

# Användarhandbok

## Check-Direct CPE Screen for BD MAX™

för detektion och differentiering av karbapenemasgener från *Enterobacteriaceae* i rektala pinnprover

Version 1.5

Utfärdandedatum: 2017.07.20

REF

18-0051



24

CE IVD

### Innehåll

Avsedd användning .....	2
Inledning och metodens princip .....	2
Innehåll i kitet (för 24 reaktioner) .....	2
Material som krävs men ej medföljer kitet.....	2
Förvaring och hållbarhet .....	2
Varningar och försiktighetsbeaktanden .....	3
Bruksanvisning .....	4
Provberedningsförfaranden .....	4
BD MAX™-användning .....	4
Tolkning av resultat.....	5
Vanliga frågor (FAQ) och felsökning .....	6
Begränsningar .....	7
Förklaringar till symboler som används.....	7
Teknisk assistans .....	7
Bilaga 1: Skapa Check-Direct CPE Screen-testprogrammet v.4.30B eller senare .....	8
Bilaga 2: Funktionsegenskaper .....	9

## Avsedd användning

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ är ett kvalitativt *in vitro*-diagnostiskt test för snabb detektion och differentiering av karbapenemasgener från *Enterobacteriaceae* i rektala pinnprover. Check-Direct CPE Screen detekterar förekomst av karbapenemasgenerna KPC, NDM, VIM och OXA-48, som för närvarande är den primära orsaken till karbapenemasproduktion i *Enterobacteriaceae*. I analysen används BD MAX™-systemet för extraktion av DNA och efterföljande realtids-PCR med de medföljande reagenserna i kombination med universalreagenser och engångsmaterial för BD MAX™-systemet. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ kan användas som ett hjälpmedel för att identifiera, förebygga och reglera karbapenemasproducerande *Enterobacteriaceae* som koloniserar patienter i vårdmiljöer. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ är inte avsett för diagnostisering av infektioner med karbapenemasproducerande *Enterobacteriaceae* eller för att vägleda eller övervaka behandling av sådana infektioner. Parallella odlingar är nödvändiga för att påvisa organismer för epidemiologisk typbestämning, resistensbestämning och vidare bekräftande identifiering.

## Inledning och metodens princip

Den globala uppkomsten och spridningen av karbapenemresistens bland *Enterobacteriaceae* är ett allvarligt hot mot folkhälsan. Dessa organismer förknippas med hög mortalitet och har förutsättningar för spridning i stor omfattning. Den vanligaste orsaken till karbapenemresistens i *Enterobacteriaceae* är exprimering av karbapenemaser, dvs. karbapenemasproducerande *Enterobacteriaceae* eller CPE. CPE har förhöjd eller total resistens mot karbapenemer och de flesta andra  $\beta$ -laktamantibiotika. I nuläget förknippas majoriteten av CPE med förekomst av en av följande plasmidkodade karbapenemaser: KPC (Klebsiella pneumoniae karbapenemase), VIM (Verona integron-kodat metallo- $\beta$ -laktamas), NDM (New Delhi metallo- $\beta$ -laktamas) eller OXA-48 (Oxacillin-48 och OXA-48-liknande varianter). Dessutom har CPE ofta andra bestämningsfaktorer för  $\beta$ -laktamresistens, vilket medför multiläkemedels- och panläkemedelsresistenta isolat.

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ är en multiplex PCR-analys i realtid för detektion av KPC-, OXA-48-, NDM- och VIM-karbapenemasgener. Analysen bygger på specifik igenkänning och amplifiering av målsekvenser genom PCR och simultan detektion av ackumulation av PCR-amplifieringsprodukter med hjälp av fluorescerande DNA-prober. KPC, VIM, OXA-48 och NDM har många genvarianter, och Check-Direct CPE Screen är utformad för att tillförlitligt detektera de flesta andra varianterna. De varianter som detekterats och predikterats att detekteras för varje resistensgen presenteras i stycket *In silico*-specificitet i Bilaga 2. Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ använder fem olika fluorescerande prober och möjliggör detektion och urskiljning av de fyra karbapenemasgenerna och kontrollmålets SPC som övervakar DNA-extraktion och PCR-amplifiering.

## Innehåll i kitet (för 24 reaktioner)

Komponenter (mat. nr)	Beskrivning
CPE Screen-reagensrör (9-0121)	24 förslutna rör (blå förslutning)
CPE-positiv kontroll (9-0061)	1 rör (lila lock) 100 $\mu$ l
CP Mastermix (9-0122)	1 rör (grönt lock) 330 $\mu$ l
Användarhandbok (9-0124)	Broschyr – ladda ned från webbplatsen

## Material som krävs men ej medföljer kitet

Material	Utrustning
<ul style="list-style-type: none"> <li>BD MAX™ ExK DNA-1 Extraction Kit (ref:442818)</li> <li>BD MAX™ PCR Cartridges (PCR-kassetter) (ref: 437519)</li> <li>Engångshandskar (utan talk) för laboratoriebruk</li> <li>Pipetter och pipettspetsar (filter) för engångsbruk för volymerna 10 och 25 <math>\mu</math>l</li> <li>Vatten av PCR-kvalitet (t.ex. Milli-Q eller aqua bidest)</li> <li>Provpinnar och transportmedier avsedda för rektal provtagning. Rekommenderad provtagningsenhet: Copan ESwab, kat. nr 480CE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Instrument för PCR i realtid: BD MAX™ System, programversion 4.30B eller senare</li> <li>Vortexblandare</li> </ul>

## Förvaring och hållbarhet

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-kitet levereras i omgivningstemperatur och ska förvaras mörkt vid 2 till 8 °C efter mottagande. Reagenser är stabila vid 2 till 8 °C fram till det angivna utgångsdatumet. Använd inte komponenter vars hållbarhetstid har gått ut.

Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-reagensrör, PCR Mastermix och positiv kontroll medföljer i en försluten påse. Skydda reagenser från fukt genom att omedelbart återförsluta påsen efter att den öppnats. Reagensrör är stabila i upp till 14 dagar vid 2 till 8 °C efter första öppnandet och återförslutningen av påsen.

## Varningar och försiktighetsbeaktanden

- Analysen Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ är avsedd för *in vitro*-diagnostik.
- Denna produkt kan endast användas på BD MAX™-systemet.
- Använd inte kitet om etiketten som försluter ytterkartongen är bruten.
- Använd inte reagenserna om skyddspåsarna är öppna eller trasiga vid mottagandet.
- Förslut reagensskyddspåsar med blixtlåset omedelbart efter varje användning. Tryck ut överflödigt luft ur påsarna innan de försluts.
- Kontrollera att reagensremсор har tillämplig vätskefyllning (se till att vätskorna ligger på rörens botten).
- Undersök reagensremсорna för att säkerställa att alla pipettspetsar finns på plats.
- Ta inte bort torkmedlet ur reagenspåsarna.
- Använd inte reagenserna om torkmedel saknas eller är trasigt inuti reagenspåsarna.
- Använd inte reagenserna om folien har öppnats eller skadats.
- Blanda inte reagenser från olika påsar och/eller kit eller loter.
- Byt inte lock mellan enheterna eller återanvänd lock eftersom kontamination som kan äventyra testresultaten kan uppstå.
- Hantera kemiska lösningar försiktigt eftersom de kan göra streckkoden på Master Mix- och extraktionsrören oläslig.
- Använd inte reagenser och/eller material vars hållbarhetstid har gått ut.
- God laboratorieteknik är avgörande för att denna analys ska fungera korrekt. På grund av testets höga analytiska sensitivitet måste stor noggrannhet iaktas för att bevara materialens och reagensernas renhet.
- Förebygg kontamination av amplikoner genom att inte bryta isär BD MAX™ PCR-kassetter efter användning. Förseglingarna på BD MAX™ PCR-kassetterna är utformade för att förebygga kontamination.
- Utförande av analysen Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ utanför de rekommenderade tidsområdena kan ge ogiltiga resultat. Analyser som inte utförts inom angivna tidsområden för stabilitet bör upprepas med ett nytt prov.
- Ytterligare kontroller kan testas i enlighet med riktlinjer eller krav i lokala, kommunala, statliga och/eller nationella bestämmelser eller från ackrediteringsorganisationer.
- I fall där odling eller andra PCR-test också utförs i laboratoriet måste försiktighet iaktas för att säkerställa att komponenterna i Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen, eventuella övriga reagenser som behövs för testningen och BD MAX™-systemet inte kontamineras. Undvik alltid mikrobiell kontamination och kontamination med deoxyribonukleas (DNAs) av reagenserna. Byt handskar innan reagenser och kassetter hanteras.
- Hantera alltid prover som om de vore smittförande och i enlighet med säkra laborieförfaranden, till exempel de som beskrivs i CLSI Document M2911 och i Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.
- Använd skyddskläder och engångshandskar vid hantering av alla reagenser.
- Tvätta händerna noggrant efter testets utförande.
- Rök, drick, tugga eller ät inte i områden där prover eller kitreagenser hanteras.
- Kassera oanvända reagenser och avfall i enlighet med lokala, statliga, landstings- och/eller kommunala bestämmelser.
- Se BD MAX™-systemets användarhandbok för ytterligare varningar, försiktighetsbeaktanden och förfaranden.

**Läs hela protokollet innan testet påbörjas**

# Bruksanvisning

## Provberedningsförfaranden

### Testförberedelse för rektala pinnprover

**OBS!** Förfarandet för provtagning och förvaring måste följas noggrant med adekvata provtagningsenheter (se avsnitt Material som krävs men ej medföljer kitet). Rektala provpinnar innehåller varierande mängder fekalt material beroende på förfarandet för provtagningen. Check-Points föreslår validering av din provtagnings- och behandlingsmetod med Check-Direct CPE Screen före rutinmässig användning av testet.

1. Ta rektalt prov enligt lokala riktlinjer och rekommendationer från provpinnens tillverkare.
2. Överför pinnproverna till rören med flytande transportmedium.
3. Överför rektala pinnprover som ska analyseras till PCR-rummet eller förvara för senare användning enligt rekommendationer från provpinnens tillverkare och/eller lokala föreskrifter.
4. Blanda varje rör med rektalt prov en kort stund och pipettera 25 µL av transportmediet till ett DNA-provbuffertrör SB-1.
5. Förslut provbuffertröret med ett membranlock och vortexa i tio sekunder i medelhastighet.

### Beredning av kontrollreaktioner

Validera körningen genom att utföra positiv och negativ kontrollreaktion för varje Check-Direct CPE Screen PCR-körning. Positiv kontroll medföljer kitet.

- **Positiv kontroll:**  
Pipettera 10 µL positiv kontroll till ett provbuffertrör. Vortexa i tio sekunder.
- **Negativ kontroll:**  
Pipettera 10 µL vatten av PCR-kvalitet till ett provbuffertrör. Vortexa i tio sekunder.

## BD MAX™-användning

### 1. Multiplex PCR-inställning i realtid

Tabell 1 visar den multiplexa PCR-inställningen i realtid med målen detekterade i BD MAX™-systemets vardera detektorkanal.

**Tabell 1:** Multiplex qPCR-inställning

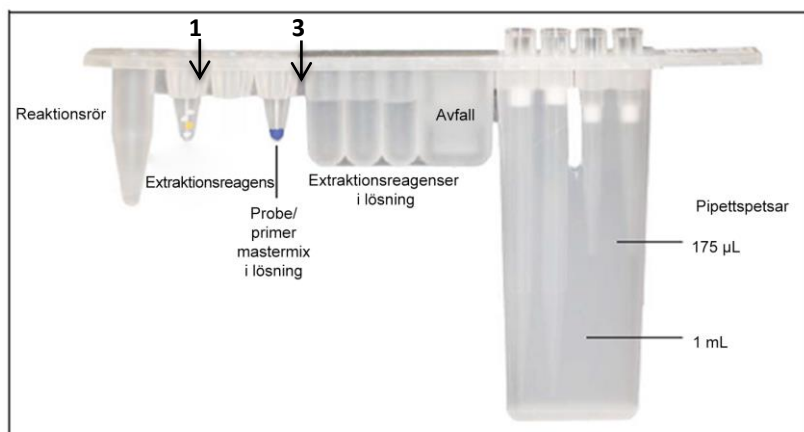
Detektor	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Kanal	1	2	3	4	5
Mål	KPC	VIM	OXA-48	NDM	SPC*

\*SPC: Provbearbetningskontroll

När testet utförs för första gången ska du skapa PCR-testprogrammet "C-D CPE Screen" enligt beskrivningen i Bilaga 1.

### 2. Förberedelse av BD MAX™-ställ

- 2.1. Ladda BD MAX™-systemets ställ med det antal sammansatta DNA-reagensremсор som behövs för det antal prover som ska testas. Knacka försiktigt på varje remsa för att säkerställa att alla vätskor ligger på behållarens botten.
- 2.2. Förbered sammansatta reagensremсор:
  - 2.2.a. Sätt de sammansatta reagensremсорna på sina platser i BD MAX™-stället. "Klicka" inte fast remсорna ännu.
  - 2.2.b. Snäpp fast ett BD Exk-1-reagensrör för DNA-extraktion (vit förslutning) i position **1** på DNA-remsan, se Figur 1.
  - 2.2.c. Snäpp fast ett CPE Screen-reagensrör (blå förslutning) i position **3** på DNA-remsan, se Figur 1.
  - 2.2.d. Stick håll i den blå förslutningen på CPE Screen-reagensröret i position **3**, t.ex. med en pipettspets för engångsbruk. Dispensera sedan försiktigt 12,5 µL CP Mastermix i botten av röret, och se till att inga bubblor bildas.
  - 2.2.e. Klicka fast de sammansatta reagensremсорna i sina platser i stället när förberedelsen av remсор är klar.



Figur 1: Förberedelse av sammansatta DNA-reagensremсор.

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

- 3.1 Öppna fliken **Run** (Kör) i BD MAX™-systemets **program v4.30B** eller senare och fyll i **Worklist** (Arbetslista).
- 3.2 Markera **Test "C-D CPE Screen"**. Se instruktioner i Bilaga 1 för att skapa "C-D CPE Screen"-testet om det inte redan finns på Test-menyn.
- 3.3 Läs in **provbuffertrörets** streckkod med streckkodsskannern (du kan också skriva in streckkoden manuellt). Börja med position 1 i ställ A. Placera vart och ett av provbuffertrören i sin respektive position i BD MAX™-ställen (med membranlock).
- 3.4 Fyll i provets eller patientens identifikationsinformation på raden **Accession** (Labnummer) i arbetslistan. Kontrollera att varje provs eller patients information motsvarar dess specifika provbuffertrör i stället.
- 3.5 Ladda stället/ställen i BD MAX™-systemet. (Ställ A sitter på instrumentets vänstra sida och ställ B på höger sida.).
- 3.6 Ladda BD MAX™ PCR-kassetten/kassetterna.
- 3.7 Stäng instrumentluckan och välj **Start Run** (Starta körning).

## Tolkning av resultat

**Viktigt att veta innan du börjar:** En detaljerad beskrivning av hur data ska analyseras finns i *BD MAX™-systemets användarhandbok*.

**Inspektera alltid amplifieringskurvan visuellt för varje prov som testas mot C<sub>T</sub>-värden som erhållits med programmet.**

### 1. Rapporterade resultat

BD MAX™-programmet rapporterar C<sub>T</sub>-värden och amplifieringskurvor för varje detektorkanal för varje prov som testas på följande sätt:

- C<sub>T</sub>-värdet **0** indikerar att inget C<sub>T</sub>-värde med det angivna tröskelvärde beräknades av programmet (se Bilaga 1). Amplifieringskurvan för provet som visar C<sub>T</sub>-värdet "0" måste kontrolleras manuellt.
- C<sub>T</sub>-värdet **-1** indikerar att ingen giltig amplifieringsprocess har skett. Kontrollera att det inte finns någon amplifieringskurva med C<sub>T</sub>-värdet -1 i de grafiska resultaten.
- Annat C<sub>T</sub>-värde ska tolkas i korrelation till amplifieringskurvan och i enlighet med de riktlinjer för tolkning som beskrivs i Tabell 2 och 3.

### 2. Tolkning

#### 2.1 Validering av körning

Bekräfta att PCR-körningen i realtid är giltig innan resultatdata tolkas. Kontrollera att det inte föreligger något rapporterat BD MAX™-systemfel. Kontrollera om tillämpligt de positiva och negativa kontrollernas amplifieringskurvor. Tabell 2 innehåller kriterier för en giltig Check-Direct CPE Screen-körning på BD MAX™-systemet. Om kontrollernas C<sub>T</sub>-värden inte är de förväntade bör du läsa Vanliga frågor (FAQ) och felsökning **3**.

Tabell 2: Kriterier för en giltig körning av ett Check-Direct CPE Screen-test.

Provtyp*	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
Positiva kontroller	32 ±3	29 ±3	28 ±3	31 ±3	28 ±3
Negativt prov	-1	-1	-1	-1	28 ±3

## 2.2 Resultattolkning

Om körningen har validerats tolkar du resultat som positiva, negativa eller olösta med de C<sub>T</sub>-värden som erhållits för proverna enligt de sammanfattade riktlinjerna i Tabell 3. Kontrollera alltid att amplifieringskurvan för varje prov stämmer överens med C<sub>T</sub>-värdena och resultattolkningen från programmet. Olösta körningar bör testas igen.

**Tabell 3:** Riktlinjer för tolkning av data för rektala pinnprover.

KPC, VIM, OXA, NDM C <sub>T</sub> -värden	SPC C <sub>T</sub> -värden	Tolkning
JA	JA	Positivt prov
-1	28 ± 3	Negativt prov
-1	<25 eller >32	Olöst
-1 eller JA	-1	Olöst

### VIKTIGT:

- JA betyder att ett C<sub>T</sub>-värde finns och anges i resultattabellen.
- Ett positivt testresultat indikerar inte alltid förekomst av livsdugliga organismer i det testade provet.
- C<sub>T</sub>-värden för rektala pinnprover kan variera stort på grund av skillnader i fekalt material och "bakteriekoncentration" för rektala provpinnar i transportmedium.
- Om resultaten från BD MAX™-systemet är obestämda eller ofullständiga (IND eller INC) på grund av fel i BD MAX™-systemet ska du kontakta närmaste BD-representant.

## Vanliga frågor (FAQ) och felsökning

Se avsnittet om felsökning i BD MAX™-systemets användarhandbok för ytterligare information.

- 1. Realtidsresultat visar inga C<sub>T</sub>-värden eller tolkningen indikerar att provet är olöst.** Möjliga orsaker och felsökning:
  - PCR-reaktionen har inhiberats av exogena eller endogena substanser. Upprepa provtestningen. Om den fortfarande är inhiberad kan en mindre provmängd eventuellt förbättra resultaten.
  - DNA-extraktionen misslyckades eftersom SPC inte detekterades.
  - Hållbarhetstiden för CPE Screen-reagensen eller CP Mastermix kan ha gått ut.
  - Ett fel i vätskehantering har inträffat: kontrollera sammansatta reagensremсор och PCR-kassetten för att fastställa var vätskehanteringsproblemet har inträffat (exempel: luftbubbla i kassetten) och kör provet igen. Kontakta närmaste BD-representant om problemet kvarstår.
- 2. Felsökning för olösta resultat.**  
För olösta resultat: Upprepa testet med det ursprungliga provet genom att bereda ett nytt provbuffertrör. Alternativt, testa ett nytaget prov eller använd en mindre mängd av provet.
- 3. Realtidsresultat visar inga C<sub>T</sub>-värden för den positiva kontrollen eller tolkningen indikerar att provet är olöst.**  
Möjliga orsaker och felsökning:
  - Den positiva kontrolllösningen har inte tillförts.
  - Hållbarhetstiden för CPE Screen-reagensen eller CP Mastermix kan ha gått ut.
  - Luftbubblor har uppstått i den positiva kontrollens PCR-reaktionskammare.
- 4. Realtidsresultaten visar mycket låga fluorescenssignaler i alla prover och detektorkanaler, inklusive SPC-signalen.**  
Möjliga orsaker och felsökning:
  - CPE Screen-reagensrören med fluorescerande prober och primrar kan ha försämrats. Kontrollera utgångsdatum och fastställ att CPE Screen-rören har förvarats på rätt sätt.
  - BD MAX™-systemet kan vara ansvarigt för dessa resultat. Se BD MAX™-användarhandboken eller kontakta närmaste BD-representant.
- 5. BD MAX™-systemet anger ett fel eller driftstopp.**  
Se BD MAX™-instrumentets användarhandbok eller kontakta närmaste BD-representant.
- 6. Dubblettprover som testas med Check-Direct CPE Screen-analys ger inte identiska resultat.**  
C<sub>T</sub>-värden för identiska prover kan variera mellan enskilda reaktioner. Stora variationer, >2 C<sub>T</sub>-värden, tyder på pipetteringsfel eller andra skillnader mellan dubblettproverna.

## Begränsningar

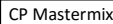
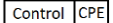








Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ använder en rad olika DNA-markörer för att detektera förekomst av karbapenemasgenerna KPC, NDM, OXA-48 och VIM, som för närvarande är de kliniskt mest förekommande karbapenemaserna. Testet detekterar alla nu kända varianter av KPC, NDM, OXA-48 och VIM, förutom VIM-7, som är en sällsynt variant som endast förekommer i *Pseudomonas aeruginosa*. Observera att andra sällsynta släkter av karbapenemasgener inte detekteras. Testet är endast avsett för användning med rektala pinnprover i transportmedium som ingångsmaterial.

Kvaliteten på ingående DNA är en viktig faktor för att få tillförlitliga resultat med Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. DNA måste extraheras från rektala pinnprover med de enheter och förfaranden som beskrivs i den här handboken. Analysen har genomgått omfattande testning med DNA renat från gramnegativa bakterier som *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* och *Pseudomonas* med utmärkta resultat. Det kan dock aldrig uteslutas att andra gramnegativa bakterier eller vissa stammar av ovanstående arter ger dåliga resultat. Check-Direct CPE Screen kan inte, och har inte utgetts för att kunna, korrekt detektera karbapenemasgener i alla gramnegativa arter, underarter eller typer eller i alla kliniska prover. Resultat kan behöva bekräftas med ytterligare metoder i det enskilda fallet (t.ex. för prover enligt föreskrifter). På grund av den omfattande variansen av bakteriers genuppsättningar är det möjligt att vissa undertyper inte detekteras. Testet reflekterar den aktuella kännedomen i Check-Points Health B.V.

Ett positivt testresultat indikerar inte alltid förekomst av livsdugliga organismer i det testade provet. Karbapenemas-DNA kan ha detekterats från livsodugliga organismer.

Förekomst av flera bakteriearter i ett prov kan hämma tolkningen av testet. Som med andra diagnostiska analyser ska resultaten från detta test endast tolkas i kombination med ytterligare laboratorie- och kliniska data som den ansvariga personen har tillgång till. Användning av den här analysen är begränsad till vederbörligen kompetent personal som är väl utbildad i att tillämpa DNA-baserade, molekylära detektionsmetoder.

## Förklaringar till symboler som används

Symbol	Definition
	CP Mastermix
	CPE-kontroll
	Avsedd för <i>in vitro</i> -diagnostik
	Katalognummer
	Batchkod
	Använd före ÅÅÅÅ-MM
	Se bruksanvisningen
	Tillverkare
	Temperaturbegränsning
	Innehållet räcker till < n > test

## Teknisk assistans

support@check-points.com

**+31 317 453 908**

Trots största möjliga omsorg vid utarbetande och förberedelse av protokollet kan Check-Points inte ansvara för fel, utelämnanden och/eller framtida ändringar häri.

**Litteraturhänvisning:** Vid beskrivning av ett förfarande för publicering under användning av denna produkt ber vi att den refereras till som *Check-Direct CPE Screen*.

### Meddelande till köparen:

Denna produkt säljs på licens från PHRI Properties och får endast användas under PHRI Properties patenträttigheter för human *in vitro*-diagnostik, livsmedelstestning, veterinärmedicinsk testning eller forskning. Färgämnen och inhiberaröreningar i produkten säljs på licens från Biosearch Technologies, Inc. och skyddas i USA och globalt av patent som antingen är utfärdade eller sökta. Licensställståndet omfattar tillämpningar för human *in vitro*-diagnostik (IVD).

### Varumärken

BD, BD MAX™ är varumärken som tillhör Becton Dickinson GmbH.

**Check-Points Health BV**  
 Binnenhaven 5  
 6709 PD Wageningen  
 Nederländerna

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





## Bilaga 1: Skapa Check-Direct CPE Screen-testprogrammet v.4.30B eller senare

**Viktigt att veta innan du börjar:** Se BD MAX™-systemets användarhandbok för detaljerade anvisningar om användning av BD MAX™-systemet och **programversion 4.30B eller senare**.

När du vill skapa ett nytt test öppnar du fliken **Test Editor** (Testredigeraren), väljer **Create** (Skapa) och följer dessa instruktioner:

- På fliken **Basic Information** (Grundläggande information) anger du följande parametrar:
  - Test Name** (Testets namn): *C-D CPE Screen*
  - Extraction Type** (Extraktionstyp): Välj *Exk DNA-1* (Plasma/Serum)
  - Master Mix Format**: Välj *Type 3: Liquid MM with Primers and Probes* (MM i lösning med primrar och prober)
  - Sample Extraction Parameters** (Provextraktionsparametrar): Välj *User defined* (Användardefinierade) och justera *sample volume* (provvolym) till 600 µL, se Tabell A
  - Ct Calculation** (Ct-beräkning): Välj *Call Ct at inflection point* (Anropa Ct vid inflexionspunkt).

### Spara parametrarna.

- På fliken **PCR Settings** (PCR-inställningar) anger du följande parametrar:
  - Alias, PCR Gain och Threshold** (Alias, PCR-förstärkning och Tröskelvärde): Ange för varje kanaldetektor korrekta parametrar som specificeras i Tabell B
  - Color compensation** (Färgkompensation): Ange korrekta parametrar som specificeras i Tabell C.

### Spara parametrarna.

- I **Test Steps** (Testets steg) anger du PCR-stegen som specificeras i Tabell D.

### Spara parametrarna.

**Tabell A:** Sample Extraction Parameters (Provextraktionsparametrar).

Parameters (Parametrar)	Value (Värde)
Lysis Heat Time (Lyseringsvärmningstid)	10
Lysis Temperature (Lyseringstemperatur)	37
Sample Tip Height (Provspets höjd)	1 600
<b>Sample Volume</b> (Provvolym)	<b>600</b>
Wash Volume (Tvättvolym)	500
Neutralization Volume (Neutraliseringsvolym)	----
DNase Heat Time (DNas-värmningstid)	----

**Tabell B:** Parametrar för Alias, PCR Gain, Threshold.

Detector (Detektor)	Alias	Gain (Förstärkning)	Threshold (Tröskel)
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 (Parametrar för spektral överhörning).

	False Receiving Channel (Kanal med falsk mottagning)					
	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	

**Tabell D:** Test PCR Steps parameters (Parametrar för PCR-teststeg).

Step Name (Stegets namn)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Cykler)	Time (s) (Tid (s))	Temp. (°C)	Detect (Detektera)
Denaturation (Denaturering)	Hold (Paus)	1	600	98	NEJ
Amplification & Detection (Amplifiering och detektion)	2 – temperatur	50	15	98	NEJ
			62	60	JA



## Bilaga 2: Funktionsegenskaper

### Detektionsgräns för rektala pinnprov

Den analytiska detektionsgränsen (LoD) för Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ bestämdes med rektala provpinnar spetsade med väldefinierade mängder målbakterier. E-swab Amies transportmedium (Copan) ”provades” med cirka 10 mg/mL humanfeces för att efterlikna ett typiskt rektalt pinnprov. Stammar innehållande målkarbapenemasgener odlades över natten och cellsuspensioner bereddes i Milli-Q-vatten med densiteten 0,5 McFarland. Cellsuspensionerna användes till att spetsa de artificiella rektala pinnproverna för att skapa prover med en väldefinierad mängd fekalt material och målbakterier.

Ett stort antal prover skapade enligt ovan användes i utvärderingen av den analytiska detektionsgränsen (LoD) enligt protokollet som beskrivs på sida 4 och 5 i denna användarhandbok. Resultaten redovisas i tabellen nedan. SBT avser BD MAX™-provbuffertröret.

Mål	CFU per SBT	CFU/PCR	Andel lyckade resultat
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 för det diagnostiska realtidstestet Check-Direct CPE Screen säkerställs genom val av rätt primrar och prover samt val av strikta reaktionsförhållanden. Primrarnas och probernas sekvenser utformades till att specifikt identifiera de genvarianter som anges i tabellen nedan. En hundraprocentig sekvensmatchning med primrar och prover genom *in silico*-analys antogs för att försäkra tillförlitlig detektion av alla beskrivna varianter. Enstaka dåliga matchningar med primrar och prover förekom för vissa varianter vilka vi förväntade oss inte skulle påverka detektionen. Detta bekräftades genom testning av sådana varianter i jämförelse med andra som var 100 % homologa.

Primer- och probsekvenser testades för eventuella homologier med gener från andra organismer med alla gensekvenser som fanns i den internationella genbanken den 1 april 2014. (GenBank, NIH:s genetisk sekvensdatabas) med sekvensjämförelseanalys. Ingen korshomologi med andra organismer hittades för de valda primrarna och proberna.

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

## Analytisk specificitet

Den analytiska specificiteten för det diagnostiska realtidstestet Check-Direct CPE Screen fastställdes genom testning av korsreaktiviteten med prover innehållande en stor mängd icke-målorganismer. Specificiteten för realtidstestet Check-Direct CPE Screen testades med hjälp av 103 karbapenemasnegativa stammar. Tabellen nedan innehåller en översikt över dessa stammar. Alla isolat hade negativt testresultat i Check-Direct CPE Screen-analysen, och den interna kontrollen detekterades tillförlitligt i alla prover. Specificiteten var 100 % baserat på testade referensstammar.

Arter	Testade stammar
<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

En retrospektiv studie utfördes med 93 bakteriestammar från 14 olika gramnegativa arter som dessförinnan identifierats som karbapenemaspositiva med Check-Points diagnostiska mikromatrisanalys Check-MDR CT103 (Check-Points Health). Alla 93 bakteriestammar typbestämdes korrekt för de karbapenemasgener som var målet. Resultaten redovisas i tabellen nedan. Inklusiviteten för alla stammar som testades var 100 %.

Antal testade stammar	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

## Kliniska prestanda

Kliniska prestanda för Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen utvärderades i tre separata, prospektiva studier som omfattade fyra europeiska kliniker. Förekomsten av CPE (karbapenemasproducerande enterobacteriaceae) utan utbrott är låg, så det är svårt att införskaffa färskare prover som innehåller CPE. Prospektiva prover kompletterades därför med konstruerade prover (välkarakteriserade isolat som den negativa rektala pinnprovsmatrisen spetsades med) som kompensation för den ringa mängden positiva prover. Rektala pinnprover som tagits rutinmässigt i patientvård testades med Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysen och jämfördes med en referensodlingsmetod (ChromID ESBL eller ChromID Carba Smart selektivt odlingsmedium). Prospektiva odlingspositiva kliniska prover bekräftades med genspecifika PCR:er.

Sammanlagt 1 203 rektala pinnprover testades, varav 30 (2,5 %) prover gav inkonklusiva resultat och därför uteslöts från de resultat som redovisas nedan. 41 av de 1 173 prover som ingår i resultatet var konstruerade prover innehållande välkarakteriserade KPC-, VIM-, OXA-48- eller NDM-positiva bakteriestammar. Övergripande prestanda och prestanda för Check-Direct CPE Screen for BD MAX™-analysens mål redovisas nedan.

I förhållande till referensmetoden uppvisade Check-Direct CPE Screen-analysen en övergripande sensitivitet och specificitet på 98,5 % respektive 96,8 % för den sammanlagda uppsättningen konstruerade och prospektiva prover (se tabellen nedan).

### Övergripande Check-Direct CPE Screen-prestanda jämfört med referensmetod

CPE		Odling		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE Screen-PCR	+	67	35	102
	-	1	1 070	1 071
Totalt		68	1 105	1 173

Sensitivitet: 98,5 % (67/68)

Specificitet: 96,8 % (1 070/1 105)

### Check-Direct CPE Screen-prestanda jämfört med referensmetod för KPC

KPC		Odling		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE Screen-PCR	+	28	8	36
	-	1	1 136	1 137
Totalt		29	1 144	1 173

Sensitivitet: 96,6 % (28/29)

Specificitet: 99,3 % (1 136/1 144)

### Check-Direct CPE Screen-prestanda jämfört med referensmetod för OXA-48

OXA-48		Odling		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE Screen-PCR	+	13	8	21
	-	0	1 152	1 152
Totalt		13	1 160	1 173

Sensitivitet: 100 % (13/13)

Specificitet: 99,3 % (1 152/1 160)

### Check-Direct CPE Screen-prestanda jämfört med referensmetod för VIM

VIM		Odling		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE Screen-PCR	+	15	19	34
	-	0	1 139	1 139
Totalt		15	1 158	1 173

Sensitivitet: 100 % (15/15)  
 Specificitet: 98,4 % (1 139/1 158)

### Check-Direct CPE Screen-prestanda jämfört med referensmetod för NDM

NDM		Odling		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE Screen-PCR	+	11	0	11
	-	0	1 162	1 162
Totalt		11	1 162	1 173

Sensitivitet: 100 % (11/11)  
 Specificitet: 100 % (1 162/1 162)