

# Manuel de l'utilisateur

## Check-Direct CPE Screen for BD MAX™

Pour la détection et la différenciation des gènes de carbapénèmases présents dans les entérobactéries à partir d'écouvillons rectaux

Version 1.5

Date de publication : 20/07/2017

REF

18-0051



24

CE IVD

### Table des matières

Utilisation prévue .....	2
Introduction et explication de la méthode .....	2
Contenu de la trousse (pour 24 réactions) .....	2
Matériel requis mais non fourni avec la trousse .....	2
Conservation et stabilité .....	2
Mises en garde et précautions .....	3
Mode d'emploi .....	4
Procédures de préparation de l'échantillon .....	4
Fonctionnement du BD MAX™ .....	4
Interprétation des résultats .....	5
Foire aux questions (FAQ) et dépannage .....	6
Limitations .....	7
Explication des symboles .....	7
Assistance technique .....	7
Annexe 1 : Création du programme Check-Direct CPE Screen v.4.30B ou plus.....	8
Annexe 2 : Caractéristiques des performances .....	9

## Application prévue

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

## Introduction et principes de la méthode

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

La trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ est un test multiplex pour PCR en temps réel (RT-PCR) permettant l'amplification et la détection des gènes codant pour les carbapénèmases KPC, OXA-48, NDM et VIM. Le test est basé sur la reconnaissance et l'amplification spécifique des séquences cibles par PCR, ainsi que sur la détection simultanée de l'accumulation des produits d'amplification PCR par des sondes d'ADN fluorescentes. Pour KPC, VIM, OXA-48 et NDM de nombreuses variantes des séquences cibles existent, et la trousse Check-Direct CPE Screen a été conçu pour détecter de manière fiable la majorité des variantes. Les souches détectées et susceptibles d'être détectées pour chaque gène de résistance sont présentées dans le paragraphe nommé « Spécificité *in silico* » présent à l'annexe 2. La trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ utilise cinq sondes fluorescentes différentes permettant la détection et la discrimination des 4 gènes codant pour les carbapénèmases et du contrôle interne du traitement de l'échantillon (SPC). Le contrôle interne du traitement de l'échantillon surveille la présence de substances potentiellement inhibitrices, ainsi que les dysfonctionnements du système ou des réactifs.

## Contenu de la trousse (pour 24 réactions)

Contenu (N° mat.)	Description
Tubes de réactif CPE Screen (9-0121)	24 tubes scellés (opercule bleu)
Contrôle positif CPE (9-0061)	1 tube (bouchon violet) 100 $\mu$ l
Mélange réactionnel CP (9-0122)	1 tube (bouchon vert) 330 $\mu$ l
Manuel de l'utilisateur (9-0124)	Brochure - à télécharger depuis le site internet

## Matériel requis mais non fourni avec la trousse

Matériels	Équipement
<ul style="list-style-type: none"> <li>Trousse d'extraction BD MAX™ ExK DNA-1 (réf. : 442 818)</li> <li>Cartouches PCR BD MAX™ (Réf : 437 519)</li> <li>Gants de laboratoire jetables (sans poudre)</li> <li>Pipettes &amp; embouts stériles avec filtre pour des volumes de 10 et 25 <math>\mu</math>l</li> <li>Eau de qualité PCR (par exemple Milli-Q ou aqua-bidest)</li> <li>Écouvillons et milieu de transport requis pour le prélèvement d'échantillons rectaux.</li> </ul> Trousse de prélèvement d'échantillon recommandé : Copan ESwab, N° de cat.480CE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Instrument PCR en temps réel : système BD MAX™, version logicielle 4.30B ou ultérieure</li> <li>Vortex</li> </ul>

## Conservation et stabilité

La trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ est envoyée à température ambiante et doit être conservée à l'abri de la lumière, à une température comprise entre 2 et 8 °C dès réception. Les réactifs sont stables à une température entre 2 et 8 °C, et ce jusqu'à la date de péremption indiquée. Ne pas utiliser de composantes périmées.

Les tubes réactifs Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, le mélange réactionnel PCR et le contrôle positif sont fournis dans un sachet scellé. Pour protéger les réactifs de l'humidité, rescellez immédiatement le sachet après ouverture. Les tubes de réactifs sont stables pour une durée allant jusqu'à 14 jours lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 8°C après ouverture initiale et refermeture du sachet.

## Avertissements et précautions

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

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

# Conseils d'utilisation

## Procédures de préparation de l'échantillon

### Préparation des prélèvements rectaux

**Remarque :** Suivre attentivement les méthodes de prélèvement et de stockage des échantillons et utiliser un dispositif de collection d'échantillons adéquat (voir la section *Matériel nécessaire mais non fourni avec la trousse*). La quantité de matières fécales contenues dans les écouvillons rectaux varie en fonction de la méthode de prélèvement utilisée. Check-Points recommande de valider votre procédure pour la collecte et la préparation des échantillons avec la trousse Check-Direct CPE Screen avant l'utilisation du test en routine.

1. Récolter les spécimens rectaux en suivant les recommandations locales et du fabricant.
2. Transférer les écouvillons rectaux dans les tubes contenant le milieu de transport.
3. Transférer les écouvillons rectaux à analyser dans la salle PCR ou les conserver jusqu'à utilisation ultérieure selon les conseils du fabricant de l'écouvillon et/ou selon les réglementations locales.
4. Mélangez brièvement chaque tube contenant l'écouvillon rectal et pipettez 25 µL du milieu de transport dans un des tubes de tampon d'échantillon BD MAX™ (SB-1).
5. Fermez le tube de tampon d'échantillon BD MAX™ avec un bouchon pre-percé et vortexez 10 secondes à vitesse moyenne.

### Préparation des contrôles

Pour valider la réaction PCR et pour l'interprétation des résultats, il est nécessaire d'effectuer un contrôle positif et négatif pour chaque série PCR faite avec la trousse Check-Direct CPE Screen. Le contrôle positif est fourni avec la trousse.

- **Contrôle positif :**  
Pipettez 10 µL du contrôle positif dans un tube de tampon d'échantillon BD MAX™. Mélangez au vortex pendant 10 secondes.
- **Contrôle négatif :**  
Pipettez 10 µL d'eau de qualité PCR dans un tube de tampon d'échantillon BD MAX™. Mélangez au vortex pendant 10 secondes.

## Utilisation du BD MAX™

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

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

**Tableau 1 :** Configuration du Multiplex qPCR

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

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

Lorsque le test est effectué pour la première fois, créez le programme PCR « C-D CPE Screen » comme décrit dans l'annexe 1.

### 2. Préparation du portoir BD MAX™

- 2.1. Chargez les portoirs BD MAX™ avec le nombre nécessaire de barrettes réactives unitarisées pour le nombre d'échantillons à tester.  
Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent dans le fond du tube.
- 2.2. Préparez les barrettes réactives unitarisées :
  - 2.2.a. Placer une barrette réactive à l'unité dans leurs positions sur le portoir BD MAX™. Ne pas « enclencher » les barrettes réactives pour le moment.
  - 2.2.b. Clipser le tube de réactif d'extraction d'ADN BD Exk-1 (opercule blanc) en position **1** de la bande d'ADN, voir figure 1.
  - 2.2.c. Clipser un tube de réactif CPE Screen (opercule bleu) en position **3** de la bande d'ADN, voir figure 1.
  - 2.2.d. Percer l'opercule bleu du tube de réactif CPE Screen en position **3**, *par exemple* avec un embout jetable de pipette. Déposer ensuite, avec précaution, 12,5 µL du mélange réactionnel CP au fond du tube en veillant à ne pas créer de bulles d'air.
  - 2.2.e. Lorsque la préparation des barrettes et des tubes de réactif est terminée, enclencher les barrettes réactives unitarisées dans le portoir BD MAX™.

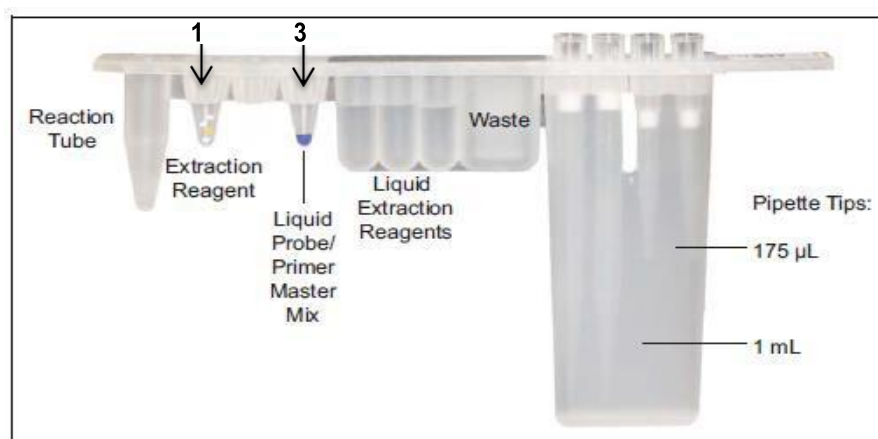


Figure 1 : Configuration de la barrette réactive unitarisée d'ADN

### 3. Utilisation du Système BD MAX™

- 3.1 Ouvrez l'onglet **Série** du Système BD MAX™ (**logiciel v4.30B** ou ultérieur) et remplissez la **Liste de travail**.
- 3.2 Sélectionnez le **Programme** « C-D CPE Screen ». Voir l'annexe 1 pour créer le programme « C-D CPE Screen » si celui-ci n'apparaît pas dans le menu Programme.
- 3.3 Entrez le code-barres du **tube de tampon d'échantillon** en scannant le code-barres (ou en l'entrant manuellement). Commencez avec la position 1 du support A. Placez chacun des tubes de tampon d'échantillon BD MAX™ à sa position correspondante dans les portoirs BD MAX™ (avec bouchon pré-percé).
- 3.4 Entrez les informations d'identification du patient ou de l'échantillon dans la ligne **No D'Examen** de la Liste de travail. Vérifiez que les informations de l'échantillon ou du patient correspondent au tube de tampon d'échantillon BD MAX™ respectif dans le portoir.
- 3.5 Chargez le(s) portoir(s) dans le système BD MAX™. (Le portoir A est positionné du côté gauche de l'instrument et le portoir B du côté droit.)
- 3.6 Chargez la/les cartouche(s) PCR BD MAX™.
- 3.7 Fermez la porte de l'appareil, puis sélectionnez **Démarrer**.

## Interprétation des résultats

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

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

### 1. Résultats rapportés

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

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

## 2. Interprétation

### 2.1 Validation des résultats

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

Tableau 2 : Critères pour une analyse valide du test Check-Direct CPE Screen.

Type d'échantillon*	C <sub>T</sub> 475/520 KPC	C <sub>T</sub> 530/565 VIM	C <sub>T</sub> 585/630 OXA-48	C <sub>T</sub> 630/665 NDM	C <sub>T</sub> 680/715 SPC
Témoins positifs	32 ± 3	29 ± 3	28 ± 3	31 ± 3	28 ± 3
Échantillon négatif	-1	-1	-1	-1	28 ± 3

## 2.2 Interprétation des résultats

Si le test est valide, interprétez les résultats comme positifs, négatifs ou non résolus selon les valeurs de  $C_T$  obtenues pour chaque échantillon en suivant les directives résumées dans le tableau 3. Veillez à toujours vérifier que la courbe d'amplification de chaque échantillon soit en accord avec les valeurs de  $C_T$  obtenues et l'interprétation des résultats rapportés par le logiciel. Les échantillons non résolus doivent être répétés.

**Tableau 3 :** Guide d'interprétation des données provenant d'écouillons rectaux.

KPC, VIM, OXA, NDM Valeurs $C_T$	SPC Valeurs $C_T$	Interprétation
OUI	OUI	Échantillon positif
-1	$28 \pm 3$	Échantillon négatif
-1	<25 ou >32	Non résolu
-1 ou OUI	-1	Non résolu

### NOTES IMPORTANTES :

- OUI signifie qu'une valeur de  $C_T$  est observée et rapportée dans le tableau des résultats.
- Un résultat positif n'indique pas forcément la présence d'organismes viables dans l'échantillon testé.
- Les valeurs de  $C_T$  obtenues pour les prélèvements rectaux peuvent largement varier en raison des différences entre matières fécales et des différentes « charges bactériennes » présentes lors du transport.
- Si le système BD MAX™ donne un résultat indéterminé ou incomplet (IND ou INC) en raison d'une défaillance du système, contactez votre représentant local BD.

## Foire aux questions (FAQ) & dépannage

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

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

## Limitations






La trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ utilise une gamme de marqueurs d'ADN spécifiques pour la détection de la présence des gènes de carbapénèmase KPC, NDM, OXA-48, et VIM, qui représentent actuellement les carbapénémases les plus répandus cliniquement. Le test détecte toutes les variantes actuellement connues de KPC, NDM, OXA-48 et VIM, sauf VIM-7, une variante rare trouvée seulement chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il convient de noter que d'autres familles de gènes de carbapénèmase rares ne sont pas détectées. Le test est uniquement destiné à être utilisé avec des écouvillons rectaux maintenus dans un milieu de transport.

La qualité de l'ADN extrait est un facteur important pour l'obtention de résultats fiables avec la trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. L'ADN doit être extrait de prélèvements rectaux en utilisant les dispositifs et les procédures décrites dans ce manuel. Le test a été largement testé avec de l'ADN purifié à partir de bactéries Gram négatif, telles que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Pseudomonas*, et a obtenu d'excellents résultats. Cependant, il ne peut être exclu que d'autres bactéries Gram négatif ou d'autres souches parmi les espèces décrites ci-dessus donneront des résultats médiocres. La trousse Check-Direct CPE Screen ne peut garantir une détection précise des gènes de carbapénémases pour toutes les espèces et sous-espèces de bactéries Gram négatif ou autres types et pour tous les types d'échantillons cliniques. Dans certains cas spécifiques (par exemple pour les échantillons réglementaires), les résultats peuvent nécessiter une confirmation à l'aide de méthodologies supplémentaires. En raison de la grande variabilité des génomes bactériens, il est possible que certains sous-types ne puissent être détectés. Le test reflète l'état des connaissances des affaires médicales Check-Points B.V.

Un résultat positif n'indique pas forcément la présence d'organismes viables dans l'échantillon testé. L'ADN de carbapénèmase peut avoir été détecté à partir d'organismes non viables.

La présence de plusieurs espèces bactériennes dans un même échantillon peut entraver l'interprétation du test. Comme pour tous les autres tests diagnostiques, les résultats obtenus ne peuvent être interprétés qu'en corrélation avec les données cliniques et de laboratoire complémentaires accessibles à la personne responsable. L'utilisation de ce test est limitée aux personnes formées de manière adéquate et plus particulièrement sur les méthodes de biologie moléculaire.

## Explication des symboles

Symbole	Définition
CP Mastermix	Mélange Réactionnel CP
Control CPE	Contrôle CPE
IVD	Pour un diagnostic <i>In Vitro</i>
REF	Numéro de catalogue
LOT	Code du lot
	Utiliser avant AAAA-MM
	Consultez les instructions d'utilisation
	Fabricant
	Température limite
	Contenu suffisant pour <n> tests

## Assistance technique

support@check-points.com

+31 317 453 908

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

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

### Avis à l'acheteur :

Ce produit est vendu sous licence et propriété de PHRI et peut être utilisé uniquement selon des droits exclusifs au brevet PHRI et ce pour le diagnostic *in vitro* humain, les tests alimentaires, tests vétérinaires, ou la recherche. Les composés colorants ou « quencher » de ce produit sont vendus sous licence de Biosearch Technologies, Inc. et protégés par les brevets américains et mondiaux soit pour l'émission ou soit pour l'application. La concession de licence couvre les marques commerciales à applications pour diagnostic *in vitro* (DIV) humain.

### Marques commerciales

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

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

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





## Annexe 1 : Création du programme de test Check-Direct CPE Screen v.4.30B ou plus

**Points importants avant de commencer** : Reportez-vous au manuel d'utilisation du système BD MAX™ pour obtenir les instructions détaillées sur la façon de faire fonctionner le système BD MAX™ et la **version logicielle 4.30B ou ultérieure**.

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

1. Dans l'onglet **Informations de base**, entrez les paramètres suivants :

- Nom du test : C-D CPE Screen.
- Type d'extraction : Sélectionnez *ExK DNA-1 (Plasma/Sérum)*.
- Format Master Mix : Sélectionnez *Type 3* : Liquide MM avec amorces et sondes.
- Paramètres d'extraction de l'échantillon : Sélectionnez *l'utilisateur défini* et réglez le *volume de l'échantillon* à 600µl, voir le tableau A.
- Calcul Ct : Sélectionnez Résultats Ct au point d'inflexion.

**Sauvegardez les paramètres**

2. Dans l'onglet **Paramètres de PCR** entrez les paramètres suivants :

- Alias, Gain PCR, et seuil : Pour chaque détecteur de canal, entrez les paramètres spécifiés dans le tableau B.
- Compensation de couleur : Saisissez les paramètres spécifiés dans le Tableau C.

**Sauvegardez les paramètres**

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

**Sauvegardez les paramètres**

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

Paramètres	Valeur
Temps de chauffage de la lyse	10
Température de la lyse	37
Hauteur embout échantillon	1600
<b>Volume d'échantillon</b>	<b>600</b>
Volume de lavage	500
Volume de neutralisation	----
Temps de chauffage DNase	----

**Tableau B** : Alias, Gain PCR, paramètres de seuil.

Détecteur	Alias	Gain	Seuil
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

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

	Canal récepteur incorrect					
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Canal d'excitation	475/520		0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0		0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0		7.4	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0		0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	4,4	

**Tableau D** : Paramètres du test PCR

Nom de l'étape	Type de profil	Cycles	Temps (s)	Temp. (°C)	Détecteur
Dénaturation	Maintenir	1	600	98	NON
Amplification et détection	2 - température	50	15	98	NON
			62	60	OUI



## Annexe 2 : caractéristiques des performances

### Limite de détection avec écouvillons rectaux

La limite analytique de détection (LoD) de la trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ a été déterminée à l'aide d'écouvillons rectaux inoculés avec des quantités définies de bactéries cibles. Les écouvillons avec milieu de transport Amies (Copan) ont été inoculés avec environ 10 mg/ml de selles humaines représentant un écouvillon rectal typique. Les souches contenant les gènes carbapénémase cibles ont été cultivées dans la nuit et les suspensions cellulaires ont été préparées dans de l'eau Milli-Q avec une densité de 0,5 McFarland. Ces suspensions de cellules ont été utilisées pour inoculer les prélèvements rectaux artificiels afin de créer des échantillons avec une quantité bien définie de matière fécale et de bactéries cibles.

Une grande quantité de spécimens créés comme décrit précédemment ont été utilisés pour évaluer la limite de détection analytique (LoD) selon le protocole décrit aux pages 4 et 5 du présent manuel d'utilisation. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous. SBT fait référence au Tube de tampon échantillon BD MAX™.

Cible	UFC par SBT	CFU/PCR	Taux de réussite
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 %

### Spécificité *in silico*

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

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

Gène carbapénémase	Variantes détectées
KPC	1-17
NDM	1 - 10
VIM	1-6 et 8-38
OXA-48	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247, 370

## Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de diagnostic Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ a été déterminée en testant la réactivité croisée avec des échantillons contenant des espèces apparentées phylogénétiquement susceptibles d'être présents dans des échantillons de selles, mais non-cibles. 103 souches de négative pour les carbapénèmases ont été utilisées pour tester la spécificité du test PCR Check-Direct CPE Screen. Un aperçu de ces souches est décrit dans le tableau ci-dessous. Tous les isolats ont produit des résultats négatifs lors de l'analyse avec la trousse Check-Direct CPE Screen et tous les contrôles internes ont été détectés adéquatement dans tous les échantillons. La spécificité était de 100 % par rapport aux souches de référence testées.

Espèces	Souches testées
<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

## Inclusivité analytique

Une étude rétrospective a été réalisée avec 93 souches bactériennes de 14 espèces Gram négatif différentes. Ces souches ont précédemment été identifiées comme étant positives pour les carbapénèmases avec le test de diagnostic Check-MDR CT103 (Check-Points Health) de Check-Points. Les 93 souches bactériennes ont été détectées correctement pour les gènes carbapénèmases ciblés. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous. L'inclusivité était de 100 % pour les souches testées.

Nombre de souches testées	Check-MDR CT103 Résultat	Résultat du Check-Direct CPE Screen
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

## Performance clinique

La performance clinique de la trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ a été évaluée dans le cadre de trois études prospectives distinctes impliquant quatre centres cliniques européens. La prévalence des EPC (*entérobactéries* productrices de carbapénèmases) en l'absence d'épidémie est faible, et il est difficile d'obtenir des échantillons récents contenant des EPC. Par conséquent, les échantillons prospectifs ont été complétés avec des échantillons artificiels (inoculation de matrice fécale négative avec des isolats caractérisés) pour compenser le faible nombre d'échantillons positifs. Les écouvillons rectaux ont été recueillis dans le cadre des soins de routine administrés aux patients participant à l'étude. Ces échantillons ont été testés avec la trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ en comparaison avec la méthode de culture de référence (milieu de culture sélectif ChromID BLSE ou ChromID Carba Smart).

Les échantillons cliniques prospectifs dont la culture est positive ont été confirmés par des PCR alternatifs spécifiques au gène.

Un total de 1 203 écouvillons rectaux ont été testés, 30 (2,5 %) d'entre eux ont donné des résultats non concluants et ont donc été exclus de l'analyse présentée ci-dessous. 41 des 1 173 échantillons inclus dans les résultats étaient des échantillons artificiels contenant des souches bactériennes caractérisées comme étant positives KPC, VIM, OXA-48 ou NDM. La performance globale et les performances par cible de la trousse Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ sont présentées ci-dessous.

Par rapport à la méthode de référence, l'analyse de la trousse Check-Direct CPE Screen a démontré une sensibilité et une spécificité globales de 98,5 % et 96,8 %, respectivement, pour l'ensemble des échantillons simulés et prospectifs combinés (voir tableau ci-dessous).

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

CPE		Culture		Total
		+	-	
BD MAX™ CPE Screen PCR	+	67	35	102
	-	1	1070	1071
Total		68	1105	1173

Sensibilité : 98,5 % (67/68)

Spécificité : 96,8 % (1070/1105)

### Performance de Check-Direct CPE Screen par rapport à la méthode de référence pour KPC

KPC		Culture		Total
		+	-	
BD MAX™ CPE Screen PCR	+	28	8	36
	-	1	1136	1137
Total		29	1144	1173

Sensibilité : 96,6 % (28/29)

Spécificité : 99,3 % (1136/1144)

### Performance de Check-Direct CPE Screen par rapport à la méthode de référence pour OXA48

OXA-48		Culture		Total
		+	-	
BD MAX™ CPE Screen PCR	+	13	8	21
	-	0	1152	1152
Total		13	1160	1173

Sensibilité : 100 % (13/13)

Spécificité : 99,3 % (1152/1160)

### Performance de Check-Direct CPE Screen par rapport à la méthode de référence pour VIM

VIM		Culture		Total
		+	-	
BD MAX™ CPE Screen PCR	+	15	19	34
	-	0	1139	1139
Total		15	1158	1173

Sensibilité : 100 % (15/15)

Spécificité : 98,4 % (1139/1158)

### Performance de Check-Direct CPE Screen par rapport à la méthode de référence pour NDM

NDM		Culture		Total
		+	-	
BD MAX™ CPE Screen PCR	+	11	0	11
	-	0	1162	1162
Total		11	1162	1173

Sensibilité : 100 % (11/11)

Spécificité : 100 % (1162/1162)