

# Brugervejledning

## Check-Direct CPE Screen for BD MAX™

Til påvisning og differentiering af carbapenemase-gener fra *Enterobacteriaceae* i rektale podninger

Version 1.5

Udgivelsesdato: 20.07.2017

REF

18-0051



24

CE IVD

### Indhold

Tilsigtet brug .....	2
Indledning og princippet i metoden .....	2
Kittets indhold (til 24 reaktioner) .....	2
Nødvendige materialer, der ikke følger med kittet .....	2
Opbevaring og stabilitet .....	2
Advarsler og forholdsregler .....	3
Brugsanvisning .....	4
Procedurer for klargøring af prøver .....	4
BD MAX™-betjening .....	4
Tolkning af resultater .....	5
Ofte stillede spørgsmål (FAQ) og fejlfinding .....	6
Begrænsninger .....	7
Vigtige symboler, som anvendes .....	7
Teknisk assistance .....	7
Appendiks 1: Oprettelse af Check-Direct CPE Screen testprogrammet v.4.30B eller nyere .....	8
Appendiks 2: Testegenskaber .....	9

## Tilsigtet brug

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ er en kvalitativ *in vitro*-diagnostisk test til hurtig påvisning og differentiering af carbapenemase-gener fra *Enterobacteriaceae* i rektale podninger. Check-Direct CPE Screen påviser tilstedeværelsen af carbapenemase-generne KPC, NDM, VIM og OXA-48, på nuværende tidspunkt den primære årsag til carbapenemase-produktion i *Enterobacteriaceae*. Analyserne bruger BD MAX™-systemet til ekstraktion af DNA og efterfølgende PCR i realtid, der anvender de vedlagte reagenser kombineret med universale reagenser og engangsartikler til BD MAX™-systemet. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ kan anvendes som en hjælp til at identificere, forhindre og styre carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae*, som koloniserer patienter i hospitalsmiljøer. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ er hverken beregnet til diagnosticering af infektioner med carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* eller til vejledning eller overvågning af behandling for disse infektioner. Parallelle dyrkninger er nødvendige for at regenerere organismer til epidemiologisk typebestemmelse, følsomhedstestning og yderligere bekræftende identificering.

## Indledning og princippet i metoden

Den globale fremkomst og spredning af carbapenem-resistens blandt *Enterobacteriaceae* er en alvorlig trussel mod den almene sundhed. Disse organismer er forbundet med høj dødelighed og kan spredes bredt. Den mest almindelige årsag til carbapenem-resistens i *Enterobacteriaceae* er udtrykket for carbapenemasser, dvs. carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* eller CPE. CPE har forhøjet eller fuldstændig resistens over for carbapenemer og de fleste andre  $\beta$ -laktam-antibiotika. For øjeblikket er størstedelen af CPE forbundet med tilstedeværelsen af én af følgende plasmid-kodede carbapenemasser: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), VIM (Verona integron-kodet metallo- $\beta$ -lactamase), NDM (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase) eller OXA-48 (Oxacillinase-48- og OXA-48-lignende varianter). Derudover har CPE ofte andre ikke- $\beta$ -laktam-resistensdeterminanter, som resulterer i multi- og panresistente isolater.

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ er en multiplex-PCR-analyse i realtid til påvisning af KPC-, OXA-48-, NDM- og VIM-carbapenemase-gener. Analysen er baseret på specifik genkendelse og amplifikation af fokussekvenser via PCR og den samtidige påvisning af ophobningen af PCR-amplifikationsprodukter via fluorescens-DNA-prober. Der findes mange genvarianter for KPC, VIM, OXA-48 og NDM, og Check-Direct CPE Screen er udviklet til pålidelig påvisning af de fleste af varianterne. De varianter, der påvises og forventes at blive påvist for hvert resistensgen, er vist i *in silico*-specificitetsafsnittet i Appendiks 2. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ anvender fem forskellige fluorescensprober og giver mulighed for påvisning af og skelnen mellem de fire carbapenemase-gener og det SPC-kontrolmål, der overvåger DNA-ekstraktion og PCR-amplifikation.

## Kittets indhold (til 24 reaktioner)

Komponenter (mat.- nr.)	Beskrivelse
CPE Screen-reagensrør (9-0121)	24 forseglede rør (blå forsegling)
CPE-positiv kontrol (9-0061)	1 rør (violet hætte) 100 $\mu$ l
CP Mastermix (CP-mastermix) (9-0122)	1 rør (grøn hætte) 330 $\mu$ L
Brugervejledning (9-0124)	Folder – hentes fra webstedet

## Nødvendige materialer, der ikke følger med kittet

Tilbehør	Udstyr
<ul style="list-style-type: none"> <li>BD MAX™ ExK DNA-1 Extraction Kit (Ref:442818)</li> <li>BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)</li> <li>Laboratoriehandsker til engangsbrug (pudderfrie)</li> <li>Pipetter og engangspipettespidser (med filter) til mængder på 10 og 25 <math>\mu</math>L</li> <li>PCR-vand (f.eks. Milli-Q eller aqua bidest)</li> <li>Poddepinde og transportmedier, som er kompatible med rektal prøveindsamling. Anbefalet prøvetagningsanordning: Copan ESwab, kat.-nr. 480CE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR-instrument i realtid: BD MAX™ System, softwareversion 4.30B eller nyere</li> <li>Vortexmixer</li> </ul>

## Opbevaring og stabilitet

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-kittet leveres ved omgivende temperatur, skal opbevares i mørke og ved 2 til 8 °C efter modtagelsen. Reagenser er stabile ved 2 til 8 °C indtil den angivne udløbsdato. Anvend ikke komponenter, der er for gamle.

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-reagensrør, PCR Mastermix og positiv kontrol leveres i en forseglet pose. Reagenserne skal forsegles i posen igen umiddelbart efter åbning for at beskytte dem mod fugt. Reagensrør er stabile i op til 14 dage ved 2 til 8 °C efter første åbning og genforsegling af posen.

## Advarsler og forholdsregler

- Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen er beregnet til *in vitro*-diagnostik.
- Dette produkt kan kun bruges i BD MAX™-systemet.
- Kittet må ikke bruges, hvis mærkaten, der forsejler den ydre emballage, er brudt.
- Reagenser må ikke bruges, hvis de beskyttende poser er åbne eller defekte ved modtagelse.
- De beskyttende poser med reagenser skal straks lukkes til med lynlåsen efter hver brug. Fjern eventuel luft i poserne, inden de forsejles.
- Kontrollér reagensstrimlerne for korrekt væskefyldning (sørg for, at væsken ligger i bunden af rørene).
- Kontrollér reagensstrimlerne for at sikre, at alle pipettespidser er til stede.
- Fjern ikke tørremidlet fra reagensposerne.
- Anvend ikke reagenser, hvis tørremidlet ikke er til stede eller er brudt inden i reagensposerne.
- Anvend ikke reagenser, hvis folien er brudt eller beskadiget.
- Bland ikke reagenser fra forskellige poser og/eller kits og/eller lotnumre.
- Hætter fra de forskellige reagenser må ikke ombyttes eller genbruges, da dette kan medføre kontaminering og kompromittere testresultaterne.
- Udvis forsigtighed, når der anvendes kemiske opløsninger, da læsbarheden for stregkoder på Master Mix-blanding og ekstraktionsrør kan ændres.
- Anvend ikke reagenser og/eller materialer, der er udløbet.
- God laboratorietechnik er altafgørende for korrekt ydeevne for denne analyse. På grund af høj analytisk sensitivitet for denne test, skal der udvises meget stor omhu for at opretholde renheden for alle materialer og reagenser.
- For at undgå kontaminering med amplikon må BD MAX™ PCR-kassetterne ikke adskilles efter brug. Forsejlingerne af BD MAX™ PCR-kassetterne er udviklet til at forhindre kontaminering.
- Udførelse af Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen uden for de anbefalede tidsrammer kan resultere i ugyldige resultater. Analyser, der ikke udføres inden for de angivne tidsintervaller, skal gentages med et nyt præparat.
- Yderligere kontroller kan testes i henhold til retningslinjer eller regler fra lokale eller offentlige myndigheder eller akkrediteringsorganisationer.
- I tilfælde, hvor dyrkning eller andre PCR-test også udføres i laboratoriet, skal der udvises omhu for at sikre, at Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysekomponenterne, de yderligere nødvendige reagenser til testning og BD MAX™-systemet og de omkringliggende områder ikke kontamineres. Undgå altid mikrobiologisk kontaminering og deoxyribonucleasekontaminering (DNase) af reagenser. Der skal skiftes handsker inden håndtering af reagenser og kassetter.
- Alle præparater skal altid håndteres som værende smittefarlige og i henhold til sikre laboratorieprocedurer, som f.eks. dem, der er beskrevet i CLSI Document M2911 og i Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.
- Benyt egnet beskyttelsestøj og engangshandsker ved håndtering af alle former for reagenser.
- Vask hænderne grundigt efter udførelse af testen.
- Undgå at ryge, drikke, tygge eller spise inden for områder, hvor der behandles prøver eller kitreagenser.
- Bortskaf ubrugte reagenser og affald i overensstemmelse med lokale og/eller nationale regler.
- Se brugervejledningen til BD MAX™-systemet for yderligere advarsler, forholdsregler og procedurer.

**Læs hele protokollen, før testen startes**

# Brugsanvisning

## Procedurer for klargøring af prøver

### Klargøring til test af rektale podninger

**Bemærk:** Proceduren for prøveindsamling og -opbevaring skal følges omhyggeligt ved hjælp af tilstrækkeligt med prøvetagningsinstrumenter (se afsnittet *Nødvendige materialer, der ikke følger med kittet*). Rektale podninger indeholder varierende mængder af fæcesmateriale afhængigt af proceduren for prøveindsamlingen. Check-Points rådgiver om validering af prøveindsamlingen og behandlingsmetoden med Check-Direct CPE Screen før den rutinemæssige brug af testen.

1. Rektale prøver skal indsamles i henhold til de lokale retningslinjer og producentens anbefalinger for podninger.
2. Overfør podningerne til de rør, der indeholder flydende transportmedium.
3. Overfør rektale podninger, som skal analyseres, til PCR-rummet, eller opbevar dem indtil yderligere brug i henhold til producentens anbefalinger og/eller lokale regulativer.
4. Bland hvert rør kort med den rektale prøve, og pipetter 25 µL af transportmediet ned i et SB-1 DNA-prøvebufferrør.
5. Luk prøvebufferrøret med en membranhatte, og vortex røret i 10 sekunder ved mellemhastighed.

### Klargøring af kontrolreaktioner

For at validere kørslen skal du udføre positive og negative kontrolreaktioner for hver PCR-kørsel for Check-Direct CPE Screen. Den positive kontrol følger med kittet.

- **Positiv kontrol:**  
Pipetter 10 µL af den positive kontrol ned i ét prøvebufferrør. Bland indholdet i en vortexmixer i 10 sekunder.
- **Negativ kontrol:**  
Pipetter 10 µL PCR-vand ned i ét prøvebufferrør. Bland indholdet i en vortexmixer i 10 sekunder.

## BD MAX™-betjening

### 1. Multiplex-PCR-opsætning i realtid

Tabel 1 viser multiplex-PCR-opsætningen i realtid med de mål, der blev påvist i hver detektorkanal for BD MAX™-systemet.

**Tabel 1:** Multiplex-qPCR-opsætning

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: Prøvebearbejdningskontrol

Når testen er udført for første gang, skal du oprette PCR-testprogrammet "C-D CPE Screen" (C-D CPE Screen) som beskrevet i Appendiks 1.

### 2. BD MAX™ Rack-opsætning

2.1. Isæt BD MAX™-systemrackene med det antal DNA Unitized Reagents Strips (URS), der er nødvendige for det antal prøver, der skal testes. Bank forsigtigt på hver strimmel for at sikre, at væskerne befinder sig i bunden af deres beholder.

2.2. Forberedelse af Unitized Reagent Strips (URS):

2.2.a. Sæt Unitized Reagents Strips i deres positioner i BD MAX™-racket. Strimlerne må endnu ikke "klikkes" på plads.

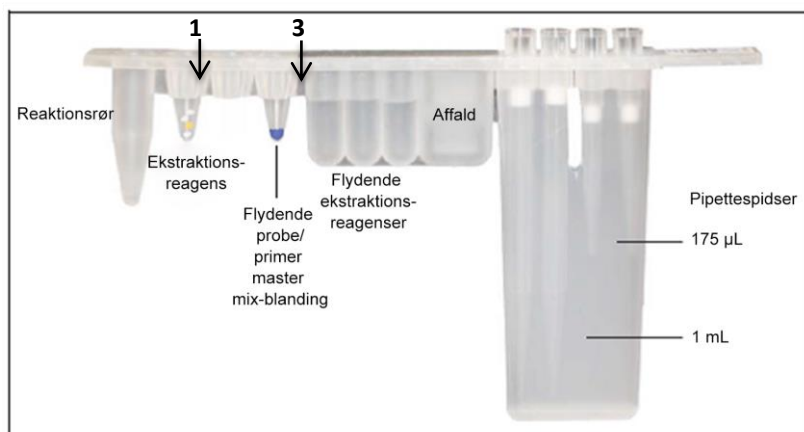
2.2.b. Klik et DNA BD Exk-1-ekstraktionsreagensrør (hvid forsegling) på plads i position **1** for DNA-strimlen, se figur 1.

2.2.c. Klik et CPE Screen reagensrør (blå forsegling) på plads i position **3** for DNA-strimlen, se figur 1.

2.2.d. Prik hul på den blå forsegling på CPE Screen reagensrøret i position **3**, f.eks. med en engangspipettespids.

Dispensér derefter forsigtigt 12,5 µL CP Mastermix i bunden af røret, og sørg for, at der ikke dannes luftbobler.

2.2.e. Klik Unitized Reagents Strips på plads i deres rackpositioner, når forberedelsen af strimlerne er færdig.



Figur 1: Opsætning af DNA Unitized Reagent Strip.

### 3. Opsætning af BD MAX™-instrumentet

- 3.1 Åbn fanen **Run** (Kørsel) i BD MAX™-systemets **software v4.30B** eller nyere, og udfyld **Worklist** (Arbejdsliste).
- 3.2 Vælg **testen "C-D CPE Screen"** (C-D CPE Screen). Se Appendiks 1 for at få oplysninger om oprettelsen af testen "C-D CPE Screen" (C-D CPE Screen), hvis den ikke allerede findes i menuen Test.
- 3.3 Angiv strekkodenummeret for **Sample Buffer Tube** (Prøvebufferrør) ved hjælp af strekkodescanneren (du kan også indtaste strekkoden manuelt). Start med position 1 i rack A. Placer hvert prøvebufferrør i deres tilsvarende position i BD MAX™-rackene (med membranhætte).
- 3.4 Indtast prøvens eller patientens identifikationsoplysninger i linjen **Accession** på arbejdslisten. Kontrollér, at hver prøve- eller patientoplysning svarer til deres specifikke prøvebufferrør i raket.
- 3.5 Sæt raket/rackene ind i BD MAX™-systemet. (Rack A placeres i venstre side af instrumentet, og rack B i højre side).
- 3.6 Isæt BD MAX™ PCR-kassetten eller -kassetterne.
- 3.7 Luk instrumentets låge, og vælg **Start Run** (Start kørsel).

## Tolkning af resultater

**Vigtige punkter før start:** Se *Brugervejledning til BD MAX™-systemet* for at få en detaljeret beskrivelse af dataanalysen.

**Inspicer altid amplifikationsplottet visuelt for hver prøve, der testes, i forhold til de C<sub>T</sub>-værdier der opnås med softwaren.**

### 1. Rapporterede resultater

BD MAX™-softwaren rapporterer C<sub>T</sub>-værdier og amplifikationskurver for hver detektorkanal for hver prøve, der blev testet, på følgende måde:

- C<sub>T</sub>-værdien på **0** angiver, at der ikke blev beregnet nogen C<sub>T</sub>-værdi af softwaren med den specifikke tærskel (se Appendiks 1). En amplifikationskurve for prøven, som viser C<sub>T</sub>-værdien "0", skal kontrolleres manuelt.
- C<sub>T</sub>-værdien **-1** angiver, at der ikke har været nogen gyldig amplifikationsproces. Kontrollér, at der ikke er nogen amplifikationskurve for prøven med en C<sub>T</sub>-værdi på -1 på de grafiske resultater.
- Enhver anden C<sub>T</sub>-værdi skal tolkes i korrelation med amplifikationskurven og i henhold til retningslinjerne for tolkning som beskrevet i tabel 2 og 3.

### 2. Tolkning

#### 2.1 Kør validering

Bekræft, at PCR-kørslen i realtid er gyldig, før du tolker resultaternes data. Kontrollér, at der ikke er nogen rapport om BD MAX™-systemfejl. Hvis det er relevant, skal du kontrollere amplifikationskurverne for den positive og negative kontrol. Tabel 2 viser kriterier for en gyldig Check-Direct CPE Screen kørsel på BD MAX™-systemet. Hvis C<sub>T</sub>-værdierne af kontrollerne ikke svarer til forventningerne, skal du se Ofte stillede spørgsmål (FAQ) og fejlfinding "3".

**Tabel 2:** Kriterier for en gyldig kørsel med Check-Direct CPE Screen testen.

Prøvetype*	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
Positive kontroller	32 ±3	29 ±3	28 ±3	31 ±3	28 ±3
Negativ prøve	-1	-1	-1	-1	28 ±3

## 2.2 Tolkning af resultater

Hvis kørslen er blevet valideret, skal resultaterne tolkes som positive, negative eller uafklarede med de C<sub>T</sub>-værdier, der blev opnået for prøverne efter retningslinjerne i tabel 3. Kontrollér altid, at amplifikationskurven for hver prøve svarer til de C<sub>T</sub>-værdier og den resultatfortolkning, som vises af softwaren. Uafklarede kørsler skal testes igen.

**Tabel 3:** Retningslinjer for datatolkning af rektale podninger.

KPC, VIM, OXA, NDM C <sub>T</sub> -værdier	SPC C <sub>T</sub> -værdier	Tolkning
JA	JA	Positiv prøve
-1	28 ± 3	Negativ prøve
-1	< 25 eller > 32	Ikke afklaret
-1 eller JA	-1	Ikke afklaret

### VIGTIGE OPLYSNINGER:

- JA betyder, at en C<sub>T</sub>-værdi er observeret og angivet i resultattabellen.
- Et positivt testresultat er ikke nødvendigvis ensbetydende med forekomsten af levedygtige organismer i den prøve, der blev testet.
- C<sub>T</sub>-værdier af rektale podninger kan variere bredt som følge af forskellene i fæcesmaterialet og "bakteriebelastningen" i rektale podninger i transportmediet.
- Hvis BD MAX™-systemet giver inkonklusive eller ufuldstændige resultater (IND eller INC) som følge af en BD MAX™-systemfejl, skal du kontakte den lokale BD-repræsentant.

## Ofte stillede spørgsmål (FAQ) og fejlfinding

Se afsnittet "Fejlfinding" i brugervejledningen til BD MAX™-systemet for yderligere oplysninger.

- 1. Realtidsresultater viser ingen C<sub>T</sub>-værdier, eller tolkningen angiver, at prøven er uafklaret.** Mulige årsager og fejlfinding:
  - PCR-reaktionen er blevet forhindret af eksogene eller endogene stoffer. Gentag prøvetestningen. Hvis den stadig er hæmmet, kan en lavere mængde af inputprøven forbedre resultaterne.
  - DNA-ekstraktionen mislykkedes, da der ikke blev detekteret nogen SPC.
  - CPE Screen reagenset eller CP Mastermix kan være udløbet.
  - Der opstod en fejl i væskehåndteringen: Kontrollér Unitized Reagent Strips og PCR-kassetten for at finde ud af, hvor væskehåndteringsproblemet er opstået (eksempel: luftboble i kassetten), og køр prøven igen. Kontakt den lokale BD-repræsentant, hvis problemet fortsætter.
- 2. Fejlfinding for uafklarede resultater.**  
For uafklarede resultater: Gentag testen med den oprindelige prøve ved at forberede et nyt prøvebufferrør. Alternativt skal du teste en nyligt indsamlet prøve eller bruge en lavere mængde af prøven.
- 3. Realtidsresultater viser ingen C<sub>T</sub>-værdier for den positive kontrol, eller tolkningen angiver, at prøven er uafklaret?**  
Mulige årsager og fejlfinding:
  - Den positive kontrolopløsning blev ikke tilføjet.
  - CPE Screen reagenset eller CP Mastermix kan være udløbet.
  - Der er luftbobler i PCR-reaktionskammeret for den positive kontrol.
- 4. Realtidsresultater viser meget lave fluorescenssignaler i alle prøver og detektorkanaler, herunder SPC-signalet.**  
Mulige årsager og fejlfinding:
  - CPE Screen-reagensrør med fluorescensprober og primere kan være i forringet tilstand. Kontrollér udløbsdatoen, og kontrollér, om CPE Screen-rørene er blevet opbevaret korrekt.
  - Disse resultater kan skyldes BD MAX™-systemet. Se brugervejledningen til BD MAX™, eller kontakt den lokale BD-repræsentant.
- 5. BD MAX™-systemet angiver en fejl.**  
Se brugervejledningen til BD MAX™-instrumentet, eller kontakt den lokale BD-repræsentant.
- 6. Identiske prøver, som er testet med Check-Direct CPE Screen analysen, giver ikke identiske resultater.**  
C<sub>T</sub>-værdierne for identiske prøver kan variere mellem individuelle reaktioner. Store variationer, > 2 C<sub>T</sub>-værdier, foreslår pipetteringsfejl eller andre forskelle mellem de identiske prøver.

## Begrænsninger

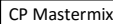
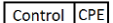








Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ anvender en række specifikke DNA-markører til at påvise tilstedeværelsen af carbapenemase-generne KPC, NDM, OXA-48 og VIM, som for øjeblikket repræsenterer de klinisk oftest forekommende carbapenemasser. Testen påviser alle de for øjeblikket kendte varianter af KPC, NDM, OXA-48 og VIM med undtagelse af VIM-7, en sjælden variant, som kun findes i *Pseudomonas aeruginosa*. Det bør bemærkes, at andre sjældne carbapenemase-genfamilier ikke påvises. Testen er kun beregnet til brug med rektale podninger i transportmedium som inputmateriale.

Kvaliteten af input-DNA'et er en vigtig faktor for at opnå pålidelige resultater med Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. DNA skal udtrækkes fra rektale podninger ved hjælp af de enheder og procedurer, der er beskrevet i denne vejledning. Analysen er blevet indgående testet med DNA, som er oprenset fra Gram-negative bakterier, som f.eks. *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* og *Pseudomonas*, med udmærkede resultater. Det kan dog ikke udelukkes, at andre Gram-negative bakterier eller visse stammer af ovennævnte arter kan give dårlige resultater. Check-Direct CPE Screen kan ikke give nogen garanti for korrekt påvisning af carbapenemase-gener i alle Gram-negative arter, underarter eller typer eller i alle kliniske prøver. Resultaterne skal muligvis bekræftes via yderligere metodologier i specifikke sager (f.eks. for lovmæssige prøver). På grund af den høje foranderlighed for bakterielle genomer kan visse undertyper muligvis ikke påvises. Testen afspejler kendskabet til Check-Points Health B.V.

Et positivt testresultat er ikke nødvendigvis ensbetydende med forekomsten af levedygtige organismer i den prøve, der blev testet. Carbapenemase-DNA kan være blevet påvist i ikke-levedygtige organismer.

Tilstedeværelsen af flere bakteriearter i en prøve kan hæmme tolkningen af testen. Som det er tilfældet med andre diagnostiske analyser, kan resultaterne af denne test kun tolkes i kombination med yderligere laboratoriedata og kliniske data, som er til rådighed for den ansvarlige person. Brug af denne analyse er begrænset til tilstrækkeligt kvalificeret personale, som er uddannet til at udføre DNA-baserede molekylære påvisningsmetoder.

## Vigtige symboler, som anvendes

Symbol	Definition
	CP Mastermix
	CPE-kontrol
	Til <i>in vitro</i> -diagnostisk brug
	Katalognummer
	Batchkode
	Anvendes inden ÅÅÅÅ-MM
	Se brugsanvisningen
	Fabrikant
	Temperaturgrænse
	Indeholder tilstrækkeligt til < n > prøver

## Teknisk assistance

support@check-points.com

+31 317 453 908

Til trods for den største omhu i udviklingen og udarbejdelsen af protokollen kan Check-Points ikke påtage sig noget ansvar for fejl, udeladelser og/eller fremtidige ændringer heri.

**Henvisning:** Ved beskrivelse af en procedure til udgivelse ved hjælp af dette produkt skal du henvise til det som *Check-Direct CPE Screen*.

**Bemærkning til køber:**

Dette produkt sælges under licens fra PHRI Properties og må kun anvendes i henhold til PHRI Properties' patentrettigheder til human *in vitro* klinisk diagnostik, fødevareanalyse, veterinæranalyse eller forskning. Farve- og quencher-forbindelser i dette produkt sælges under licens fra Biosearch Technologies, Inc. og er beskyttet af amerikanske og globale patenter enten ved udstedelse eller efter anmodning. Licensen dækker humane *in vitro*-diagnostiske (IVD) applikationer.

**Varemærker**

BD, BD MAX™ er varemærker, der tilhører Becton Dickinson GmbH

Check-Points Health BV  
 Binnenhaven 5  
 6709 PD Wageningen  
 Holland

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



## Appendiks 1: Oprettelse af Check-Direct CPE Screen testprogrammet v.4.30B eller nyere

**Vigtige punkter før start:** Der henvises til brugermanualen til BD MAX™-systemet for detaljerede instruktioner om betjeningen af BD MAX™-systemet og **softwareversion 4.30B eller nyere**.

For at oprette en ny test under fanen **Test Editor** (Testredigering) skal du vælge **Create** (Opret) og anvende følgende instruktioner:

- Under fanen **Basic Information** (Grundlæggende oplysninger) skal du indtaste følgende parametre:
  - Test Name** (Testnavn): *C-D CPE Screen (C-D CPE Screen)*.
  - Extraction Type** (Ekstraktionstype): Vælg *Exk DNA-1 (Plasma/Serum)*.
  - Master Mix Format** (Master Mix-format): Vælg *Type 3: Liquid MM with Primers and Probes (Flydende MM med primere og prober)*.
  - Sample Extraction Parameters** (Ekstraktionsparametre for prøver): Vælg *User defined* (Brugerdefineret), og juster *prøvevolumen* til 600 µL, se tabel A.
  - Ct Calculation** (Ct-beregning): Vælg *Call Ct at inflection point* (Fastlæg Ct ved vendepunkt).

### Gem parametrene

- Under fanen **PCR Settings** (PCR-indstillinger) skal du indtaste følgende parametre:
  - Alias, PCR Gain** (PCR-forstærkning) **og Threshold** (Tærskel): For hver kanaldetektor skal du indtaste de korrekte parametre som angivet i tabel B.
  - Color compensation** (Farvekompensation): Indtast de korrekte parametre som angivet i tabel C.

### Gem parametrene

- I **Test Steps** (Testtrin) skal du indtaste de PCR-trin, som er angivet i tabel D.

### Gem parametrene

**Tabel A:** Sample Extraction Parameters (Ekstraktionsparametre for prøver).

Parameters (Parametre)	Value (Værdi)
Lysis Heat Time (Lyseringsvarmetiden)	10
Lysis Temperature (Lyseringstemperatur)	37
Sample Tip Height (Prøvespidsens højde)	1600
<b>Sample Volume</b> (Prøvevolumen)	<b>600</b>
Wash Volume (Vaskevolumen)	500
Neutralization Volume (Neutraliseringsvolumen)	----
DNase Heat Time (DNase-varmetid)	----

**Tabel B:** Parametrene *Alias*, *PCR Gain* (PCR-forstærkning) og *Threshold* (Tærskel).

Detector (Detektor)	Alias	Gain (Forstærkning)	Threshold (Tærskel)
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

**Tabel C:** Spectral cross-talk parameters (Spektrale krydstaleparametre).

	False Receiving Channel (Kanal, der modtager falsk input)					
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Excitationskanal)	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	

**Tabel D:** Test PCR Steps parameters (Parametre for PCR-testtrin).

Step Name (Navn på trin)	Profile Type (Profiltipe)	Cycles (Cyklusser)	Time (s) (Tid(er))	Temp(°C)	Detect (Påvis)
Denaturation (Denaturering)	Hold	1	600	98	NEJ
Amplification & Detection (Amplifikation og påvisning)	2 – temperatur (temperatur)	50	15	98	NEJ
			62	60	JA



## Appendiks 2: Testegenskaber

### Påvisningsgrænse med rektale podninger

Den analytiske påvisningsgrænse (LoD) for Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ blev bestemt ved hjælp af rektale podninger tilsat veldefinerede mængder af målbakterien. E-swab Amies-transportmediet (Copan) blev "udtaget" med ca. 10 mg/mL human fæces, der efterligner en typisk rektal podning. Stammer med mål-carbapenemase-gener blev dyrket o/n, og cellesuspensioner blev forberedt i Milli-Q-vand med en tæthed på 0,5 McFarland. Disse cellesuspensioner blev tilsat i kunstige rektale podninger for at danne prøver med en veldefineret mængde fæcesmateriale og målbakterier.

En stor indsamling af prøver, der blev oprettet som beskrevet ovenfor, blev brugt til at vurdere den analytiske påvisningsgrænse (LoD) efter protokollen, som beskrevet på side 4 og 5 i denne brugervejledning. Resultaterne er vist i tabellen nedenfor. SBT henviser til BD MAX™-prøvebufferrøret.

Mål	CFU pr. SBT	CFU/PCR	Succesrate
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%

### *In silico*-specificitet

Specificiteten af den diagnostiske realtidstest Check-Direct CPE Screen sikres ved at vælge de korrekte primere og prober samt at sørge for stringente reaktionsforhold. Primer- og probesekvenser er udviklet til specifikt at identificere de genvarianter, der er angivet i tabellen nedenfor. Et 100 %-sekvensmatch med primere og prober ved hjælp af *in silico*-analyse blev antaget at kunne garantere pålidelig påvisning af hver af de viste varianter. Enkelte uoverensstemmelser med primere og prober findes i nogle varianter, hvoraf vi forventede, at påvisningen ikke ville være kompromitteret. Dette blev bekræftet ved hjælp af test som f.eks. varianter sammenlignet med varianter, som var 100 % homologe.

Primer- og probesekvenser blev testet for potentielle homologier med gener fra andre organismer ved hjælp af alle de gensekvenser, der var til stede i den internationale genbank den 1. april 2014. (GenBank, NIH's genetiske sekvensdatabase) ved hjælp af sekvenssammenligningsanalyse. Der blev ikke fundet nogen krydshomologi med andre organismer for de valgte primere og prober.

Carbapenemase-gen	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 specificitet

Den analytiske specificitet af den diagnostiske realtidstest Check-Direct CPE Screen blev bestemt ved at teste krydsreaktiviteten med prøver, der indeholdt en stor mængde ikke-målspecifikke organismer. 103 carbapenemase-negative stammer blev brugt til at teste specificiteten af Check-Direct CPE Screen testen i realtid. En oversigt over disse stammer er vist i tabellen nedenfor. Alle isolater, der blev testet negative med Check-Direct CPE Screen analysen og den interne kontrol, blev pålideligt påvist i alle prøver. Specificiteten var 100 % på baggrund af de referencestammer, der blev testet.

Arter	Testede stammer
<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

## Analytisk inklusivitet

Der blev foretaget en retrospektiv undersøgelse med 93 bakteriestammer fra 14 forskellige Gram-negative arter, der tidligere blev identificeret som carbapenemase-positive med den diagnostiske Check-Points-mikroanalysetest Check-MDR CT103 (Check-Points Health). Alle 93 bakteriestammer blev korrekt typebestemt for mål-carbapenemase-generne. Resultaterne er vist i tabellen nedenfor. Inklusiviteten var 100 % for de stammer, der blev testet.

Antal af testede stammer	Check-MDR CT103-resultat	Check-Direct CPE Screen resultat
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

## Klinisk ydeevne

Den kliniske ydeevne af Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen blev vurderet i tre separate prospektive undersøgelser med fire europæiske kliniske centre. Prævalensen af CPE (Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae*) ved fravær af et udbrud er lav, og det er svært at opnå friske prøver med CPE. De prospektive prøver blev derfor suppleret med konstruerede prøver (velkarakteriserede isolater tilsat i negativ rektal podningsmatrice) for at kompensere for den lave mængde af positive prøver. Rektale podninger indsamlet som en del af den rutinemæssige patientpleje blev testet med Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen og sammenlignet med en referencedyrkningsmetode (ChromID ESBL- eller ChromID Carba Smart-selektivt dyrkningsmedium). Prospektive dyrkningspositive kliniske prøver blev bekræftet via genspecifikke PCR'er.

I alt 1203 rektale podninger blev testet, hvoraf 30 (2,5 %) prøver gav inkonklusive resultater og blev således udelukket fra de resultater, der er rapporteret nedenfor. 41 af de 1173 prøver, der er inkluderet i resultaterne, blev konstrueret med velkarakteriseret KPC-, VIM-, OXA-48- eller NDM-positive bakteriestammer. De(n) overordnede funktion og funktioner for målet for Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen er rapporteret nedenfor.

I forhold til referencemetoden påviste Check-Direct CPE Screen-analysen en overordnet sensitivitet og specificitet på henholdsvis 98,5 % og 96,8 % på det kombinerede sæt af konstruerede og prospektive prøver (se tabellen nedenfor).

### Overordnet ydeevne af Check-Direct CPE Screen ift. referencemetoden

CPE		Dyrkning		I alt
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	67	35	102
	-	1	1070	1071
I alt		68	1105	1173

Følsomhed: 98,5% (67/68)  
 Specificitet: 96,8% (1070/1105)

### Check-Direct CPE Screen ydeevne ift. referencemetoden for KPC

KPC		Dyrkning		I alt
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	28	8	36
	-	1	1136	1137
I alt		29	1144	1173

Følsomhed: 96,6% (28/29)  
 Specificitet: 99,3% (1136/1144)

### Check-Direct CPE Screen ydeevne ift. referencemetoden for OXA48

OXA-48		Dyrkning		I alt
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	13	8	21
	-	0	1152	1152
I alt		13	1160	1173

Følsomhed: 100% (13/13)  
 Specificitet: 99,3% (1152/1160)

### Check-Direct CPE Screen ydeevne ift. referencemetoden for VIM

VIM		Dyrkning		I alt
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	15	19	34
	-	0	1139	1139
I alt		15	1158	1173

Følsomhed: 100% (15/15)  
 Specificitet: 98,4% (1139/1158)

### Check-Direct CPE Screen ydeevne ift. referencemetoden for NDM

NDM		Dyrkning		I alt
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	11	0	11
	-	0	1162	1162
I alt		11	1162	1173

Følsomhed: 100% (11/11)  
 Specificitet: 100% (1162/1162)