

Brukerhåndbok

Check-Direct CPE for BD MAX™

For påvisning og differensiering av karbapenemasegener fra rene kolonier av *Enterobacteriaceae*

Versjon 2.0

Utgivelsesdato: 22.01.2019

REF 18-0082  24

CE **IVD**

Innhold

Bruksområde.....	2
Introduksjon og prinsippet for metoden	2
Kit innhold (for 24 reaksjoner)	2
Nødvendige materialer som ikke følger med kitet	2
Oppbevaring og holdbarhet	2
Advarsler og forsiktighetsregler	3
Bruksanvisning	4
Prosedyrer for klargjøring av prøver	4
Bruk av BD MAX™	4
Tolkning av resultater	5
Vanlige spørsmål og feilsøking	7
Begrensninger	8
Forklaringer av symboler som brukes.....	8
Teknisk assistanse	8
Vedlegg 1: Opprette Check-Direct CPE-test i programmet v.4.70 eller høyere.....	9
Vedlegg 2: Testegenskaper	10

Bruksområde

Check-Direct CPE for BD MAX™ er en kvalitativ *in vitro* diagnostisk test for rask påvisning av karbapenemasegener i *Enterobacteriaceae*. Testen er beregnet på å brukes på bakterier dyrket fra kliniske prøver. Check-Direct CPE påviser tilstedeværelsen av karbapenemasegenene KPC, NDM, VIM og OXA-48, som på nåværende tidspunkt er den primære årsaken til karbapenemaseproduksjon i *Enterobacteriaceae*. Analysen bruker BD MAX™-systemet for ekstraksjon av DNA og påfølgende sanntids PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universelle reagenser og forbruksmaterieell for BD MAX™-systemet. Check-Direct CPE for BD MAX™ kan anvendes som et hjelpemiddel for å identifisere, forebygge og kontrollere karbapenemaseproduserende *Enterobacteriaceae* som koloniserer hos pasienter, i helseinstitusjoner. Check-Direct CPE for BD MAX™ er ikke beregnet på å diagnostisere infeksjoner med karbapenemaseproduserende *Enterobacteriaceae*, og heller ikke på å veilede eller overvåke behandling av slike infeksjoner. Parallell dyrkning av kulturer er nødvendige for epidemiologisk typebestemmelse, resistenstesting og for ytterligere bekreftende identifikasjon.

Introduksjon og prinsippet for metoden

Den økende forekomsten og spredningen av karbapenemresistens blant *Enterobacteriaceae* på verdensbasis er en alvorlig trussel mot folkehelsen. Disse organismene er assosiert med høy dødelighet og har potensialet til å spre seg raskt. Hovedårsaken til karbapenemresistens hos *Enterobacteriaceae* er produksjon av karbapenemaser, dvs. karbapenemaseproduserende *Enterobacteriaceae* eller CPE. CPE har forhøyet eller fullstendig resistens mot karbapenemer og de fleste andre β -laktam-antibiotika. På nåværende tidspunkt assosieres de fleste CPE med tilstedeværelse av én av de følgende plasmidkodete karbapenemasene: KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemase), VIM (Verona integron-kodet metallo- β -laktamase), NDM (New Delhi metallo- β -laktamase) eller OXA-48 (Oxacillinase-48). I tillegg har CPE ofte andre ikke- β -laktam-resistensdeterminanter som resulterer i multiresistente eller utvidet multiresistente isolater

Check-Direct CPE er en sanntids PCR-multipleksanalyse for deteksjon av KPC-, OXA-48-, NDM- og VIM-karbapenemasegener. Analysen er basert på spesifikk deteksjon og amplifikasjon av målsekvenser med PCR, samt påviser oppformeringen PCRprodukt ved hjelp av fluorescerende DNA-prober. Det eksisterer mange genvarianter av KPC, VIM, OXA-48 og NDM og Check-Direct CPE har blitt utviklet for å kunne detektere alle variantene. Check-Direct CPE for BD MAX™ benytter fem ulike fluorescerende prober. Det gjør det mulig å påvise og skille mellom de fire ulike karbapenemasegenene, samt prøvebehandlings kontrollen, SPC.

Kit innhold (for 24 reaksjoner)

Komponenter (mat. nr.)	Beskrivelse
CPE-reagensrør (9-0062)	24 forseglede rør (lilla forsegling)
CPE-positiv kontroll (9-0060)	1 rør (lilla hette) 100 μ l
Brukerhåndbok (9-0079)	Pakningsvedlegg – last ned fra hjemmesiden

Nødvendige materialer som ikke følger med kitet

Forbruksartikler	Utstyr
<ul style="list-style-type: none"> BD MAX™ ExK DNA-1 Extraction Kit (ref.nr.: 442818) BD MAX™ DNA MMK Master Mix (ref.nr.: 442848) BD MAX™ PCR Cartridges (ref.nr.: 437519) Laboratoriehandsker (pudderfrie) / laboratoriefrakk til engangsbruk Pipetter og engangsspisser (filterspisser) for volumer på 10 til 1000 μl Saltløsning (150 mM NaCl eller 0,9 % w/v NaCl) Milli-Q-vann eller aqua bidest 	<ul style="list-style-type: none"> Sanntids PCR-instrument: BD MAX™ System, programvareversjon 4.70 eller nyere Densitometer som er egnet for bakteriesuspensjoner Vorteksmikser

Oppbevaring og holdbarhet

Check-Direct CPE for BD MAX™-analysekomponentene oppbevares ved 2 til 25 °C frem til den oppgitte utløpsdatoen. Ikke bruk komponenter etter utløpsdatoen.

Check-Direct CPE for BD MAX™-reagensrørene og den positive kontrollen leveres i en forseglet pose. Forsegl posen igjen umiddelbart etter åpning for å beskytte reagensene mot fuktighet. Reagensrørene er holdbare i opptil 14 dager ved 2 til 25 °C etter første åpning.

Advarsler og forsiktighetsregler

- Check-Direct CPE for BD MAX™-analyse er beregnet på *in vitro*-diagnostisk bruk.
- Dette produktet kan kun brukes på BD MAX™ System.
- Ikke bruk kitet hvis etiketten som forsegler ytterkartongen er skadet.
- Du må ikke bruke reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller skadet ved levering.
- Lukk posene som beskytter reagensene raskt med glidelåslukningen etter hver gangs bruk. Fjern eventuell overflødig luft fra posene før forsegling.
- Kontroller at reagensstrimlene har korrekte væsknivåer (påse at væskene er på bunnen av rørene).
- Kontroller at reagensstrimlene har alle pipettespissene på plass.
- Ikke fjern tørkemiddel fra reagensposene.
- Ikke bruk reagensene hvis tørkemiddelposen ikke er til stede eller er skadet inne i reagensposene.
- Du må ikke bruke reagenser hvis folien er brutt eller skadet.
- Ikke bland reagenser fra ulike poser og/eller kit og/eller lot.
- Du må ikke bytte om på eller gjenbruke lokk da det kan oppstå kontaminering som forstyrrer testresultatene.
- Gå frem med varsomhet når du bruker kjemiske løsninger, da lesbarheten til strekkoder på Master Mix- og ekstraksjonsrøret kan bli endret.
- Ikke bruk utgåtte reagenser og/eller materialer.
- God laboratorieteknikk er avgjørende for korrekt utføring av analysen. Grunnet høy analytisk sensitivitet må analysen utføres med nøyaktighet for å unngå kontaminering av prøvematerialer og reagenser.
- For å unngå kontaminering fra PCR produkt må du ikke brette i stykker BD MAX™ PCR kortet etter bruk. Forseglingene på BD MAX™ PCR kortene er laget for å hindre kontaminasjon.
- Ved bruk av Check-Direct CPE for BD MAX™-analysen etter den anbefalte holdbarheten, kan resultatene være ugyldige. Analyser som utføres utenfor angitt holdbarhet skal repeteres med ny prøve.
- Ytterligere kontroller kan testes i samsvar med retningslinjer eller krav i lokale, statlige og/eller kommunale forskrifter eller fra akkrediteringsmyndigheter.
- I laboratorier hvor det utføres dyrkning eller andre PCR analyser må en være forsiktig så det ikke skjer kontaminering av Check-Direct CPE for BD MAX™-analysekomponentene, og BD MAX™ Systemet. Unngå alltid kontaminasjon av reagenser med mikrober og deoksyribonuklease (DNase). Hansker må skiftes før håndtering av reagenser og utstyr.
- Håndter alltid prøver som om de var smittebærende, og i samsvar med sikkerhetsprosedyrer for laboratorier som er beskrevet i CLSI-dokument M2911 og i Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.
- Bruk beskyttelsesklær og engangshansker når du håndterer alle reagenser.
- Vask hendene godt etter at testen er utført.
- Du må ikke røyke, drikke, tygge eller spise i områder der prøver eller kitreagenser håndteres.
- Kast ubrukte reagenser og avfall i samsvar med lokale eller nasjonale bestemmelser.
- Se BD MAX™ System Brukerhåndbok for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.

Les hele protokollen før du starter testen

Bruksanvisning

Prosedyrer for klargjøring av prøver

Testklargjøring for bakterier fra kultur

1. Så ut prøvemateriale eller bakteriestammene som skal testes, og inkuber over natten ved 37 °C. Vanlige vekstmedier inkluderer blodagar, MacConkey-agar og tryptisk soyaagar.
2. Klargjør en bakteriesuspensjon i en saltløsning på 0,5 – 1,0 McFarland ($\approx 1 - 2 \times 10^8$ CFU/mL) fra én eller flere kolonier fra hver av platene ved hjelp av en øse på 1 eller 10 µL.
3. Pipetter 10 µL av bakteriecellesuspensjonen ($\approx 1 - 2 \times 10^6$ CFU/mL) og 500 µL Milli-Q-vann eller dest. vann i ett DNA-prøvebufferrør SB-1 (leveres av BD med DNA-ekstraksjonskitet, se *Nødvendige materialer som ikke følger med kitet*).
4. Lukk prøvebufferrøret med et septumlukk, og vortex i 10 sekunder ved lav hastighet.
5. Flytt prøvebufferrørene med bakteriecellesuspensjonene som skal analyseres, til PCR-rommet.

Klargjøring av kontroller

Valider kjøringen ved å utføre positive og negative kontrollreaksjoner for hver Check-Direct CPE PCR-kjøring. Den positive kontrollen leveres med kitet.

- **Positiv kontroll:**
Pipetter 10 µL av den positive kontrollen og 500 µL Milli-Q-vann eller dest. vann i ett prøvebufferrør. Vortex i 10 sekunder.
- **Negativ kontroll:**
Pipetter 500 µL Milli-Q-vann eller dest. vann i ett prøvebufferrør. Vortex i 10 sekunder.

Bruk av BD MAX™

1. Sanntids PCR-multipleksoppsett

Tabell 1 viser sanntids PCR-multipleksoppsett med målene påvist i hver detektorkanal på BD MAX™ System.

Tabell 1: qPCR-multipleksoppsett

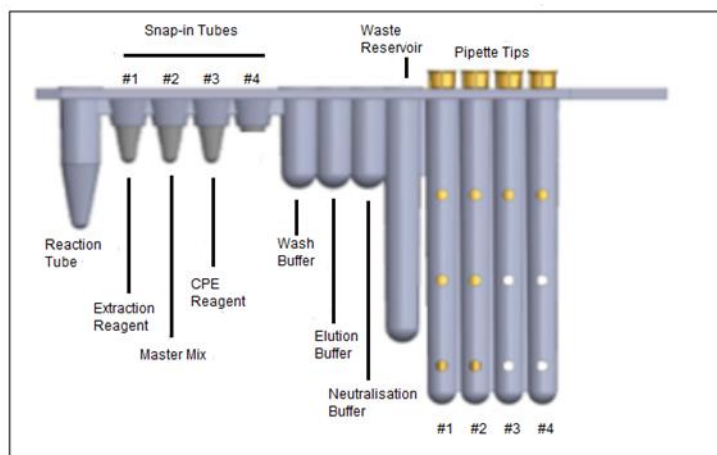
Detektor	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Kanal	1	2	3	4	5
Mål	KPC	VIM	OXA-48	NDM	SPC*

*SPC: Prøvebehandlingskontroll

Når testen utføres for første gang opprettes PCR-testprogrammet "Check-Direct CPE 4" som er beskrevet i vedlegg 1.

2. BD MAX™-stativoppsett

- 2.1. Fyll BD MAX™-systemstativene med det antallet DNA-reagensstrimler som samsvarer med r antall prøver som skal testes. Bank lett på hver strimmel for å sikre at alle væsker er på bunnen av den tilhørende beholderen.
- 2.2. Klargjørreagensstrimler:
 - 2.2.a. Klikk på plass et BD Exk-1-reagensrør for DNA-ekstraksjon (hvit forsegling) i posisjon 1 på DNA-strimmelen, se figur 1.
 - 2.2.b. Klikk på plass et DNA MMK Master Mix-rør (grønn/gul forsegling) i posisjon 2 på DNA-strimmelen, se figur 1.
 - 2.2.c. Klikk på plass et CPE-reagensrør (blå/lilla forsegling) i posisjon 3 på DNA-strimmelen, se figur 1.



Figur 1: Oppsett av DNA-reagensstrimmel.

3. Oppsett av BD MAX™-instrumentet

- 3.1 Åpne **Run** (Kjør)-fanen i BD MAX™ System **software v4.70** (programvare v4.30B) eller nyere, og fyll ut **Worklist** (Arbeidsliste).
- 3.2 Velg **Test "Check-Direct CPE 4"**. Se Vedlegg 1 for å opprette "Check-Direct CPE 4"-testen hvis den ikke finnes i Testmenyen.
- 3.3 Legg inn **Sample Buffer Tube** (Prøvebufferrør)-strekkoden ved hjelp av strekkodeleseren (du kan også legge inn strekkoden manuelt). Start med posisjon 1 i stativ A. Plasser hvert av prøvebufferrørene i den tilsvarende posisjonen i BD MAX™-stativene (med septumlokk).
- 3.4 Angi prøve- eller pasientidentifikasjonsinformasjonen i **Accession** (Aksesjon)-boksen. Kontroller at hver prøve- eller pasientinformasjonsoppføring tilsvarer det tilhørende spesifikke prøvebufferrøret i stativet.
- 3.5 Sett stativet/stativene i BD MAX™ System. (Stativ A er plassert på venstre side av instrumentet og stativ B på høyre side.)
- 3.6 Sett inn BD MAX™ PCR kortet/kortene.
- 3.7 Lukk instrumentdøren og velg **Start Run** (Start kjøring).

Tolkning av resultater

Viktige punkter før du starter: Hvis du vil ha en detaljert beskrivelse av hvordan data skal analyseres, se *BD MAX™ System Brukerhåndbok*.

Sammenlign alltid amplifikasjonskurven visuelt for hver prøve som har blitt testet med C_T-verdiene oppnådd med programvaren.

1. Rapporterte resultater

BD MAX™-programvaren rapporterer C_T-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En C_T-verdi på **0** angir at det ikke ble beregnet noen C_T-verdi av programvaren med den angitte terskelen (se Vedlegg 1). En amplifikasjonskurve som viser en C_T-verdi på "0", må kontrolleres manuelt.
- En C_T-verdi på **-1** indikerer at ingen gyldig amplifikasjonsprosess har funnet sted. Kontroller at det ikke er noen amplifikasjonskurver med en C_T-verdi på -1 i de grafiske resultatene.
- Alle andre eventuelle C_T-verdier må tolkes i samsvar med amplifikasjonskurven og i henhold til tolkningsmetoden som oppgis i tabell 2 og 3.

2. Tolkning

2.1 Kjøringsvalidering

Kontroller at sanntids PCR-kjøringen er gyldig før tolkning av data resultatene. Kontroller at det ikke er noen rapport om feil med BD MAX™ Systemet. Hvis det er aktuelt, sjekker du de positive og negative kontrollenes amplifikasjonskurver. Tabell 2 viser kriterier for en gyldig Check-Direct CPE-sanntidskjøring på BD MAX™ System. Hvis kontrollenes C_T-verdier ikke er som forventet, se Vanlige spørsmål og problemløsning "3".

Tabell 2: Kriterier for en gyldig kjøring med Check-Direct CPE-test. (N.R. = ikke relevant)

Prøvetype*	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
Positive kontroller	32 ± 3	30 ± 3	29 ± 3	31 ± 3	N.R.
Negativ prøve	-1	-1	-1	-1	29 ± 3

2.2 Tolkning av resultater

Hvis kjøringen ergodkjent, tolker du resultatene som positive, negative eller uavklart med C_T-verdiene som ble oppnådd for prøvene etter retningslinjene som er oppsummert i tabell 3. Uavklarte kjøringer må testes på nytt.

C_T-verdier som oppnås med bakteriecellervil generelt være i et bestemt C_T-vindu for hvert mål på grunn av den veldefinerte mengden av celler som anvendes som inputmateriale for testen. Merk imidlertid at C_T-verdiene kan variere betydelig mellom de enkelte stammene. **Tabell 3** angir den øvre grensen for dette C_T-vinduet. En høyere C_T-verdi antyder kontaminering av prøven eller en stamme som ikke er ren. Dette blir derfor ansett som et "uavklart"-resultat.

Tabell 3: Retningslinjer for tolkning av data for bakterieceller (N.R. = ikke relevant)

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	Tolkning
≤33	≤27	≤26	≤32	N.R.	Positiv
-1	-1	-1	-1	29 ± 3	Negativ
> 33	>27	>26	>32	N.R.	Uavklart
-1	-1	-1	-1	-1	Uavklart

VIKTIGE MERKNADER:

- Hvis BD MAX™-systemet gir resultatet "ubestemt" eller "ufullstendig" (IND eller INC) på grunn av feil ved BD MAX™ System, må du kontakte din lokale BD-representant.

Vanlige spørsmål og feilsøking

Refererer til «feilsøking» i BD MAX™ System Brukerhåndbok for mer informasjon.

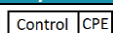








- Sanntidsresultater viser ingen C_T-verdier, eller tolkning angir at prøven er uavklart.** Mulige årsaker og feilsøking:
 - PCR-reaksjonen har blitt hemmet av eksogene eller endogene stoffer. Gjenta analysen. Dersom reaksjonen fremdeles er hemmet kan en lavere mengde inputprøve forbedre resultatene.
 - DNA-ekstraksjon mislyktes, siden SPC ikke ble påvist.
 - BD DNA MMK kan ha utløpt.
 - Det har oppstått en feil med væskehåndtering: kontroller reagensstrimler og PCR-kortet for sjekke hvor væskehåndteringsproblemet kan ha oppstått (eksempel: luftboble i kortet), og kjør prøven på nytt. Hvis problemet vedvarer, tar du kontakt med din lokale BD-representant.
- Feilsøking for uavklarte resultater.**
 For uavklarte resultater: Gjenta testen med den opprinnelige prøven ved å klargjøre et nytt prøvebufferrør. Alternativt kan du teste en nyinnsalmet prøve eller bruke mindre prøvemateriale.
- Sanntidsresultater viser ingen C_T-verdier for den positive kontrollen, eller tolkning indikerer at prøven er uavklart.**
 Mulige årsaker og feilsøking:
 - Den positive kontrolløsningen ble ikke tilsatt.
 - BD DNA MMK kan ha utløpt.
 - Forekomst av luftbobler i PCR-reaksjonskammeret til den positive kontrollen.
- Sanntidsresultatene viser svært lave fluorescenssignaler i alle prøver og detektorkanaler, inkludert SPC-signalet.**
 Mulige årsaker og feilsøking:
 - CPE-reagensrørene som inneholder de fluorescerende probene og primerne kan være degradert. Kontroller utløpsdatoen og forsikre deg om at CPE-rørene har blitt oppbevart på riktig måte.
 - BD MAX™ System kan være ansvarlig for disse resultatene. Se BD MAX™ Brukerhåndbok, eller kontakt din lokale BD-representant.
- BD MAX™ System oppgir en feil eller svikt.**
 Se brukerhåndboken for BD MAX™-instrumentet eller ta kontakt med din lokale BD-representant.
- Duplikate prøver testet med Check-Direct CPE-testen gir ikke identiske resultater.**
 C_T-verdier av identiske prøver kan variere mellom de enkelte reaksjonene. Store variasjoner, > 2 C_T-verdier, tyder på feil med pipetteringsutstyr eller andreulikheter mellom de duplikate prøvene.

Begrensninger

Check-Direct CPE benytter et utvalg av spesifikke DNA-markører for å påvise tilstedeværelsen av karbapenemasegenene KPC, NDM, OXA-48 og VIM, som representerer de mest kliniske karbapenemasene. Testen påviser alle kjente varianter av KPC, NDM, OXA-48 og VIM, med unntak av VIM-7, en sjelden variant som bare finnes i *Pseudomonas aeruginosa*. Det påpekes at andre sjeldne karbapenemasegenfamilier ikke blir påvist. Testen er beregnet til å brukes på rendyrkede bakteriekulturer som inputmateriale.

Kvaliteten av input-DNA er en viktig faktor for å oppnå pålitelige resultater med Check-Direct CPE. For å oppnå pålitelige resultater er riktig konsentrasjon på celsesuspensjonen en viktig faktor. Prosedyren som er beskrevet i denne håndboken må følges strengt. Analysen har blitt grundig testet med rensed DNA fra gram-negative bakterier som *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* og *Pseudomonas* med svært gode resultater. Det kan imidlertid ikke utelukkes at andre gram-negative bakterier eller visse stammer av de ovennevnte artene vil kunne gi dårligere resultater. Check-Direct CPE kan ikke og garanterer heller ikke for korrekt påvise karbapenemasegenene i alle gram-negative arter/underarter/typer eller i alle kliniske prøver. Ved noen spesifikke tilfeller må resultatene verifiseres med supplerende metoder. Grunnet høy genvariasjon er det mulig at visse subtyper ikke kan påvises. Testen gjenspeiler det nåværende kunnskapsnivået hos Check-Points Health B.V. Tilstedeværelsen av flere bakteriearter i en prøve kan påvirke resultatene i testen. Som med andre diagnostiske analyser må resultatene av denne testen vurderes sammen med ytterligere laboratoriedata og kliniske opplysninger. Bruk av denne analysen er begrenset til kvalifisert personell som er godt opplært i DNA-baserte molekylære deteksjonsmetoder.

Forklaringer av symboler som brukes

Symbol	Definisjon
	CPE-kontroll
	Til <i>in vitro</i> -diagnostisk bruk
	Katalognummer
	Lotnummer
	Brukes innen ÅÅÅÅ-MM
	Se bruksanvisningene
	Produsent
	Temperaturbegrensning
	Inneholder tilstrekkelig for < n > tester

Teknisk assistanse

support@check-points.com

+31 317 453 908

Til tross for protokollen ble utviklet og utarbeidet med den største nøyaktighet, kan Check-Points ikke ta ansvar for feil, mangler og/eller fremtidige endringer i dette dokumentet.

Litteratursiter: Når du beskriver en prosedyre for publisering ved bruk av dette produktet, skal du henvise til den som *Check-Direct CPE*.

Merknad til kjøper:

Dette produktet selges på lisens fra PHRI Properties og kan brukes under PHRI Properties-patentrettigheter kun for human *in vitro*-diagnostikk, mattesting, veterinærtesting og forskning.

Farge- og slukkerforbindelsene i dette produktet selges på lisens fra Biosearch Technologies, Inc. og er beskyttet av amerikanske og verdensomspennende patenter som enten er utstedt eller under søknadsbehandling. Lisenstillingen dekker bruksområder innen human *in vitro*-diagnostikk (IVD).

Varemerker

BD og BD MAX™ er varemerker tilhørende Becton Dickinson GmbH

Check-Points Health BV
 Binnenhaven 5
 6709 PD Wageningen
 Nederland

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



Vedlegg 1: Opprette Check-Direct CPE-test i programmet v.4.70 eller høyere

Viktige punkter før du starter: Se håndboken for BD MAX™ System for detaljerte instruksjoner om hvordan du bruker BD MAX™ System og programvareversjon **4.70 eller nyere**.

Når du vil opprette en ny test, går du til **Test Editor** (Testredigering)-fanen, velger **Create** (Opprett), og følger følgende instruksjoner:

1. I **Basic Information** (Grunnleggende informasjon)-fanen angir du følgende parametere:

- **Test Name** (Testnavn): *Check-Direct CPE 4*.
- **Extraction Type** (Ekstraksjonstype): velg *Exk DNA-1 (Plasma/Serum)[4-snap]*.
- **Master Mix Format**: velg *Type 1: BD MMK or MMK(SPC) and Dried Primers & Probes* (Type 1: BD MMK eller MMK(SPC) og tørkede primere og prober)
- **Sample Extraction Parameters** (Prøveekstraksjonsparametere): velg *Default settings* (Standardinnstillinger). Se tabell A.
- **C_T Calculation** (CT-beregning): velg *Call C_T at inflection point* (CT ved infleksjonspunkt).

Save parameters (Lagre parameterne)

2. I **PCR Settings** (PCR-innstillinger)-fanen angir du følgende parametere:

- **Alias, PCR Gain, and Threshold** (Alias, PCR-forsterkning og terskel): for hver kanal angir du de korrekte parametere angitt i tabell B.
- **Color compensation** (Fargekompensering): angi korrekte parametere angitt i tabell C.

Save parameters (Lagre parameterne)

3. I **Test Steps** (Testtrinn) angir du PCR-trinnene som angitt i tabell D.

Save parameters (Lagre parameterne)

Tabell A: Sample Extraction Parameters (Prøveekstraksjonsparametere).

Parametere	Verdi
Lysis Heat Time (Lyseringsoppvarmingstid)	10
Lysis Temperature (Lyseringstemperatur)	37
Sample Tip Height (Prøvespisshøyde)	1600
Sample Volume (Prøvevolum)	937,5
Wash Volume (Vaskevolum)	500
Neutralization Volume (Nøytraliseringsvolum)	12,5
DNase Heat Time (DNase-oppvarmingstid)	----

Tabell B: Gain parameters (Forsterkningsparametere).

Detector (Detektor)	Alias	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)
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

Tabell C: Spectral cross-talk parameters (Parametere for spektral påvirkning)

	False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)					
	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715	
Excitation Channel (Eksiteringskanal)	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	

Tabell D: Test PCR Steps parameters (Testparametere for PCR-trinn).

Step Name (Trinnavn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid(sek))	Temp(°C)	Detect (Påvis)
Denaturation (Denaturering)	Hold (Vent)	1	600	98	NEI
Amplification & Detection (Amplifikasjon og påvisning)	2 - temperature (2 – temperatur)	45	15	98	NEI
			62	60	JA

Vedlegg 2: Testegenskaper

In silico-spesifisitet

Spesifisiteten av Check-Direct CPE for BD MAX™ sanntidsdiagnostisk test oppnåes ved valg av riktige primere og prober, samt korrekte reaksjonsbetingelser. Primer- og probesekvenser ble spesialdesignet for å identifisere genvariantene som er oppført i tabellen nedenfor. En 100 %-sekvensmatch med primere og prober etter *in silico*-analyse, ble antatt å garantere pålitelig påvisning av hver av de viste variantene.

For noen av variantene finnes det enkelttilfeller hvor det mangler samsvar mellom primere og prober, men det vil ikke svekke påvisningen. Dette ble bekreftet ved å teste slike varianter med varianter som var 100 % homologe.

Ved hjelp av sekvenssammenligningsanalyse ble primer- og probesekvenser testet for potensielle homologer med gener fra andre organismer. Blant alle gensekvenser som var til stede i den internasjonale genbanken per 1. april 2014 (GenBank, NIH genetisk sekvensdatabase), var det ingen krysshomologi med andre organismer for de utvalgte primerne og probene.

Karbapenemasegen	Påviste varianter
KPC	1 – 17
NDM	1 – 10
VIM	1 – 6 og 8 – 38
OXA-48	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247, 370

Analytisk spesifisitet

Den analytiske spesifisiteten av Check-Direct CPE for BD MAX™ diagnostisk sanntidstest ble bestemt ved testing av kryssreaktivitet med prøver som inneholdt en høy mengde av ikke-målorganismer. En oversikt over disse stammene finnes i tabellen nedenfor. Det ble utført en retrospektiv studie med 100 bakteriestammer av 9 forskjellige gram-negative arter, som tidligere ble typebestemt med den diagnostiske Check-Points-mikroarraytesten Check-MDR CT103 (Check-Points Health).

Alle isolater testet negativt med Check-Direct CPE for BD MAX™ Assay-analysen, og den interne kontrollen ble påvist i alle prøver. Spesifisiteten var 100 % basert på referansestammene som ble testet.

Arter	Testede stammer
<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

Analytisk inklusivitet

Det ble utført en retrospektiv studie med 94 bakteriestammer, av 14 forskjellige gram-negative arter, som tidligere ble identifisert som karbapenemasepositive med den diagnostiske Check-Points-mikroarraytesten Check-MDR CT103 (Check-Points Health). Alle de 94 bakteriestammene ble typebestemt korrekt for karbapenemasemålgene. Resultatene er vist i tabellen nedenfor. Den analytiske inklusiviteten var 100 % for de testede stammene.

Antallet testede stammer	Check-MDR CT103-resultat	Check-Direct CPE-resultat	Resultater for inklusjonsevne
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 %

Klinisk ytelse

Den kliniske ytelsen av Check-Direct CPE for BD MAX™-analysen ble evaluert i et sentralt referanselaboratorium ved hjelp av ikke-følsomme karbapenembakterieisolater innsendt fra ulike, geografisk spredte, kliniske sentre. Totalt 450 isolater ble inkludert, og omfattet 438 Enterobacteriaceae og 12 Pseudomonas spp. Forreferanse ble tilstedeværelsen og identifikasjonen til karbapenemasegener i disse isolatene påvist ved genspesifikk PCR og/eller analyse med Check-Points Check-MDR CT102-analysen. Isolatene ble dyrket på MacConkey-agarplater med en 10 mg ertapenemskive og ble behandlet i henhold til prosedyren som er beskrevet i denne håndboken.

I forhold til referansemetoden hadde Check-Direct CPE-analysen en sensitivitet og en spesifisitet på henholdsvis 100 % og 100 %.

Arter og karbapenemasegener i panelet med bakterieisolatene

Arter	CPE-spesifikke gener						
	KPC	NDM	VIM	OXA-48	NDM + OXA-48	IMP	INGEN
<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
<i>Andre*</i>	5	6	9	1	0	1	1
Totalt	100	100	100	100	2	24	24

*23 isolater som inneholdt Citrobacter spp. (n = 15), Raoultella spp. (n = 3), Leclercia adecarboxylata (n = 2), Serratia marcescens (n = 2) og Kluyvera georgiana (n=1).

Samlet Check-Direct CPE-ytelse versus referansemetode

CPE		Referanse		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	402	0	402
	-	0	48	48
Totalt		402	48	450

Sensitivitet: 100 %

Spesifisitet: 100 %

Check-Direct CPE-ytelse versus referansemetode for KPC

KPC		Referanse		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	100	0	100
	-	0	350	350
Totalt		100	350	450

Sensitivitet: 100 %
 Spesifisitet: 100 %

Check-Direct CPE-ytelse versus referansemetode for OXA48

OXA-48		Referanse		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	102	0	102
	-	0	348	348
Totalt		102	348	450

Sensitivitet: 100 %
 Spesifisitet: 100 %

Check-Direct CPE-ytelse versus referansemetode for VIM

VIM		Referanse		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	100	0	100
	-	0	350	350
Totalt		100	350	450

Sensitivitet: 100 %
 Spesifisitet: 100 %

Check-Direct CPE-ytelse versus referansemetode for NDM

NDM		Referanse		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	102	0	102
	-	0	348	348
Totalt		102	348	450

Sensitivitet: 100 %
 Spesifisitet: 100 %

Referanse:

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