

# Manuel de l'utilisateur

## Check-Direct CPE for BD MAX™

Pour la détection et la différenciation des gènes carbapénèmases à partir de colonies isolées *Entérobactéries*

Version 2.0

Date de publication : 22-01-2019

**REF** 18-0082  24

CE **IVD**

### Table des matières

Application prévue.....	2
Introduction et principes de la méthode.....	2
Contenu du kit (pour 24 réactions) .....	2
Matériel requis mais non fourni avec la trousse .....	2
Conservation et stabilité.....	2
Avertissements et précautions .....	3
Procédures de préparation de l'échantillon .....	4
Utilisation du BD MAX™ .....	4
Interprétation des résultats .....	5
Foire aux questions (FAQ) et dépannage .....	6
Limitations .....	7
Explication des symboles .....	7
Assistance technique .....	7
Annexe 1 : création du programme Check-Direct CPE v.4.70 ou version ultérieure .....	8
Annexe 2 : caractéristiques des performances .....	9

## Application prévue

Check-Direct CPE for BD MAX™ est un test de diagnostic qualitative *in vitro* pour la détection rapide des gènes de carbapénèmes dans les *Entérobactéries*. Le test est destiné à être utilisé à partir de bactéries mises en culture isolées de spécimens cliniques. La trousse Check-Direct CPE détecte la présence des gènes codant pour des carbapénèmes de type KPC, NDM, VIM et OXA-48, qui sont, actuellement, la principale cause de résistance aux carbapénèmes chez les *Entérobactéries*. Le test requiert l'emploi du Système automatisé BD MAX™ pour l'extraction et la concentration d'ADN, la réhydratation des réactifs, l'amplification de l'acide nucléique et la détection des séquences d'acide nucléique cibles, en utilisant une réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel. La trousse Check-Direct CPE for BD MAX™ peut être utilisée afin de faciliter l'identification, la prévention et le contrôle des patients colonisés par des *Entérobactéries* productrices de carbapénèmes en milieu hospitalier. La trousse Check-Direct CPE for BD MAX™ ne doit servir de base unique à un diagnostic, un traitement ou à d'autres décisions thérapeutiques relatives au patient présentant des signes d'infections liées aux *Entérobactéries* produisant des carbapénèmes. Le typage épidémiologique, les tests de sensibilité et autres tests d'identifications doivent être fait en parallèle à l'aide de méthode de culture traditionnelle.

## Introduction et principes de la méthode

Les carbapénèmes sont une classe d'antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines et ayant le spectre d'activité antimicrobienne le plus large. L'émergence et la diffusion à l'échelle mondiale de la résistance aux carbapénèmes chez les *Entérobactéries* est une menace sérieuse pour la santé publique. Ces organismes sont associés à des taux de mortalité élevés et ont le potentiel de se propager facilement. La cause la plus fréquente de la résistance aux carbapénèmes chez les *Entérobactéries* est l'expression de carbapénémases, enzyme ayant une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes. Ce type d'*Entérobactéries* est communément appelée entérobactérie productrices de carbapénémases ou EPC. Les EPC possèdent une résistance élevée ou totale à la plupart des carbapénèmes et à la plupart des autres antibiotiques  $\beta$ -lactamines. À l'heure actuelle, la grande majorité des EPC sont associées à la présence de carbapénémases possédant un des plasmides suivants : KPC (carbapénémase *Klebsiella pneumoniae*), VIM (métallo- $\beta$ -lactamase codée par l'intégron Verona), NDM (métallo- $\beta$ -lactamase Delhi) ou OXA-48 (Oxacillinase-48). De plus, les EPC présentent souvent d'autres résistances non- $\beta$ -lactamines résultant en des isolats multi-résistants et résistants à de multiples antibiotiques.

La trousse Check-Direct CPE for BD MAX™ est un test multiplex de PCR en temps réel permettant la détection des gènes carbapénémases KPC, OXA-48, NDM et VIM. Le test est basé sur la reconnaissance spécifique et l'amplification de séquences cibles par PCR, ainsi que la détection simultanée de l'accumulation de produits d'amplification PCR par des sondes d'ADN fluorescentes. Pour KPC, VIM, OXA-48 et NDM de nombreuses variantes de gènes existent, et la trousse Check-Direct CPE a été conçue pour détecter toutes les variantes de manière fiable. La trousse Check-Direct CPE for BD MAX™ utilise cinq sondes fluorescentes différentes permettant la détection et la discrimination des 4 gènes carbapénémases ainsi que du contrôle interne du traitement de l'échantillon, qui surveille l'extraction de l'ADN et l'amplification PCR.

## Contenu du kit (pour 24 réactions)

Contenu (N° mat.) mat.)	Description
Tubes de réactif CPE (9-0062)	24 tubes scellés (opercule violet)
Contrôle positif CPE (9-0060)	1 tube (bouchon violet) 100 $\mu$ l
Manuel de l'utilisateur (9-0079)	Brochure - à télécharger depuis le site

## Matériel requis mais non fourni avec la trousse

Matériaux	Équipement
<ul style="list-style-type: none"> <li>Trousse d'extraction BD MAX™ ExK DNA-1 (réf. : 442818)</li> <li>Master Mix BD MAX™ MMK DNA (réf. : 442848)</li> <li>Cartouches PCR BD MAX™ (Réf : 437519)</li> <li>Blouse / gants de laboratoire jetables (sans poudre)</li> <li>Pipettes et embouts (filtre) jetables pour des volumes de 10 à 1000 <math>\mu</math>l</li> <li>Solution saline (150 mM NaCl ou 0,9 % p/v NaCl)</li> <li>Eau distillée ou eau purifiée (Milli-Q)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Instrument PCR en temps réel : système BD MAX™, version logicielle 4.70 ou ultérieure</li> <li>Densitomètre approprié pour suspensions bactériennes</li> <li>Vortex</li> </ul>

## Conservation et stabilité

Les composants de la trousse Check-Direct CPE for BD MAX™ sont stables de 2 à 25°C jusqu'à la date de péremption indiquée. Ne pas utiliser de composants périmés.

Les tubes de réactifs et les contrôles positifs Check-Direct CPE for BD MAX™ sont fournis dans un sachet scellé. Pour protéger les réactifs de l'humidité, re-scellez immédiatement le sachet après ouverture. Les tubes de réactifs sont stables jusqu'à 14 jours lorsque conservé de 2 à 25°C après ouverture initiale et re-fermeture du sachet.

## Avertissements et précautions

- Le test Check-Direct CPE for BD MAX™ est destiné à un usage diagnostique *in vitro*.
- Ce produit ne peut être utilisé que sur le système BD MAX™.
- Ne pas utiliser la trousse si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est livrée déchirée.
- Ne pas utiliser les réactifs si les sachets protecteurs sont ouverts ou endommagés à leur arrivée.
- Refermer immédiatement les sachets de protection des réactifs avec la fermeture éclair après chaque utilisation. Retirer l'air des sachets avant de les refermer.
- Vérifier le remplissage des barrettes réactives unitarisées (s'assurer que les liquides sont au fond des tubes).
- Vérifier les barrettes réactives unitarisées pour s'assurer que tous les embouts de pipette sont présents.
- Ne pas retirer le dessiccant des sachets de réactifs.
- Ne pas utiliser les réactifs s'il n'y a pas de dessiccant ou si le dessiccant est ouvert dans les sachets de réactifs.
- Ne pas utiliser les réactifs si l'aluminium scellant est ouvert ou endommagé.
- Ne pas mélanger les réactifs de différents sachets et / ou kits et / ou lots.
- Ne pas interchanger ni réutiliser les bouchons pour ne pas les contaminer et fausser ainsi les résultats.
- Procéder avec prudence lors de l'utilisation des solutions chimiques afin de ne pas nuire à la lecture du code à barre des Master Mix et des tubes d'extractions.
- Ne pas utiliser des réactifs et / ou matériels périmés.
- Une bonne technique de laboratoire est essentielle pour que ce test soit réussi. En raison de la sensibilité analytique élevée de ce test, un soin extrême doit être pris pour préserver la pureté de tous les matériaux et réactifs.
- Pour éviter la contamination par les amplicons, ne pas briser les cartouches PCR BD MAX™ après utilisation. Les scellés des cartouches PCR BD MAX™ sont conçus pour empêcher la contamination.
- La réalisation du test Check-Direct CPE for BD MAX™ en dehors des intervalles recommandés de temps et de température recommandés pour le transport et la conservation des échantillons peut produire des résultats invalides. Les analyses qui ne sont pas effectuées dans les intervalles de temps spécifiés doivent être répétées avec un nouvel échantillon.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux directives ou exigences locales, nationales, provinciales et / ou fédérales ou des organismes d'accréditation.
- Dans les cas où la culture ou d'autres tests de PCR sont effectués en laboratoire, des précautions doivent être prises pour veiller à ce que les composants du test Check-Direct CPE for BD MAX™, les réactifs supplémentaires requis pour le test et le système BD MAX™ ne soient pas contaminés. Toujours éviter la contamination des réactifs à des agents microbiens et à la désoxyribonucléase (DNase). Les gants doivent être changés avant de manipuler les réactifs et les cartouches.
- Toujours manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et conformément aux procédures de sécurité de laboratoire telles que celles décrites dans le document CLSI M2911 et dans le document Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (prévention des risques biotechnologiques en laboratoires microbiologiques et biomédicaux).
- Porter des vêtements de protection et des gants jetables pour manipuler tous les réactifs.
- Se laver les mains après avoir effectué le test.
- Ne pas fumer, boire, mâcher ni manger dans les zones où les échantillons ou les réactifs du kit sont manipulés.
- Éliminer les réactifs et les déchets non utilisés conformément aux réglementations locales, provinciales et / ou fédérales.
- Consulter le manuel de l'utilisateur du système BD MAX™ pour les avertissements, précautions et procédures.

**Veillez lire toutes les instructions avant de réaliser le test**

## Mode d'emploi

### Procédures de préparation de l'échantillon

#### Préparation des bactéries mises en culture

1. Inoculez des plaques de gélose nutritive avec les échantillons cliniques ou les souches bactériennes à tester et placez en incubation pendant une nuit à 37°C. U milieu de croissance standards incluent les géloses au sang, les géloses MacConkey et les géloses Trypticase soja.
2. Préparez une suspension de cellules bactériennes dans une solution saline de 0,5 McFarland – 1,0 ( $\approx 1 - 2 \times 10^8$  UFC / ml) d'une ou plusieurs colonies provenant de chaque plaque en utilisant une boucle de 1 ou 10  $\mu$ l.
3. Pipettez 10  $\mu$ l de la suspension bactérienne ( $\approx 1 - 2 \times 10^6$  CFU / ml) et 500  $\mu$ l d'eau Milli-Q ou d'eau purifiée dans un tube de tampon d'échantillon BD MAX™ (SB-1). (fourni par BD avec la trousse d'extraction d'ADN ExK DNA-1, référez-vous au *matériel requis mais non fourni avec la trousse*).
4. Fermez le tube de tampon d'échantillon BD MAX™ avec un bouchon pré-percé et mélangez au vortex 10 secondes à faible vitesse.
5. Transférez les tubes de tampon d'échantillons BD MAX™ contenant les suspensions de cellules bactériennes dans la salle PCR.

#### Préparation des contrôles

Un contrôle négatif et au moins un contrôle positif sont recommandés dans chaque série d'amplification / détection effectuée avec le test Check-Direct CPE afin de valider la série. Le contrôle positif est fourni avec la trousse.

- **Contrôle positif :**  
Pipettez 10  $\mu$ l du contrôle positif et 500  $\mu$ l d'eau Milli-Q ou d'eau purifiée dans un tube de tampon d'échantillon BD MAX™. Mélangez au vortex pendant 10 secondes.
- **Contrôle négatif :**  
Pipettez 500  $\mu$ l d'eau Milli-Q et d'eau purifiée dans un tube de tampon d'échantillon BD MAX™. Mélangez au vortex pendant 10 secondes.

### Utilisation du BD MAX™

#### 1. Préparation du mélange réactionnel RT-PCR

Le tableau 1 représente les différentes cibles détectées par le test Check-Direct CPE for chaque canaux du système BD MAX™.

**Tableau 1 : Configuration du test Multiplex RT-PCR**

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

\* SPC : contrôle interne du traitement de l'échantillon

Lorsque vous effectuez le test pour la première fois, créez le programme PCR « Check-Direct CPE 4 » comme décrit dans l'annexe 1.

#### 2. Préparation des portoirs BD MAX™

- 2.1. Chargez les portoirs BD MAX™ avec le nombre nécessaire de barrettes réactives unitarisées pour le nombre d'échantillons à tester. Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent dans le fond du tube.
- 2.2. Préparez les barrettes réactives unitarisées :
  - 2.2.a. Clipsez le tube d'extraction d'ADN (opercule blanc) en position 1 de la barrette, voir la figure 1.
  - 2.2.b. Clipsez le tube de Master Mix BD MAX™ MMK DNA (opercule vert / jaune) en position 2 de la barrette, voir la figure 1.
  - 2.2.c. Clipsez le tube de réactif CPE (opercule bleu) en position 3 de la barrette, voir la figure 1.

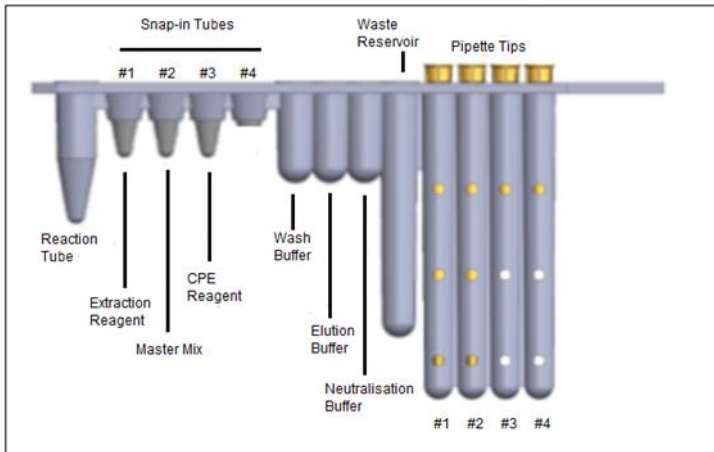


Figure 1 : Configuration de la barrette réactive unitaire ADN

### 3. Utilisation du Système BD MAX™

- 3.1. Ouvrez l'onglet **Analyse** du logiciel du système BD MAX™ v4.70 et remplissez la **liste de travail**.
- 3.2. Sélectionnez le test « Check-Direct CPE 4 ». Voir l'annexe 1 pour créer le programme « Check-Direct CPE 4 » s'il n'apparaît pas encore dans le menu déroulant.
- 3.3. Entrez le code-barres du tube d'échantillon de dosage à l'aide du scanner de codes à barres (vous pouvez également entrer le code-barres manuellement). Commencez avec la position 1 du support A. Placez chacun des tubes d'échantillon de dosage dans sa position correspondante dans les supports BD MAX™ (avec bouchon septum).
- 3.4. Entrez les informations d'identification de l'échantillon/patient en scannant le code-barres ou en les entrant manuellement.
- 3.5. Vérifiez que les informations de l'échantillon ou du patient correspondent au tube de tampon d'échantillon BD MAX™ respectif dans le portoir.
- 3.6. Chargez le(s) portoir(s) dans le système BD MAX™. (Le portoir A est positionné du côté gauche de l'instrument et le portoir B du côté droit).
- 3.7. Chargez la/les cartouche(s) PCR BD MAX™.
- 3.8. Fermez la porte de l'appareil, puis sélectionnez Démarrer pour lancer l'analyse.

## Interprétation des résultats

**Points importants avant de commencer :** Pour une description plus détaillée sur la façon d'analyser les données, reportez-vous au *manuel de l'utilisateur du système BD MAX™*.

**Inspectez toujours visuellement les graphiques d'amplification pour chaque échantillon testé et vérifiez les valeurs de C<sub>T</sub> obtenues avec le logiciel.**

### 1. Résultats rapportés

Le logiciel BD MAX™ rapporte les valeurs de C<sub>T</sub> et les courbes d'amplification pour chaque cible et pour chaque échantillon analysé de la manière suivante :

- Une valeur C<sub>T</sub> de **0** indique qu'il n'y a pas de valeur C<sub>T</sub> calculée par le logiciel avec le seuil initialement spécifié (voir annexe 1). Une courbe d'échantillon affichant une valeur C<sub>T</sub> de "0" doit être examinée manuellement.
- Une valeur C<sub>T</sub> de **-1** indique qu'il n'y a pas eu d'amplification. Vérifiez l'absence de courbe d'amplification pour les échantillons ayant une valeur C<sub>T</sub> de -1 dans le tableau des résultats.
- Toutes les autres valeurs de C<sub>T</sub> doivent être interprétées en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les méthodes d'interprétation énoncées dans les tableaux 2 et 3.

### 2. Interprétation

#### 2.1 Validation des résultats

Vérifiez la validité de la série PCR avant de procéder à l'interprétation des données obtenues. Vérifiez qu'aucune défaillance du système BD MAX™ n'apparaisse. Le cas échéant, vérifiez les courbes d'amplification pour les contrôles positif et négatif. Le tableau 2 montre les critères nécessaires pour que le test Check-Direct CPE sur le système BD MAX™ soit valide. Si les valeurs de C<sub>T</sub> des contrôles s'avèrent non conformes par rapport aux résultats attendus, consultez la FAQ et le dépannage "3".

Tableau 2 : Critères pour une analyse valide du test Check-Direct CPE. (N.R. = non pertinent)

Type d'échantillon*	C <sub>T</sub> 475/520 KPC	C <sub>T</sub> 530/565 VIM	C <sub>T</sub> 585/630 OXA-48	C <sub>T</sub> 630/665 NDM	C <sub>T</sub> 680/715 SPC
Témoins positifs	32 ± 3	30 ± 3	29 ± 3	31 ± 3	N.R.
Échantillon négatif	-1	-1	-1	-1	29 ± 3

## 2.2 Interprétation des résultats

Si le test est valide, interprétez les résultats comme positifs, négatifs ou non résolus selon les valeurs de  $C_T$  obtenues pour chaque échantillon en suivant les directives résumées dans le tableau 3. Les échantillons non résolus doivent être répétés.

Les valeurs de  $C_T$  obtenues avec les suspensions de cellules bactériennes seront généralement à l'intérieur d'une gamme de  $C_T$  spécifique pour chaque cible en raison de la quantité bien définie de cellules utilisées en tant que matériel de départ pour le test. Notez cependant que les valeurs  $C_T$  peuvent différer de façon significative pour chaque souche. Le **tableau 3** indique la limite supérieure de cette gamme de  $C_T$ , une valeur de  $C_T$  plus élevée suggère une contamination de l'échantillon ou une souche non pure. Par conséquent, l'échantillon sera considéré comme étant « non résolu ».

**Tableau 3 :** Guide d'interprétation des données pour les suspension de cellules bactériennes (N.R. = non pertinent)

$C_T$ 475/520 KPC	$C_T$ 530/565 VIM	$C_T$ 585/630 OXA-48	$C_T$ 630/665 NDM	$C_T$ 680/715 SPC	Interprétation
≤33	≤27	≤26	≤32	N.R.	Positif
-1	-1	-1	-1	29 ± 3	Négatif
>33	>27	>26	>32	N.R.	Non résolu
-1	-1	-1	-1	-1	Non résolu

### NOTES IMPORTANTES :

- Si le système BD MAX™ donne un résultat indéterminé ou incomplet (IND ou INC) en raison d'une défaillance du système, contactez votre représentant local BD.

## Foire aux questions (FAQ) et dépannage

Reportez-vous à la rubrique « Dépannage » du manuel de l'utilisateur du système BD MAX™ pour toutes informations supplémentaires

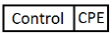








- Les résultats PCR ne montrent aucune valeur de  $C_T$  ou l'interprétation indique que l'échantillon est non résolu.** Causes possibles et dépannage :
  - La réaction PCR a été inhibée par des substances exogènes ou endogènes. Veuillez répéter l'échantillon. Si encore inhibé, une quantité plus petite d'échantillon utilisé peut améliorer les résultats.
  - L'extraction de l'ADN a échoué car le SPC n'a pas été détecté.
  - Le Master Mix BD MAX™ MMK DNA peut être expiré.
  - Problème de distribution des liquides : vérifiez les barrettes et les cartouches PCR afin de déterminer où le problème de distribution des liquides s'est produit (exemple : bulle d'air dans la cartouche) et analysez à nouveau l'échantillon. Si le problème persiste, contactez votre représentant local BD.
- Dépannage pour les résultats non résolus.**  
 Pour les résultats non résolus : répétez le test avec l'échantillon original en préparant un nouveau tube de tampon d'échantillon BD MAX™. Vous pouvez également tester un échantillon nouvellement prélevé ou utiliser une quantité inférieure d'échantillon.
- Les résultats PCR ne montrent aucune valeur de  $C_T$  pour le contrôle positif ou l'interprétation indique que l'échantillon est non résolu?**  
 Causes possibles et dépannage :
  - La solution de contrôle positif n'a pas été ajoutée.
  - Le Master Mix BD MAX™ MMK DNA peut être expiré.
  - Des bulles d'air se sont introduites dans la chambre de réaction PCR du contrôle positif.
- Les résultats PCR montrent de très faibles fluorescences pour tous les échantillons et tous les canaux de détection, y compris le signal du contrôle interne (SPC).**  
 Causes possibles et dépannage :
  - Les tubes de réactif CPE, contenant les sondes fluorescentes et les amorces, peuvent être dégradés. Vérifiez la date d'expiration et assurez-vous que les tubes de réactif CPE ont été stockés correctement.
  - Problème technique lié au système BD MAX™. Veuillez vous référer au manuel de l'utilisateur du BD MAX™ ou contactez votre représentant local BD.
- Le système BD MAX™ indique une erreur ou un échec.**  
 Reportez-vous au manuel de l'utilisateur du BD MAX™ ou contactez votre représentant local BD.
- Le même échantillon testé deux fois avec le test Check-Direct CPE ne donne pas des résultats identiques.**  
 Des valeurs de  $C_T$  incohérentes peuvent être observées lorsqu'un même échantillon est testé deux fois. De grandes variations, valeurs de  $C_T > 2$ , suggèrent des erreurs de pipetage ou autres différences entre les reprises.

## Limitations

La trousse Check-Direct CPE for BD MAX™ utilise une gamme de marqueurs d'ADN spécifiques pour la détection de la présence des gènes de carbapénémase KPC, NDM, OXA-48, et VIM, qui représentent actuellement les carbapénémases les plus répandus cliniquement. Le test détecte toutes les variantes actuellement connues de KPC, NDM, OXA-48 et VIM, sauf VIM-7, une variante rare trouvée seulement chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il convient de noter que d'autres familles de gènes de carbapénémase rares ne sont pas détectées. Le test est conçu pour être utilisé avec des cellules bactériennes isolées comme matériel de départ.

La qualité de l'ADN extrait est un facteur important pour l'obtention de résultats fiables avec la trousse Check-Direct CPE for BD MAX™. Pour les suspensions bactériennes, la densité cellulaire adéquate est un facteur important pour l'obtention de résultats fiables et la procédure décrite dans ce manuel doit être strictement respectée. Le test a été largement testé avec de l'ADN purifié à partir de bactéries à Gram-négatifs, telles que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Pseudomonas*, et à obtenu d'excellents résultats. Cependant, il ne peut être exclu que d'autres bactéries à Gram-négatifs ou d'autres souches parmi les espèces décrites ci-dessus donneront des résultats médiocres. La trousse Check-Direct CPE ne peut garantir une détection précise des gènes de carbapénémases pour toutes les espèces et sous-espèces de bactéries à Gram-négatifs ou autres types et pour tous les types d'échantillons cliniques. Dans certains cas spécifiques (par exemple pour les échantillons réglementaires), les résultats peuvent nécessiter une confirmation à l'aide de méthodologies supplémentaires. En raison de la grande variabilité des génomes bactériens, il est possible que certains sous-types ne puissent être détectés. Le test reflète l'état des connaissances des Check-Points Health B.V. La présence de plusieurs espèces bactériennes dans un même échantillon peut entraver l'interprétation du test. Comme pour tous les autres tests diagnostiques, les résultats obtenus ne peuvent être interprétés qu'en corrélation avec les données cliniques et de laboratoire complémentaires accessibles à la personne responsable. L'utilisation de ce test est limité aux personnes formées de manière adéquate et plus particulièrement sur les méthodes de biologie moléculaire.

## Explication des symboles

Symbole	Définition
	Contrôle CPE
	Pour diagnostic <i>in vitro</i>
	Numéro de catalogue
	Code du lot
	Utiliser avant AAAA-MM
	Consultez les instructions d'utilisation
	Fabricant
	Température limite
	Contenu suffisant pour <n> tests

## Assistance technique

support@check-points.com

+31 317 453 908

Malgré que le plus grand soin apporté au développement et à la préparation des protocoles, Check-Points n'assume aucune responsabilité pour les erreurs, les omissions et/ou les modifications futures présent dans ce document.

**Sources :** pour toute description lié à ce produit à des fins de publication, veuillez y faire référence sous le nom de Check-Direct CPE.

### Avis à l'acheteur :

Ce produit est vendu sous licence et propriété de PHRI et peut être utilisé uniquement selon des droits exclusifs au brevet PHRI et ce pour le diagnostic *in vitro* humain, les tests alimentaires, tests vétérinaires, ou la recherche.

Les composés colorants ou « quencher » de ce produit sont vendus sous licence de Biosearch Technologies, Inc. et protégés par les brevets américains et mondiaux soit pour l'émission ou soit pour l'application. La concession de licence couvre les marques commerciales à applications pour diagnostic *in vitro* (DIV) humain.

### Marques déposées

BD et BD MAX™ sont des marques déposées de Becton Dickinson GmbH

Check-Points Health BV  
Binnenhaven 5  
6709 PD Wageningen  
Pays-Bas

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



## Annexe 1 : création du programme Check-Direct CPE v.4.70 ou version ultérieure

**Points importants avant de commencer** : Reportez-vous au manuel d'utilisation du système BD MAX™ pour obtenir les instructions détaillées sur la façon de faire fonctionner le système BD MAX™ et la version logicielle **4.70 ou plus**.

Pour créer un nouveau test, dans l'onglet **Éditeur de test**, sélectionnez **Créer** et appliquez les instructions suivantes :

- Dans l'onglet **Informations de base**, entrez les paramètres suivants :
- **Nom du test** : *Check-Direct CPE 4*.
- **Type d'extraction** : Sélectionnez *ExK DNA-1 (Plasma / Sérum)[4-clips]*.
- **Format Master Mix** : sélectionner *Type 1: BD MMK ou MMK (SPC) et amorces et sondes séchées*
- **Paramètres d'exemple d'extraction** : sélectionnez les *paramètres par défaut*, voir le tableau A.
- **Calcul C<sub>T</sub>** : sélectionnez *Résultat C<sub>T</sub> au point d'inflexion*.

### Sauvegardez les paramètres

1. Dans l'onglet **Paramètres de PCR** entrez les paramètres suivants :
  - **Alias, Gain PCR, et seuil** : pour chaque canal, entrez les paramètres spécifiés dans le tableau B.
  - **Compensation de couleur** : saisissez les paramètres spécifiés dans le Tableau C.

### Sauvegardez les paramètres

2. Dans les **Étapes du test**, saisissez les étapes de PCR indiqué dans le tableau D.

### Sauvegardez les paramètres

**Tableau A** : paramètres d'extraction de l'échantillon.

Paramètres	Valeur
Temps de chauffage de la	10
Température de la lyse	37
Hauteur embout	1600
Volume d'échantillon	937,5
Volume de lavage	500
Volume de neutralisation	12,5
Temps de chauffage DNase	----

**Tableau B** : paramètres de gain.

Canal	Alias	Gain	Seuil
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

**Tableau C** : Paramètres de compensation des couleurs.

	Canal récepteur incorrect					
	475/520 530/565 585/630 630/665 680/715					
Canal d'excitation	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	

**Tableau D** : Paramètres du programme PCR

Nom de l'étape	Type de profil	Cycles	Temps	Temp. (°C)	Détecter
Dénaturation	Maintenir	1	600	98	NON
Amplification et détection	2 - température	45	15	98	NON
			62	60	OUI



## Annexe 2 : caractéristiques des performances

### Spécificité *in silico*

La spécificité du test de diagnostic Check-Direct CPE for BD MAX™ est assurée par la sélection d'amorces et sondes précises, ainsi que par le choix de conditions de réaction strictes. Les séquences des amorces et sondes ont été conçues pour identifier spécifiquement les variantes génétiques décrites dans le tableau ci-dessous. L'analyse *in silico* des amorces et sondes révèle une homologie des séquences de 100 % et garanti une détection fiable de chacune des variantes décrites. Des mésappariements ponctuelles avec les amorces et les sondes sont présents chez certaines variantes, mais ne devrait affecter la détection. Cela a été confirmé en comparant ces variantes avec des variantes étant homologues à 100 %.

Les amorces et sondes ont été vérifiées par rapport aux homologies possibles avec des séquences publiées dans les banques de gènes internationale en date du 1er avril 2014. (Base de données de séquence génétique GenBank®, NIH). en utilisant une analyse de comparaison des séquences. Aucune réaction croisée n'a été trouvée avec d'autres organismes pour les amorces et les sondes sélectionnées.

Gène carbapénèmase	Variants détectées
<b>KPC</b>	1-17
<b>NDM</b>	1 - 10
<b>VIM</b>	1-6 et 8-38
<b>OXA-48</b>	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247, 370

### Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de diagnostic Check-Direct CPE for BD MAX™ a été déterminée en testant la réactivité croisée avec des échantillons contenant une grande quantité d'organismes non-cibles. Un aperçu de ces souches est décrit dans le tableau ci-dessous. Une étude rétrospective a été réalisée avec 100 souches bactériennes de 9 espèces Gram négatives différentes, qui ont précédemment été identifiées comme étant positives à la carbapénèmase avec le test de diagnostic Check-MDR CT103 (Check-Points Health) de Check-Points.

Tous les isolats ont donnés des résultats négatifs avec le test Check-Direct CPE for BD MAX™ et le contrôle interne a été détectés de manière fiable dans tous les échantillons. La spécificité était de 100 % par rapport aux souches de référence testées.

Espèces	Souches testées
<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

### Inclusivité analytique

Une étude rétrospective a été réalisée avec 94 souches bactériennes de 14 espèces gram-négatives différentes. Ces souches ont précédemment été identifiées comme étant positives pour les carbapénèmes avec le test de diagnostic Check-MDR CT103 (Check-Points Health) de Check-Points. Les 94 souches bactériennes ont été détectées correctement pour les gènes carbapénémases ciblées. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous. L'inclusivité était de 100 % pour les souches testées.

Nombre de souches testées	Résultat Check-MDR CT103	Résultat Check-Direct CPE	Résultats inclusivité
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 %

### Performance clinique

La performance clinique du test Check-Direct CPE for BD MAX™ a été évaluée par un laboratoire de référence sur des isolats bactériens non sensibles aux carbapénèmes récoltés par divers centres cliniques répartis géographiquement. Au total, 450 isolats ont été sélectionnés, dont 438 *Entérobactéries* et 12 *Pseudomonas spp.* Pour référence, la présence et l'identité des gènes carbapénémases de ces isolats ont été évalués par PCR spécifique et / ou par analyse avec le test Check-MDR CT102 de Check-Points. Les isolats ont été cultivés sur des plaques d'agar MacConkey avec un disque d'ertapénème de 10 mg et traités en utilisant la procédure décrite dans ce manuel.

Par rapport à la méthode de référence, le test Check-Direct CPE a montré une sensibilité et une spécificité de 100 % et 100 % respectivement.

### Espèces et gènes de carbapénémase du panel d'isolats bactériens

Espèces	Gènes spécifiques aux EPC						
	KPC	NDM	VIM	OXA-48	NDM + OXA-48	IMP	AUCUN
<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
Autres*	5	6	9	1	0	1	1
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>24</b>

\*23 isolats comprenant *Citrobacter spp.* (N=15), *Raoultella spp.* (n=3), *Leclercia adecarboxylata* (n=2), *Serratia marcescens* (n=2) et *Kluyvera georgiana* (n=1).

### Performances globales du test Check-Direct CPE par rapport à la méthode de référence

CPE	Référence		Total	
	+	-		
BD MAX CPE	+	402	0	402
PCR	-	0	48	48
<b>Total</b>		<b>402</b>	<b>48</b>	<b>450</b>

Sensibilité : 100 %

Spécificité : 100 %

**Performance du test Check-Direct CPE par rapport à la méthode de référence pour KPC**

KPC		Référence		Total
		+	-	
BD MAX CPE	+	100	0	100
PCR	-	0	350	350
Total		100	350	450

Sensibilité : 100 %  
 Spécificité : 100 %

**Performance du test Check-Direct CPE par rapport à la méthode de référence pour OXA48**

OXA-48		Référence		Total
		+	-	
BD MAX CPE	+	102	0	102
PCR	-	0	348	348
Total		102	348	450

Sensibilité : 100 %  
 Spécificité : 100 %

**Performance du test Check-Direct CPE par rapport à la méthode de référence pour VIM**

VIM		Référence		Total
		+	-	
BD MAX CPE	+	100	0	100
PCR	-	0	350	350
Total		100	350	450

Sensibilité : 100 %  
 Spécificité : 100 %

**Performance du test Check-Direct CPE par rapport à la méthode de référence pour NDM**

NDM		Référence		Total
		+	-	
BD MAX CPE	+	102	0	102
PCR	-	0	348	348
Total		102	348	450

Sensibilité : 100 %  
 Spécificité : 100 %

**Référence :**

Findlay, J., Hopkins, K.L., Meunier, D. et Woodford, N. « Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria » (Évaluation de trois tests commerciaux pour la détection rapide des gènes codant cliniquement des carbapénèmases pertinentes dans les bactéries en culture). J. Antimicrob. Chemother. 2015 Mai ; 70 (5): 1338-1342. doi: 10.1093 / jac / dku571. Epub 27 janvier 2015