

Brugervejledning

Check-Direct CPE for BD MAX™

Til påvisning og differentiering af carbapenemase-gener fra rene kolonier af *Enterobacteriaceae*

Version 1.6

Udgivelsesdato: 10.07.2017

REF

18-0082



24

CE IVD

Indhold

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

Tilsigtet brug

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

Indledning og princippet i metoden

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

Check-Direct CPE er en multiplex-PCR-analyse i realtid til påvisning af KPC-, OXA-48-, NDM- og VIM-carbapenemase-gener. Analysen er baseret på specifik genkendelse og amplifikation af fokussekvenser via PCR og den samtidige påvisning af ophobningen af PCR-amplifikationsprodukter via fluorescens-DNA-prober. Der findes mange genvarianter for KPC, VIM, OXA-48 og NDM, og Check-Direct CPE er udviklet til pålidelig påvisning af alle varianter. Check-Direct CPE for BD MAX™ anvender fem forskellige fluorescensprober og giver mulighed for påvisning af og skelnen mellem de fire carbapenemase-gener og det SPC-kontrolmål, der overvåger DNA-ekstraktion og PCR-amplifikation.

Kittets indhold (til 24 reaktioner)

Komponenter (mat.- nr.)	Beskrivelse
CPE-reagensrør (9-0062)	24 forseglede rør (violet forsegling)
CPE-positiv kontrol (9-0060)	1 rør (violet hætte) 100 μ l
Brugervejledning (9-0079)	Folder – hentes fra webstedet

Nødvendige materialer, der ikke følger med kittet

Tilbehør	Udstyr
<ul style="list-style-type: none"> BD MAX™ ExK DNA-1 Extraction Kit (Ref:442818) BD MAX™ DNA MMK Master Mix (Ref: 442848) BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519) Laboratoriehandsker til engangsbrug (pudderfrie)/laboratoriekittel Pipetter og engangspipettespidser (med filter) til mængder på 10 til 1000 μL Saltvand (150 mM NaCl eller 0,9 % w/v NaCl) Milli-Q-vand eller aqua bidest 	<ul style="list-style-type: none"> PCR-instrument i realtid: BD MAX™ System, softwareversion 4.30B eller nyere Densitometer, der er egnet til bakterielle suspensioner Vortexmixer

Opbevaring og stabilitet

Check-Direct CPE for BD MAX™-analysekomponenter er stabile ved 2 til 25 °C inden den angivne udløbsdato. Anvend ikke komponenter, der er for gamle.

Check-Direct CPE for BD MAX™-reagensrør og positiv kontrol leveres i en forseglet pose. Reagenserne skal forsegles i posen igen umiddelbart efter åbning for at beskytte dem mod fugt. Reagensrør er stabile i op til 14 dage ved 2 til 25 °C efter første åbning og genforsegling af posen.

Advarsler og forholdsregler

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

Læs hele protokollen, før testen startes

Brugsanvisning

Procedurer for klargøring af prøver

Testpræparation til bakterier fra kultur

1. Inokulér næringsstof-agarpladerne med de kliniske prøver eller bakteriestammer, der skal testes, og inkubér natten over ved 37 °C. Typiske vækstmedier inkluderer blodagar, MacConkey-agar og trypticase-sojaagar.
2. Klargør en bakteriecellesuspension i saltvand med McFarland 0,5-1,0 ($\approx 1 - 2 \times 10^8$ CFU/mL) fra en eller flere kolonier for hver plade ved hjælp af et 1 eller 10 μ L loop.
3. Pipetter 10 μ L bakteriecellesuspension ($\approx 1 - 2 \times 10^6$ CFU/mL) og 500 μ L Milli-Q-vand eller aqua bidest i ét SB-1 DNA-prøvebufferrør (leveret af BD med DNA-ekstraktionskittet, se *Nødvendige materialer, der ikke følger med kittet*).
4. Luk prøvebufferrøret med en membranhatte, og vortex røret i 10 sekunder ved lav hastighed.
5. Overfør prøvebufferrørene med bakteriecellesuspensionen til analyse til PCR-rummet.

Klargøring af kontrolreaktioner

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

- **Positiv kontrol:**
Pipetter 10 μ L af den positive kontrol og 500 μ L Milli-Q-vand eller aqua bidest ned i ét prøvebufferrør. Bland indholdet i en vortexmixer i 10 sekunder.
- **Negativ kontrol:**
Pipetter 500 μ L Milli-Q-vand eller aqua bidest ned i ét prøvebufferrør. Bland indholdet i en vortexmixer i 10 sekunder.

BD MAX™-betjening

1. Multiplex-PCR-opsætning i realtid

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

Tabel 1: Multiplex-qPCR-opsætning

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

*SPC: Prøvebearbejdningskontrol

Når testen er udført for første gang, skal du oprette PCR-testprogrammet "Check-Direct CPE" som beskrevet i Appendiks 1.

2. BD MAX™ Rack-opsætning

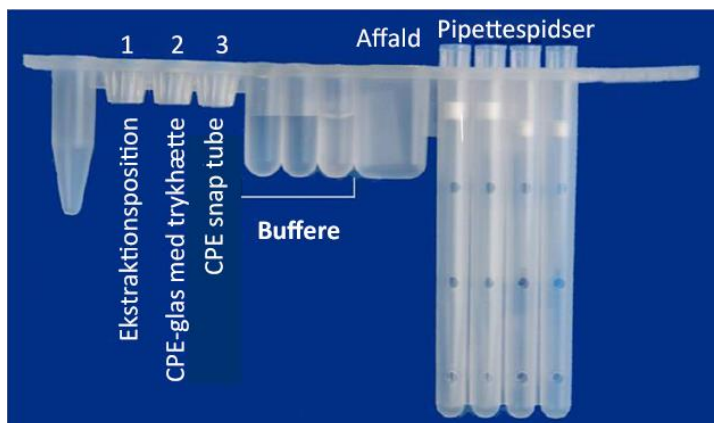
2.1. Isæt BD MAX™-systemrackene med det antal DNA Unitized Reagents Strips (URS), der er nødvendige for det antal prøver, der skal testes. Bank forsigtigt på hver strimmel for at sikre, at væskerne befinder sig i bunden af deres beholder.

2.2. Forberedelse af Unitized Reagent Strips (URS):

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

2.2.b. Klik et DNA MMK Master Mix-rør (grøn/gul forsegling) på plads i position 2 for DNA-strimlen, se figur 1.

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



Figur 1: Opsætning af DNA Unitized Reagent Strip.

3. Opsætning af BD MAX™-instrumentet

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

Tolkning af resultater

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

Inspicer altid amplifikationsplottet visuelt for hver prøve, der testes, i forhold til de C_T-værdier der opnås med softwaren.

1. Rapporterede resultater

BD MAX™-softwaren rapporterer C_T-værdier og amplifikationskurver for hver detektorkanal for hver prøve, der blev testet, på følgende måde:

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

2. Tolkning

2.1 Kør validering

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

Tabel 2: Kriterier for en gyldig kørsel med Check-Direct CPE-testen. (I.R. = ikke relevant)

Prøvetype*	C _T 475/520 KPC	C _T 530/565 VIM	C _T 585/630 OXA-48	C _T 630/665 NDM	C _T 680/715 SPC
Positive kontroller	32 ±3	30 ±3	29 ±3	31 ±3	I.R.
Negativ prøve	-1	-1	-1	-1	29 ±3

2.2 Tolkning af resultater

Hvis kørslen er blevet valideret, skal resultaterne tolkes som positive, negative eller uafklarede med de C_T-værdier, der blev opnået for prøverne efter retningslinjerne i tabel 3. Uafklarede kørsler skal testes igen.

C_T-værdier, der er fremkommet med bakterielle celler, vil generelt være i et specifikt C_T-vindue for hvert mål pga. det veldefinerede antal celler, der bruges som inputmateriale for testen. Bemærk dog, at C_T-værdierne kan være signifikant forskellige for de enkelte stammer. **Tabel 3** angiver den øvre grænse for dette C_T-vindue, hvor en højere C_T-værdi antyder en kontaminering af prøven eller en stamme, der ikke er ren. Dette anses derfor for at være et "Ikke afklaret" resultat.

Tabel 3: Retningslinjer for datatolkning af bakterielle celler (I.R. = ikke relevant)

C _T 475/520 KPC	C _T 530/565 VIM	C _T 585/630 OXA-48	C _T 630/665 NDM	C _T 680/715 SPC	Tolkning
≤33	≤27	≤26	≤32	I.R.	Positiv
-1	-1	-1	-1	29 ±3	Negativ
>33	>27	>26	>32	I.R.	Ikke afklaret
-1	-1	-1	-1	-1	Ikke afklaret

VIGTIGE OPLYSNINGER:

- Hvis BD MAX™-systemet giver inkonklusive eller ufuldstændige resultater (IND eller INC) som følge af en BD MAX™-systemfejl, skal du kontakte den lokale BD-repræsentant.

Ofte stillede spørgsmål (FAQ) og fejlfinding

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

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










Begrænsninger

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

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

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

Vigtige symboler, som anvendes

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

Teknisk assistance

support@check-points.com

+31 317 453 908

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

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

Bemærkning til køber:

Dette produkt sælges under licens fra PHRI Properties og må kun anvendes i henhold til PHRI Properties' patentrettigheder til human *in vitro* klinisk diagnostik, fødevareranalyse, veterinæranalyse eller forskning.

Farve- og quencher-forbindelser i dette produkt sælges under licens fra Biosearch Technologies, Inc. og er beskyttet af amerikanske og globale patenter enten ved udstedelse eller efter anmodning. Licensen dækker humane *in vitro*-diagnostiske (IVD) applikationer.

Varemærker

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

Check-Points Health BV
 Binnenhaven 5
 6709 PD Wageningen
 Holland

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



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

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

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

- Under fanen **Basic Information** (Grundlæggende oplysninger) skal du indtaste følgende parametre:
 - Test Name** (Testnavn): *Check-Direct CPE*.
 - Extraction Type** (Ekstraktionstype): Vælg *Exk DNA-1 (Plasma/Serum)*.
 - Master Mix Format** (Master Mix-format): Vælg *Type 1: BD MMK eller MMK(SPC) og tørrede primere og prober*.
 - Sample Extraction Parameters** (Ekstraktionsparametre for prøver): vælg *Default settings* (Standardindstillinger), se tabel A.
 - C_T Calculation** (Ct-beregning): Vælg *Call C_T at inflection point* (Fastlæg Ct ved vendepunkt).

Gem parametrene

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

Gem parametrene

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

Gem parametrene

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

Parameters (Parametre)	Value (Værdi)
Lysis Heat Time (Lyseringsvarmetiden)	10
Lysis Temperature (Lyseringstemperatur)	37
Sample Tip Height (Prøvespidsens højde)	1600
Sample Volume (Prøvevolumen)	937,5
Wash Volume (Vaskevolumen)	500
Neutralization Volume (Neutraliseringsvolumen)	12,5
DNase Heat Time (DNase-varmetid)	----

Tabel B: Gain parameters (Forstærkningsparametre).

Detector (Detektor)	Alias	Gain (Forstærkning)	Threshold (Tærskel)
475/520	KPC	40	100
530/565	VIM	80	150
585/630	OXA-48	30	150
630/665	NDM	80	150
680/715	SPC	40	150

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

	False Receiving Channel (Kanal, der modtager falsk input)				
	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Excitationskanal)	475/520		0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0		0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0		7,4
	630/665	0,0	0,0	0,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	4,4

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

Step Name (Navn på trin)	Profile Type (Profiltipe)	Cycles (Cyklusser)	Time (s) (Tid(er))	Temp(°C)	Detect (Påvis)
Denaturation (Denaturering)	Hold	1	600	98	NEJ
Amplification & Detection (Amplifikation og påvisning)	2 - temperature (temperatur)	45	15	98	NEJ
			62	60	JA

Appendiks 2: Testegenskaber

***In silico*-specificitet**

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

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

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

Analytisk specificitet

Den analytiske specificitet af den diagnostiske realtidstest Check-Direct CPE for BD MAX™ blev bestemt ved at teste krydsreaktiviteten med prøver, der indeholdt en stor mængde ikke-målspecifikke organismer. En oversigt over disse stammer er vist i tabellen nedenfor. Der blev foretaget en retrospektiv undersøgelse med 100 bakteriestammer fra 9 forskellige Gram-negative arter, der tidligere blev typebestemt med den diagnostiske Check-Points-mikroanalysetest Check-MDR CT103 (Check-Points Health).

Alle isolater, der blev testet negative med Check-Direct CPE for BD MAX™-analysen og den interne kontrol, blev pålideligt påvist i alle prøver. Specificiteten var 100 % på baggrund af de referencestammer, der blev testet.

Arter	Testede stammer
<i>Citrobacter freundii</i>	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	24
<i>Escherichia coli</i>	47
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2

Analytisk inklusivitet

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

Antal af testede stammer	Check-MDR CT103-resultat	Check-Direct CPE-resultat	Resultater inklusivitet
19	KPC	KPC	100 %
14	NDM	NDM	100 %
36	VIM	VIM	100 %
23	OXA-48	OXA-48	100 %
1	NDM+OXA-48	NDM+OXA-48	100 %
1	VIM+OXA-48	VIM+OXA-48	100 %

Klinisk ydeevne

Den kliniske ydeevne af Check-Direct CPE for BD MAX™-analysen blev evalueret på et centralt referencelaboratorium ved hjælp af ikke-følsomme carbapenem-bakterielle isolater, der er sendt fra forskellige geografisk udsprede kliniske centre. I alt 450 kliniske isolater blev valgt og bestod af 438 Enterobacteriaceae og 12 Pseudomonas spp. Til reference blev tilstedeværelsen og identiteten af carbapenemase-gener i disse isolater vurderet ved gene-specifik PCR og/eller analyse med Check-Points Check-MDR CT102-analysen. Isolaterne blev dyrket på MacConkey-agarplader med en 10 mg ertapenem-plade og behandlet ved hjælp af proceduren i denne vejledning. I forhold til referencemetoden påviste Check-Direct CPE-analysen en overordnet sensitivitet og specificitet på henholdsvis 100 % og 100 %.

Arter og carbapenemase-gener i panelet med bakterielle isolater

Arter	CPE-specifikke gener						
	KPC	NDM	VIM	OXA-48	NDM+OXA-48	IMP	INGEN
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	62	52	55	59	2	0	7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	0	12	3	0	1	0
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0	0	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	9	28	8	29	0	2	5
<i>Enterobacter spp.</i>	18	14	16	8	0	8	10
<i>Pseudomonas spp.</i>	0	0	0	0	0	11	1
<i>Andre*</i>	5	6	9	1	0	1	1
I alt	100	100	100	100	2	24	24

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

Overordnet ydeevne af Check-Direct CPE ift. referencemetoden

CPE		Reference		I alt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	402	0	402
	-	0	48	48
I alt		402	48	450

Følsomhed: 100%

Specificitet: 100%

Check-Direct CPE ydeevne ift. referencemetoden for KPC

KPC		Reference		I alt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	100	0	100
	-	0	350	350
I alt		100	350	450

Følsomhed: 100%
 Specificitet: 100%

Check-Direct CPE ydeevne ift. referencemetoden for OXA48

OXA-48		Reference		I alt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	102	0	102
	-	0	348	348
I alt		102	348	450

Følsomhed: 100%
 Specificitet: 100%

Check-Direct CPE ydeevne ift. referencemetoden for VIM

VIM		Reference		I alt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	100	0	100
	-	0	350	350
I alt		100	350	450

Følsomhed: 100%
 Specificitet: 100%

Check-Direct CPE ydeevne ift. referencemetoden for NDM

NDM		Reference		I alt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	102	0	102
	-	0	348	348
I alt		102	348	450

Følsomhed: 100%
 Specificitet: 100%

Reference:

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