

# Brukerhåndbok

## Check-Direct CPE Screen for BD MAX™

For påvisning og differensiering av karbapenemasegener fra *Enterobacteriaceae* i rektale penselprøver

Versjon 1.5

Utgivelsesdato: 20.07.2017

REF

18-0051



24

CE IVD

### Innhold

Bruksområde.....	2
Introduksjon og prinsippet for metoden .....	2
Kitinnhold (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 .....	6
Begrensninger .....	7
Forklaringer av symboler som brukes.....	7
Teknisk assistanse .....	7
Vedlegg 1: Opprette Check-Direct CPE Screen test i programmet v.4.30B eller nyere..	8
Vedlegg 2: Testegenskaper .....	9

## Bruksområde

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ er en kvalitativ *in vitro*-diagnostisk test for rask påvisning og differensiering av karbapenemasegener fra *Enterobacteriaceae* i rektale penselprøver. Check-Direct CPE Screen 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 Screen 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 Screen 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 assosieret 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  $\beta$ -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- $\beta$ -laktamase), NDM (New Delhi metallo- $\beta$ -laktamase) eller OXA-48 (Oxacillinase-48- og OXA-48-lignende varianter). I tillegg har CPE ofte andre ikke- $\beta$ -laktam-resistensdeterminanter som resulterer i multiresistente eller utvidet multiresistente isolater.

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ 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 at den påviser oppformeringen av PCR-produkt ved hjelp av fluorescerende DNA-prober. Det eksisterer mange genvarianter av KPC, VIM, OXA-48 og NDM og Check-Direct CPE Screen har blitt utviklet for å kunne detektere de fleste variantene. Variantene som påvises og forventes å bli påvist for hvert resistensgen, er presentert i *in silico*-spesifisitetssnittet i Vedlegg 2. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ benytter fem forskjellige fluorescerende prober som gjør det mulig å påvise og differensiere mellom de fire ulike karbapenemasegenene, samt prøvebehandlings kontrollen, SPC.

## Kitinnhold (for 24 reaksjoner)

Komponenter (mat. nr.)	Beskrivelse
Reagensrør for CPE Screen(9-0121)	24 forseglede rør (blå forsegling)
CPE-positiv kontroll (9-0061)	1 rør (lilla hette) 100 $\mu$ l
CP Mastermix (CP-mastermix) (9-0122)	1 rør (grønn hette) 330 $\mu$ l
Brukerhåndbok (9-0124)	Pakningsvedlegg – last ned fra hjemmesiden

## Nødvendige materialer som ikke følger med kitet

Forbruksartikler	Utstyr
<ul style="list-style-type: none"> <li>BD MAX™ ExK DNA-1 Extraction Kit (ref.nr.: 442818)</li> <li>BD MAX™ PCR Cartridges (ref.nr.: 437519)</li> <li>Laboratoriehansker (pudderfrie) til engangsbruk</li> <li>Pipetter og engangsspisser (filterspisser) for volumer på 10 og 25 <math>\mu</math>l</li> <li>Vann av PCR-kvalitet (f.eks. Milli-Q eller aqua bidest)</li> <li>Pensler og transportmedier som er kompatible med rektal prøvetaking. Anbefalt prøvetakingsutstyr : Copan ESwab, kat.nr. 480CE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sanntids PCR-instrument: BD MAX™ System, programvareversjon 4.30B eller nyere</li> <li>Vorteksmikser</li> </ul>

## Oppbevaring og holdbarhet

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-kitet transporteres i romtemperatur og etter mottak må det oppbevares i mørket og ved 2 til 8 °C. Reagensene oppbevares ved 2 til 8 °C frem til den oppgitte utløpsdatoen. Ikke bruk komponenter etter utløpsdatoen.

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-reagensrør, PCR Mastermix 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 8 °C etter første åpning.

## Advarsler og forsiktighetsregler

- Check-Direct CPE Screen 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 forseglar 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 ikke BD MAX™ PCR kort brytes i stykker etter bruk. Forseglingene på BD MAX™ PCR kortene er laget for å hindre kontaminasjon.
- Ved bruk av Check-Direct CPE Screen 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 kontaminasjon av Check-Direct CPE Screen 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 rektalpensler

**Merk:** Prosedyren for prøvetaking og oppbevaring må følges nøye, og det må brukes egnede prøvetakingsutstyr (se avsnittet *Nødvendige materialer som ikke følger med kitet*). Rektalpensler vil inneholde varierende mengder fekal materiale avhengig av prosedyren for prøvetaking. Check-Points anbefaler å validere prøvetakingen og behandlingsmetoden med Check-Direct CPE Screen før rutinemessig bruk av testen.

1. Samle inn rektalprøven i henhold til lokale retningslinjer og penselprodusentens anbefalinger.
2. Overfør penslene til rørene som inneholder flytende transportmedium.
3. Flytt rektalpenselprøvene som skal analyseres til PCR-rommet eller oppbevar dem inntil senere bruk i henhold til penselprodusentens anbefaling og/eller lokale forskrifter.
4. Bland raskt hvert rør med rektalprøve og pipetter 25 µL av transportmediet inn i ett DNA-prøvebufferrør SB-1.
5. Tett igjen prøvebufferrøret med en septumlokk og Vortex i 10 sekunder ved middels hastighet.

### Klargjøring av kontrollreaksjoner

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

- **Positiv kontroll:**  
Pipetter 10 µL av den positive kontrollen i ett prøvebufferrør. Vortex i 10 sekunder.
- **Negativ kontroll:**  
Pipetter 10 µL vann av PCR-kvalitet 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, oppretter du PCR-testprogrammet "C-D CPE Screen" som beskrevet i Vedlegg 1.

### 2. BD MAX™-stativoppsett

2.1. Fyll BD MAX™-systemstativene med det antallet DNA-reagensstrimler som samsvarer med 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. Klargjør reagensstrimler:

2.2.a. Sett reagensstrimlene i BD MAX™-stativet. Ikke "klikk på plass" strimlene ennå.

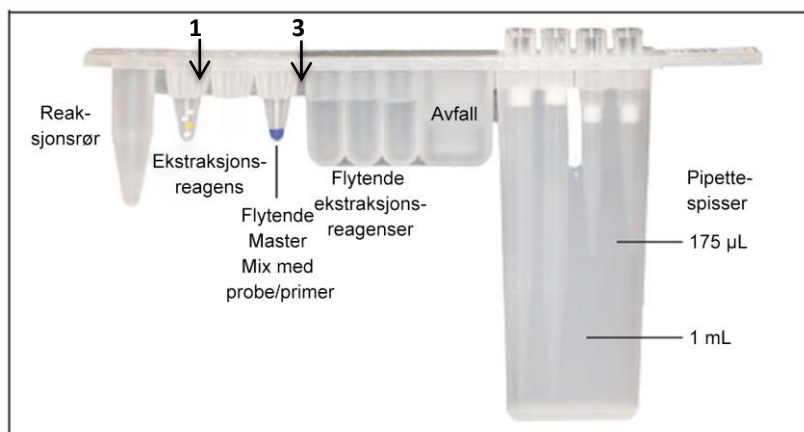
2.2.b. Klikk på plass et BD Exk-1-reagensrør for DNA-ekstraksjon (hvit forsegling) i posisjon **1**, se figur 1.

2.2.c. Klikk på plass et CPE Screen reagensrør (blå forsegling) i posisjon **3**, se figur 1.

2.2.d. Penetrer den blå forseglingen til CPE Screen reagensrøret i posisjon **3**, f.eks. med en engangspipettespiss.

Deretter resuspender forsiktig med 12,5 µL av CP Mastermix på bunnen av røret. Pass på at det ikke dannes luftbobler.

2.2.e. Klikk på plass reagensstrimlene i de tilhørende stativposisjonene når strimmelklargjøringen er fullført.



Figur 1: Oppsett av DNA-reagensstrimmel.

### 3. Oppsett av BD MAX™-instrumentet

- 3.1 Åpne **Run** (Kjør)-fanen i BD MAX™ System **software v4.30B** (programvare v4.30B) eller nyere, og fyll ut **Worklist** (Arbeidsliste).
- 3.2 Velg **Test "C-D CPE Screen"**. Se Vedlegg 1 for å opprette "**Check-Direct CPE Screen**"-testen hvis den ikke finnes i Test-menyen.
- 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 septumlukk).
- 3.4 Angi prøve- eller pasientidentifikasjonsinformasjonen i **Accession** (Aksesjon)-linjen på arbeidslisten. 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<sub>T</sub>-verdiene oppnådd med programvaren.**

### 1. Rapporterte resultater

BD MAX™-programvaren rapporterer C<sub>T</sub>-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En C<sub>T</sub>-verdi på **0** angir at det ikke ble beregnet noen C<sub>T</sub>-verdi av programvaren med den angitte terskelen (se Vedlegg 1). En amplifikasjonskurve som viser en C<sub>T</sub>-verdi på "0", må kontrolleres manuelt.
- En C<sub>T</sub>-verdi på **-1** indikerer at ingen gyldig amplifikasjonsprosess har funnet sted. Kontroller at det ikke er noen amplifikasjonskurver med en C<sub>T</sub>-verdi på -1 i de grafiske resultatene.
- Alle andre eventuelle C<sub>T</sub>-verdier må tolkes i samsvar med amplifikasjonskurven og i henhold til tolkningsretningslinjene som er oppgitt 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 Screen kjøring på BD MAX™ System. Hvis kontrollenes C<sub>T</sub>-verdier ikke er som forventet, se Vanlige spørsmål og problemløsning "3".

Tabell 2: Kriterier for en gyldig kjøring med Check-Direct CPE Screen test.

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 av resultater

Hvis kjøringen er godkjent, tolk resultatene som positive, negative eller uavklart med C<sub>T</sub>-verdiene som ble oppnådd for prøvene etter retningslinjene som er oppsummert i tabell 3. Kontroller alltid at amplifikasjonskurven for hver prøve samsvarer med C<sub>T</sub>-verdiene og resultattolkningen som utføres av programvaren. Uavklarte kjøringar må testes på nytt.

**Tabell 3:** Retningslinjer for tolkning av data for rektalpensler.

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

### VIKTIGE MERKNADER:

- JA betyr at en C<sub>T</sub>-verdi ble observert og oppgitt i resultattabellen.
- Et positivt testresultat indikerer ikke nødvendigvis forekomst av levedyktige organismer i den testede prøven.
- C<sub>T</sub>-verdiene til rektalpensler kan variere mye på grunn av forskjeller i fekal materiale og rektalpenslens bakteriemengde i et transportmedium.
- 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.

- 1. Sanntidsresultater viser ingen C<sub>T</sub>-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.
  - CPE Screen reagenser eller CP Mastermix kan ha utløpt.
  - Det har oppstått en feil med væskehåndtering: kontroller reagensstrimler og PCR-kortene for å 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.
- 2. Feilsøking for uavklarte resultater.**  
For uavklarte resultater: Gjenta testen med den opprinnelige prøven ved å klargjøre et nytt prøvebufferrør. Alternativt kan nyinnsamlet prøve testes eller bruk mindre prøvemateriale.
- 3. Sanntidsresultater viser ingen C<sub>T</sub>-verdier for den positive kontrollen, eller tolkning indikerer at prøven er uavklart.** Mulige årsaker og feilsøking:
  - Den positive kontrolløsningen ble ikke tilsatt.
  - CPE Screen reagenser eller CP Mastermix kan ha utløpt.
  - Forekomsten av luftbobler i PCR-reaksjonskammeret til den positive kontrollen.
- 4. Sanntidsresultatene viser svært lave fluorescenssignaler i alle prøver og detektorkanaler, inkludert SPC-signalet.**  
Mulige årsaker og feilsøking:
  - CPE Screen reagensrørene som inneholder de fluorescerende probene og primerne, kan være degradert. Kontroller utløpsdatoen og forsikre deg om at CPE Screen 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.
- 5. BD MAX™ System oppgir en feil eller svikt.**  
Se brukerhåndboken for BD MAX™-instrumentet, eller ta kontakt med din lokale BD-representant.
- 6. Duplikate prøver testet med Check-Direct CPE Screen analysen gir ikke identiske resultater.**  
C<sub>T</sub>-verdier av identiske prøver kan variere mellom de enkelte reaksjonene. Store variasjoner, > 2 C<sub>T</sub>-verdier, tyder på feil med pipetteringsutstyr eller andre ulikheter mellom de duplikate prøvene.

## Begrensninger

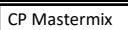
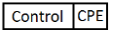








Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ benytter et utvalg av spesifikke DNA-markører for å påvise tilstedeværelsen av karbapenemasegenene KPC, NDM, OXA-48 og VIM, som representerer de mest prevalente kliniske karbapenemasene. Testen påviser alle kjente varianter av KPC, NDM, OXA-48 og VIM, med unntak av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

Kvaliteten av input-DNA er en viktig faktor for å oppnå pålitelige resultater med Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. DNA må ekstraheres fra rektalpensler ved hjelp av utstyr og prosedyrer som er beskrevet i denne håndboken. 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 Screen kan ikke garantere 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.

Et positivt testresultat indikerer ikke nødvendigvis forekomst av levedyktige organismer i den testede prøven. Karbapenemase-DNA fra ikke-levedyktige organismer kan ha blitt påvist.

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
	CP Mastermix
	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 at protokollen har blitt utviklet og utarbeidet med den største nøyaktighet, kan Check-Points ikke ta ansvar for feil, mangler og/eller fremtidige endringer i dette dokumentet.

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

### 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 Screen test i programmet v.4.30B eller nyere

**Viktige punkter før du starter:** Se håndboken for BD MAX™ System for detaljerte instruksjoner om hvordan du bruker BD MAX™ System og **programvareversjon 4.30B eller nyere.**

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

- I **Basic Information** (Grunnleggende informasjon)-fanen angir du følgende parametere:
  - Test Name** (Testnavn): *C-D CPE Screen*.
  - Extraction Type** (Ekstraksjonstype): velg *Exk DNA-1 (Plasma/Serum)*.
  - Master Mix Format**: velg *Type 3: Liquid MM with Primers and Probes* (Flytende Master Mix med primere og prober).
  - Sample Extraction Parameters** (Prøveekstraksjonsparametere): velg *User defined* (Brukerdefinert) og juster *sample volume* (prøvevolum) til 600 µL. Se tabell A.
  - Ct Calculation** (Ct-beregning): velg *Call Ct at inflection point* (Ct ved infleksjonspunkt).

**Save parameters** (Lagre parameterne)

- 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 parameterne angitt i tabell B.
  - Color compensation** (Fargekompensering): angi korrekte parametere angitt i tabell C.

**Save parameters** (Lagre parameterne)

- 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
<b>Sample Volume</b> (Prøvevolum)	<b>600</b>
Wash Volume (Vaskevolum)	500
Neutralization Volume (Nøytraliseringsvolum)	----
DNase Heat Time (DNase-oppvarmingstid)	----

**Tabell B:** Alias, PCR Gain, Threshold parameters (Parameterne Alias, PCR-forsterkning og Terskel)

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

**Tabell C:** Spectral cross-talk parameters (Parameterne for spektral påvisning).

	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 (Profiltipe)	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)	50	15	98	NEI
			62	60	JA



## Vedlegg 2: Testegenskaper

### Deteksjonsgrense med rektalpensler

Den analytiske deteksjonsgrensen (LoD) for Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ ble bestemt ved bruk av rektalpensler tilsatt veldefinerte mengder av målbakterier. En E-swab Amies-transportmedium (Copan) ble tilsatt ca. 10 mg/mL menneskelig avføring for å simulere en typisk rektal penselprøve. Stammer som inneholdt målkarbapenemasegener ble dyrket over natten og en cellesuspensjon med 0,5 McFarland ble fremstilt i Milli-Q-vann. Disse cellesuspensjonene ble tilsatt materiale til de kunstige rektalpenslene for å lage prøver med en veldefinert mengde fekal materiale og målbakterier.

En mengde prøver som ble laget som beskrevet ovenfor ble brukt for å vurdere den analytiske deteksjonsgrensen (LoD, limit of detection) i henhold til protokollen som er beskrevet på side 4 og 5 i denne brukerhåndboken. Resultatene er vist i tabellen nedenfor. SBT henviser til BD MAX™ prøvebufferrør (Sample Buffer Tube).

Mål	CFU per SBT	CFU/PCR	Suksessrate
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-spesifisitet

Spesifisiteten av Check-Direct CPE Screen sanntidsdiagnostisk test sikres 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 genvariantene finnes det enkelttilfeller hvor det mangler samsvar mellom primere og prober, med 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) ved 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 Screen diagnostisk sanntidstest ble bestemt ved testing av kryssreaktivitet med prøver som inneholdt en høy mengde av ikke-målorganismer. 103 karbapenemasenegative stammer ble brukt til å teste spesifisiteten til Check-Direct CPE Screen sanntidstesten. En oversikt over disse stammene finnes i tabellen nedenfor. Alle isolater testet negativt med Check-Direct CPE Screen analysen, og den interne kontrollen ble pålitelig påvist i alle prøver. Spesifisiteten var 100 % basert på referansestammene som ble 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

Det ble utført en retrospektiv studie med 93 bakteriestammer av 14 forskjellige gram-negative arter. Disse stammene var tidligere identifisert som karbapenemasepositive med den diagnostiske Check-Points-mikroarraytesten Check-MDR CT103 (Check-Points Health). Alle de 93 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-screeningresultat
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 ytelse

Den kliniske ytelsen av Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen ble vurdert i tre separate prospektive studier som involverte fire europeiske kliniske sentre. Forekomsten av CPE (karbapenemaseproduserende *Enterobacteriaceae*) er lav ved fravær av et utbrudd og det kan derfor være vanskelig å oppdrive ferske prøver som inneholder CPE. Prøvene ble derfor supplert med godt karakteriserte isolater for å kompensere for den lave mengden av positive prøver. Rektalpenselprøver som ble samlet inn som en del av rutinemessig pasientbehandling, ble testet med Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analyse og sammenlignet med en referansedykningsmetode (ChromID ESBL eller ChromID Carba Smart selektivt kulturmedium). Potensielle kulturpositive kliniske prøver ble bekreftet ved genspesifikke PCR-er.

Totalt 1203 rektalpenselprøver ble testet, hvorav 30 (2,5 %) prøver ga ikke tolkbare resultater og ble derfor utelukket fra resultatene som er oppgitt nedenfor. 41 av de 1173 prøvene som inngår i resultatene var konstruerte prøver som inneholdt godt karakteriserte KPC-, VIM-, OXA-48- eller NDM-positive bakteriestammer. Samlet ytelse og ytelse per mål for Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen er oppgitt nedenfor.

I forhold til referansemetoden hadde Check-Direct CPE Screen-analysen en sensitivitet og en spesifisitet på henholdsvis 98,5 % og 96,8 %.

### Samlet Check-Direct CPE Screen-ytelse versus referansemetode

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

Sensitivitet: 98,5 % (67/68)

Spesifisitet: 96,8 % (1070/1105)

### Check-Direct CPE Screen-ytelse versus referansemetode for KPC

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

Sensitivitet: 96,6 % (28/29)

Spesifisitet: 99,3 % (1136/1144)

### Check-Direct CPE Screen-ytelse versus referansemetode for OXA48

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

Sensitivitet: 100 % (13/13)  
 Spesifisitet: 99,3 % (1152/1160)

### Check-Direct CPE Screen-ytelse versus referansemetode for VIM

VIM		Kultur		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	15	19	34
	-	0	1139	1139
Totalt		15	1158	1173

Sensitivitet: 100 % (15/15)  
 Spesifisitet: 98,4 % (1139/1158)

### Check-Direct CPE Screen-ytelse versus referansemetode for NDM

NDM		Kultur		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE Screen PCR	+	11	0	11
	-	0	1162	1162
Totalt		11	1162	1173

Sensitivitet: 100 % (11/11)  
 Spesifisitet: 100 % (1162/1162)