

Användarhandbok

Check-Direct CPE for BD MAX™

för detektion och differentiering av karbapenemasgener från rena kolonier av *Enterobacteriaceae*

Version 1.6

Utfärdandedatum: 2017.07.20

REF

18-0082



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-testprogrammet v.4.30B eller senare	8
Bilaga 2: Funktionsegenskaper	9

Avsedd användning

Check-Direct CPE for BD MAX™ är ett kvalitativt *in vitro*-diagnostiskt test för snabb detektion av karbapenemasgener i *Enterobacteriaceae*. Testet är avsett för användning med bakterier odlade från kliniska prover. Check-Direct CPE 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 for BD MAX™ kan användas som ett hjälpmedel för att identifiera, förebygga och reglera karbapenemasproducerande *Enterobacteriaceae* som koloniserar patienter i vårdmiljöer. Check-Direct CPE 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 β -laktamantibiotika. I nuläget förknippas majoriteten av CPE med förekomst av en av följande plasmidkodade karbapenemaser: KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase), VIM (Verona integron-kodat metallo- β -laktamas), NDM (New Delhi metallo- β -laktamas) eller OXA-48 (Oxacillinase-48). Dessutom har CPE ofta andra bestämningsfaktorer för β -laktamresistens, vilket medför multiläkemedels- och panläkemedelsresistenta isolat.

Check-Direct CPE 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 är utformad för att tillförlitligt detektera alla varianter. Check-Direct CPE 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-reagensrör (9-0062)	24 förslutna rör (lila förslutning)
CPE-positiv kontroll (9-0060)	1 rör (lila lock) 100 μ l
Användarhandbok (9-0079)	Broschyr – ladda ned från webbplatsen

Material som krävs men ej medföljer kitet

Material	Utrustning
<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 (PCR-kassetter) (ref: 437519) Engångshandskar (utan talk) för laboratoriebruk/labbrock Pipetter och pipettspetsar (filter) för engångsbruk för volymerna 10 till 1 000 μl Koksaltlösning (150 mM NaCl eller 0,9 % v/v NaCl) Milli-Q-vatten eller aqua bidest 	<ul style="list-style-type: none"> Instrument för PCR i realtid: BD MAX™ System, programversion 4.30B eller senare Densitometer lämplig för bakteriesuspensioner Vortexblandare

Förvaring och hållbarhet

Komponenterna i Check-Direct CPE for BD MAX™-analysen är stabila vid 2 till 25 °C fram till det angivna utgångsdatumet. Använd inte komponenter vars hållbarhetstid har gått ut.

Check-Direct CPE for BD MAX™-reagensrör 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 25 °C efter första öppnandet och återförslutningen av påsen.

Varningar och försiktighetsbeaktanden

- Analysen Check-Direct CPE 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 laboratorietechnik 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 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 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 bakterier från odling

1. Inokulera näringsagarplattor med kliniska prover eller de bakteriestammar som ska testas och inkubera över natten vid 37 °C. Typiska tillväxtmedia innefattar blodagar, MacConkey-agar och tryptonsojaagar.
2. Bered en bakteriecell suspension i koksaltlösning på 0,5 – 1,0 McFarland ($\approx 1 - 2 \times 10^8$ CFU/mL) från en eller flera kolonier från varje platta med hjälp av en 1 eller 10 µL ögla.
3. Pipettera 10 µL av bakteriecell suspensionen ($\approx 1 - 2 \times 10^6$ CFU/mL) och 500 µL Milli-Q-vatten eller aqua bidest i ett DNA-provbuffertrör SB-1. (tillhandahålls av BD i DNA Extraction Kit, se Material som krävs men ej medföljer kitet).
4. Förslut provbuffertröret med ett membranlock och vortexa i tio sekunder i låg hastighet.
5. Överför provbuffertrören med bakteriecell suspensionerna som ska analyseras till PCR-rummet.

Beredning av kontrollreaktioner

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

- **Positiv kontroll:**
Pipettera 10 µL positiv kontroll och 500 µL Milli-Q-vatten eller aqua bidest till ett provbuffertrör. Vortexa i tio sekunder.
- **Negativ kontroll:**
Pipettera 500 µL Milli-Q-vatten eller aqua bidest 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

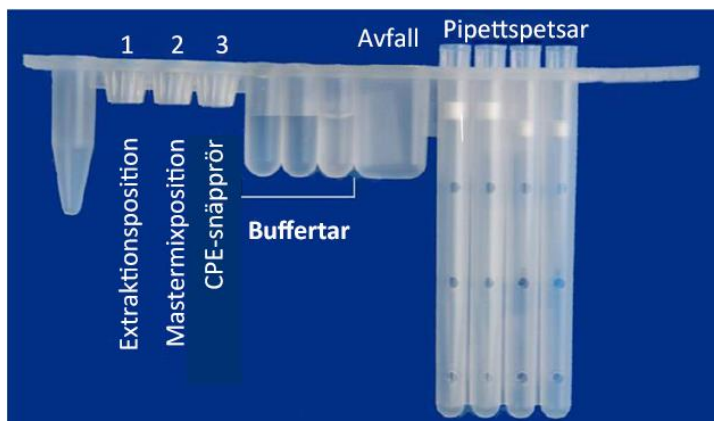
När testet utförs för första gången ska du skapa PCR-testprogrammet "Check-Direct CPE" enligt beskrivningen i Bilaga 1.

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. Snäpp fast ett BD Exk-1-reagensrör för DNA-extraktion (vit förslutning) i position 1 på DNA-remsan, se Figur 1.
- 2.2.b. Snäpp fast ett DNA MMK Master Mix-reagensrör (grön/gul förslutning) i position 2 på DNA-remsan, se Figur 1.
- 2.2.c. Snäpp fast ett CPE-reagensrör (blå/lila förslutning) i position 3 på DNA-remsan, se Figur 1.



Figur 1: Förberedelse av sammansatta DNA-reagensremor.

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 "Check-Direct CPE"**. Se instruktioner i Bilaga 1 för att skapa "Check-Direct CPE"-testet om det inte redan finns på Test-menyn.
- 3.3 Läs in **provbuffetrörers** streckkod med streckkodskannern (du kan också skriva in streckkoden manuellt). Börja med position 1 i ställ A. Placera vart och ett av provbuffetrören i sin respektive position i BD MAX™-ställen (med membranlock).
- 3.4 Fyll i provets eller patientens identifikationsinformation i rutan **Accession** (Labnummer). Kontrollera att varje provs eller patients information motsvarar dess specifika provbuffetrör i stället.
- 3.5 Ladda stället/ställerna 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_T-värden som erhållits med programmet.

1. Rapporterade resultat

BD MAX™-programmet rapporterar C_T-värden och amplifieringskurvor för varje detektorkanal för varje prov som testas på följande sätt:

- C_T-värdet **0** indikerar att inget C_T-värde med det angivna tröskelvärde beräknades av programmet (se Bilaga 1). Amplifieringskurvan för provet som visar C_T-värdet "0" måste kontrolleras manuellt.
- C_T-värdet **-1** indikerar att ingen giltig amplifieringsprocess har skett. Kontrollera att det inte finns någon amplifieringskurva med C_T-värdet -1 i de grafiska resultaten.
- Annat C_T-värde ska tolkas i korrelation till amplifieringskurvan och i enlighet med den tolkningsmetod 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-körning i realtid på BD MAX™-systemet. Om kontrollernas C_T-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-test. (N.R. = not relevant (ej relevant))

Provtyp*	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
Positiva kontroller	32 ±3	30 ±3	29 ±3	31 ±3	N.R.
Negativt prov	-1	-1	-1	-1	29 ±3

2.2 Resultattolkning

Om körningen har validerats tolkar du resultat som positiva, negativa eller olösta med de C_T-värden som erhållits för proverna enligt de sammanfattade riktlinjerna i Tabell 3. Olösta körningar bör testas igen.

C_T-värden som erhålls med bakterieceller finns vanligtvis i ett särskilt C_T-fönster för varje mål på grund av den väldefinierade mängden celler som används som ingångsmaterial för testet. Observera dock att C_T-värden kan variera betydligt mellan olika enskilda stammar. I **Tabell 3** anges den övre gränsen för detta C_T-fönster. Ett högre C_T-värde tyder på kontamination av provet eller en stam som inte är ren. Detta tolkas därför som ett "olöst" resultat.

Tabell 3: Riktlinjer för tolkning av data för bakterieceller (N.R. = not relevant (ej 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	N.R.	Positivt
-1	-1	-1	-1	29 ±3	Negativt
>33	>27	>26	>32	N.R.	Olöst
-1	-1	-1	-1	-1	Olöst

VIKTIGT:

- 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.

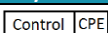








- Realtidsresultat visar inga C_T-värden eller tolkningen indikerar att provet är olöst.** Möjliga orsaker och felsökning:
 - PCR-reaktionen har inhiberats av exogena eller endogena substanser. Upprepa provtestningen. Om den fortfarande är inhiberad kan en mindre provmängd eventuellt förbättra resultaten.
 - DNA-extraktionen misslyckades eftersom SPC inte detekterades.
 - Hållbarhetstiden för BD DNA MMK 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.
- 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.
- Realtidsresultat visar inga C_T-värden för den positiva kontrollen eller tolkningen indikerar att provet är olöst.**
Möjliga orsaker och felsökning:
 - Den positiva kontrolllösningen har inte tillförts.
 - Hållbarhetstiden för BD DNA MMK kan ha gått ut.
 - Luftbubblor har uppstått i den positiva kontrollens PCR-reaktionskammare.
- Realtidsresultaten visar mycket låga fluorescenssignaler i alla prover och detektorkanaler, inklusive SPC-signalen.**
Möjliga orsaker och felsökning:
 - CPE-reagensrörerna med fluorescerande prober och primrar kan ha försämrats. Kontrollera utgångsdatum och fastställ att CPE-rörerna har förvarats på rätt sätt.
 - BD MAX™-systemet kan vara ansvarigt för dessa resultat. Se BD MAX™-användarhandboken eller kontakta närmaste BD-representant.
- BD MAX™-systemet anger ett fel eller driftstopp.**
Se BD MAX™-instrumentets användarhandbok eller kontakta närmaste BD-representant.
- Dubblättprover som testas med Check-Direct CPE-test ger inte identiska resultat.**
C_T-värden för identiska prover kan variera mellan enskilda reaktioner. Stora variationer, >2 C_T-värden, tyder på pipetteringsfel eller andra skillnader mellan dubblättproverna.

Begränsningar

Check-Direct CPE 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 rena bakterieceller som ingångsmaterial.

Kvaliteten på ingående DNA är en viktig faktor för att få tillförlitliga resultat med Check-Direct CPE. För cellsuspensioner är korrekt celldensitet en viktig faktor för att få tillförlitliga resultat, och det förfarande som beskrivs i den här handboken måste följas strikt. 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 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 genupsättningar är det möjligt att vissa undertyper inte detekteras. Testet reflekterar den aktuella kännedomen i Check-Points Health B.V. 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
	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*.

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. Licensstillståndet 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-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:

1. På fliken **Basic Information** (Grundläggande information) anger du följande parametrar:

- **Test Name** (Testets namn): *Check-Direct CPE*.
- **Extraction Type** (Extraktionstyp): Välj *Exk DNA-1* (Plasma/Serum)
- **Master Mix Format**: Välj *Type 1: BD MMK or MMK(SPC) and Dried Primers & Probes* (torkade primrar och prober)
- **Sample Extraction Parameters** (Provextraktionsparametrar): Välj *Default settings* (Standardinställningar), se Tabell A
- **C_T Calculation** (Ct-beräkning): Välj *Call C_T at inflection point* (Anropa Ct vid inflexionspunkt).

Spara parametrarna.

2. 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.

3. 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
Sample Volume (Provolym)	937,5
Wash Volume (Tvättvolym)	500
Neutralization Volume (Neutraliseringsvolym)	12,5
DNase Heat Time (DNas-värmningstid)	----

Tabell B: Gain parameters (Gain-parametrar).

Detector (Detektor)	Alias	Gain (Förstärkning)	Threshold (Tröskel)
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

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
	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

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	45	15	98	NEJ
			62	60	JÄ

Bilaga 2: Funktionsegenskaper

In silico-specificitet

Specificiteten för det diagnostiska realtidstestet Check-Direct för BD MAX™ säkerställs genom val av rätt primrar och prober 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 prober genom *in silico*-analys antogs för att försäkra tillförlitlig detektion av alla beskrivna varianter. Enstaka dåliga matchningar med primrar och prober 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 for BD MAX™ fastställdes genom testning av korsreaktiviteten med prover innehållande en stor mängd icke-målorganismer. Tabellen nedan innehåller en översikt över dessa stammar. En retrospektiv studie utfördes med 100 bakteriestammar från 9 olika gramnegativa arter som dessförinnan typbestämts med Check-Points diagnostiska mikromatrisanalys Check-MDR CT103 (Check-Points Health).

Alla isolat hade negativt testresultat i Check-Direct CPE for BD MAX™-analysen, och den interna kontrollen detekterades tillförlitligt i alla prover. Specificiteten var 100 % baserat på testade referensstammar.

Arter	Testade stammar
<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

En retrospektiv studie utfördes med 94 bakteriestammar från 14 olika gramnegativa arter som dessförinnan identifierats som karbapenemaspositiva med Check-Points diagnostiska mikromatrisanalys Check-MDR CT103 (Check-Points Health). Alla 94 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-resultat	Resultatens 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 %

Kliniska prestanda

Kliniska prestanda för Check-Direct CPE for BD MAX™-analysen utvärderades i ett centralt referenslaboratorium med hjälp av karbapenemokänsliga bakterieisolat som inkommit från olika geografiskt spridda kliniker. Sammanlagt 450 isolat valdes ut och bestod av 438 Enterobacteriaceae och 12 Pseudomonas spp. Förekomsten av karbapenemasgener i isolaten och dessas identiteter utvärderades med genspecifik PCR och/eller med Check-Points Check-MDR CT102-analys. Isolaten odlades på MacConkey-agarplattor med en 10 mg ertapenemdisk och bearbetades enligt förfarandet i den här handboken.

I förhållande till referensmetoden uppvisade Check-Direct CPE-analysen en övergripande sensitivitet och specificitet på 100 % respektive 100 %.

Arter och karbapenemasgener i bakterieisolatpanelen

Arter	CPE-specifika 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
Övriga*	5	6	9	1	0	1	1
Totalt	100	100	100	100	2	24	24

*23 isolat innehållande Citrobacter spp. (n=15), Raoultella spp. (n=3), Leclercia adecarboxylata (n=2), Serratia marcescens (n=2) och Kluyvera georgiana (n=1).

Övergripande Check-Direct CPE-prestanda jämfört med referensmetod

CPE		Referens		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	402	0	402
	-	0	48	48
Totalt		402	48	450

Sensitivitet: 100 %
 Specificitet: 100 %

Check-Direct CPE-prestanda jämfört med referensmetod för KPC

KPC		Referens		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	100	0	100
	-	0	350	350
Totalt		100	350	450

Sensitivitet: 100 %
 Specificitet: 100 %

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

OXA-48		Referens		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	102	0	102
	-	0	348	348
Totalt		102	348	450

Sensitivitet: 100 %
 Specificitet: 100 %

Check-Direct CPE-prestanda jämfört med referensmetod för VIM

VIM		Referens		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	100	0	100
	-	0	350	350
Totalt		100	350	450

Sensitivitet: 100 %
 Specificitet: 100 %

Check-Direct CPE-prestanda jämfört med referensmetod för NDM

NDM		Referens		Totalt
		+	-	
BD MAX CPE PCR	+	102	0	102
	-	0	348	348
Totalt		102	348	450

Sensitivitet: 100 %
 Specificitet: 100 %

Referenser:

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.