferimento (terreno di coltura selettivo ChromID ESBL o Chrom ID Carba Smart).

Campioni prospettici clinici positivi alla coltura sono stati confermati da PCR gene-specifiche.

Sono stati testati un totale di 1203 campioni di tamponi rettali, tra i quali 30 (2,5%) campioni hanno dato risultati inconclusivi e pertanto sono stati esclusi dai risultati riportati sotto. 41 dei 1173 campioni inclusi nei risultati erano campioni artificiali contenenti ceppi ben caratterizzati di batteri positivi KPC, VIM, OXA-48 o NDM. Le prestazioni generali e quelle per target di Check-Direct CPE Screen per Analisi BD MAX™ sono riportate sotto.

Per quanto riguarda il metodo di riferimento, l'analisi Check-Direct CPE Screen ha dimostrato una sensibilità e una specificità generali rispettivamente del 98,5% e del 96,8% nel set combinato di campioni artificiali e prospettici (si veda la tabella sottostante).

Prestazioni generali di Check-Direct CPE Screen rispetto al metodo di riferimento

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

Sensibilità: 98,5% (67/68)
 Specificità: 96,8% (1070/1105)

Prestazioni di Check-Direct CPE Screen rispetto al metodo di riferimento per KPC

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

Sensibilità: 96,6% (28/29)
 Specificità: 99,3% (1136/1144)

Prestazioni di Check-Direct CPE Screen rispetto al metodo di riferimento per OXA48

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

Sensibilità: 100% (13/13)
 Specificità: 99,3% (1152/1160)

Prestazioni di Check-Direct CPE Screen rispetto al metodo di riferimento per VIM

VIM		Coltura		Totale
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	15	19	34
	-	0	1139	1139
Totale		15	1158	1173

Sensibilità: 100% (15/15)
 Specificità: 98,4% (1139/1158)

Prestazioni di Check-Direct CPE Screen rispetto al metodo di riferimento per NDM

NDM		Coltura		Totale
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	11	0	11
	-	0	1162	1162
Totale		11	1162	1173

Sensibilità: 100% (11/11)
 Specificità: 100% (1162/1162)