

# Benutzerhandbuch

## Check-Direct CPE for BD MAX™

Zur Entdeckung und Differenzierung von Carbapenemase-Genen in reinen Kolonien von *Enterobacteriaceae*

Version 1.6

Ausgabedatum: 10.07.2017

REF

18-0082



24

CE IVD

### Inhalt

Verwendungszweck.....	2
Einführung und Prinzip des Verfahrens.....	2
Kit-Inhalt (für 24 Reaktionen) .....	2
Nicht mit dem Kit mitgelieferte, benötigte Materialien .....	2
Lagerung und Haltbarkeit.....	2
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen .....	3
Probenvorbereitungsverfahren .....	4
BD MAX™ Betrieb.....	4
Interpretation der Ergebnisse.....	5
Häufig gestellte Fragen (FAQ) und Fehlerbehebung .....	6
Einschränkungen .....	7
Legende der verwendeten Symbole .....	7
Technische Unterstützung.....	7
Anhang 1: Erstellen des Check-Direct CPE Test-Programms v.4.30B und höher .....	8
Anhang 2: Leistungsmerkmale .....	9

## Verwendungszweck

Check-Direct CPE for BD MAX™ ist ein qualitativer *in-vitro*-Diagnostik-Test für die schnelle Erkennung von Carbapenemasen-Genen bei *Enterobacteriaceae*. Der Test ist zur Verwendung von Bakterien vorgesehen, die aus klinischen Proben kultiviert wurden. Check-Direct CPE erkennt das Vorliegen der Carbapenemase-Gene KPC, NDM, VIM und OXA-48, derzeit die Hauptursache für die Entstehung von Carbapenemasen in *Enterobacteriaceae*. Der Test verwendet das BD MAX™-System für die Extraktion von DNA und die anschließende Echtzeit-PCR unter Verwendung der bereitgestellten Reagenzien in Kombination mit den Universal-Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für das BD MAX™-System. Check-Direct CPE for BD MAX™ kann zur Erkennung, Vorbeugung und Kontrolle von Carbapenemase bildenden *Enterobacteriaceae* verwendet werden, die Patienten im Gesundheitswesen besiedeln. Check-Direct CPE for BD MAX™ ist weder vorgesehen, Infektionen mit Carbapenemase bildenden *Enterobacteriaceae* zu diagnostizieren, noch die Behandlung für diese Infektionen zu bestimmen oder zu überwachen. Parallelkulturen sind zur Anzucht von Organismen für epidemiologische Typisierung, Empfindlichkeitsprüfung und für weitere bestätigende Erkennung notwendig.

## Einführung und Prinzip des Verfahrens

Die weltweite Entstehung und Verbreitung von Carbapenem-Resistenz bei *Enterobacteriaceae* ist eine ernsthafte Bedrohung für die öffentliche Gesundheit. Diese Organismen stehen im Zusammenhang mit hohen Sterblichkeitsraten und haben das Potenzial, sich weit zu verbreiten. Die häufigste Ursache von Carbapenem-Resistenz bei *Enterobacteriaceae* ist die Expression von Carbapenemasen, *d. h.* Carbapenemase bildende *Enterobacteriaceae* oder CPE. CPE haben eine erhöhte oder vollständige Resistenz gegen Carbapeneme und die meisten anderen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Gegenwärtig ist die überwiegende Mehrheit der CPE mit dem Vorliegen von einem der folgenden plasmidkodierten Carbapenemasen assoziiert: KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), VIM (Verona integron codierte metallo- $\beta$ -Lactamase), NDM (New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase) oder OXA-48 (Oxacillinase-48). Darüber hinaus haben CPE häufig andere nicht- $\beta$ -Lactam-Resistenzdeterminanten, was zu multi- und pan-resistenten Isolaten führt.

Check-Direct CPE for BD MAX™ ist ein Multiplex-Echtzeit-PCR-Test zur Erkennung der KPC, OXA-48, NDM und VIM Carbapenemase-Gene. Der Test basiert auf spezifischer Erkennung und Amplifikation von Zielsequenzen durch PCR und dem gleichzeitigen Nachweis der Akkumulation von PCR-Amplifikationsprodukten durch fluoreszierende DNA-Sonden. Für KPC, VIM, OXA-48 und NDM existieren viele Genvarianten, und Check-Direct CPE wurde entwickelt, um auf zuverlässige Weise die meisten der Varianten zu erkennen. Check-Direct CPE for BD MAX™ verwendet fünf verschiedene Fluoreszenzsonden und ermöglicht die Erkennung und Unterscheidung der vier Carbapenemase-Gene und eine Prozesskontrolle, SPC, das DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation überwacht.

## Kit-Inhalt (für 24 Reaktionen)

Komponenten (Mat. Nr.)	Beschreibung
CPE-Reagenzröhrchen (9-0062)	24 versiegelte Röhrchen (lila Siegel)
CPE-Positivkontrolle (9-0060)	1 Röhrchen (lila Kappe) 100 $\mu$ l
Benutzerhandbuch (9-0079)	Broschüre - von der Website heruntergeladen

## Nicht mit dem Kit mitgelieferte, benötigte Materialien

Materialien	Geräte
<ul style="list-style-type: none"> <li>BD MAX™ EXK™ DNA-1 Extraktions-Kit (Ref: 442818)</li> <li>BD MAX™ DNA MMK Master Mix (Ref: 442848)</li> <li>BD MAX™ PCR-Cartridges (Ref: 437519)</li> <li>Einweg-Laborhandschuhe (puderfrei)/Laborkittel</li> <li>Pipetten &amp; Einweg (Filter-)Spitzen für Volumina von 10 bis 1000 <math>\mu</math>l</li> <li>Kochsalzlösung (150 mM NaCl oder 0,9% w/v NaCl)</li> <li>Milli-Q-Wasser oder Aqua bidest</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Echtzeit-PCR-Instrument: BD MAX™-System Software, Version 4.30B oder höher</li> <li>Für Bakteriensuspensionen geeignetes Densitometer</li> <li>Vortex-Mixer</li> </ul>

## Lagerung und Haltbarkeit

Check-Direct CPE for BD MAX™ Testkomponenten sind bei 2 bis 25 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil. Keine abgelaufenen Komponenten verwenden.

Check-Direct CPE for BD MAX™ Reagenzröhrchen und Positivkontrolle werden in einem versiegelten Beutel zur Verfügung gestellt. Um die Reagenzien vor Feuchtigkeit zu schützen, den Beutel nach dem Öffnen sofort erneut versiegeln. Reagenzröhrchen sind bei 2 bis 25 °C bis zu 14 Tage nach dem erstmaligen Öffnen und erneutem Versiegeln des Beutels stabil.

## Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Check-Direct CPE for BD MAX™-Test ist für die Verwendung von *in-vitro*-Diagnostik.
- Dieses Produkt kann nur mit dem BD MAX™ System verwendet werden.
- Das Kit nicht verwenden, falls das Etikett, das die äußere Box versiegelt, beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Empfang geöffnet oder beschädigt sind.
- Schutzbeutel der Reagenzien sofort mit dem Zipverschluss nach jedem Gebrauch schließen. Entfernen Sie vor der Versiegelung überschüssige Luft aus den Beuteln.
- Überprüfen Sie die Reagenzstreifen auf die richtige Flüssigkeitsbefüllung (sicherstellen, dass sich die Flüssigkeiten am Boden der Röhren befinden).
- Überprüfen Sie die Reagenzstreifen, um sicherzustellen, dass alle Pipettenspitzen vorhanden sind.
- Trocknungsmittel nicht aus den Reagenzbeuteln entfernen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien, falls das Trocknungsmittel nicht vorhanden oder innen zerbrochen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, falls die Folie geöffnet oder beschädigt wurde.
- Mischen Sie keine Reagenzien von verschiedenen Beuteln und/oder Kits und/oder Chargen.
- Kappen nicht vertauschen oder wiederverwenden, da eine Verunreinigung und eine Beeinträchtigung der Testergebnisse auftreten könnte.
- Gehen Sie vorsichtig bei der Verwendung von Lösungsmitteln vor, weil die Lesbarkeit der Barcodes des Master Mix und der Extraktionsröhrchen beeinflusst werden könnte.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien.
- Gute Labortechnik ist von wesentlicher Bedeutung für die ordnungsgemäße Durchführung dieses Tests. Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität dieses Tests sollte äußerste Vorsicht angewendet werden, um die Reinheit aller Materialien und Reagenzien aufrechtzuerhalten.
- Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Amplikons, die BD MAX™ PCR-Cartridges nach dem Gebrauch nicht auseinander brechen. Die Siegel der BD MAX™ PCR-Cartridges sind konzipiert, um eine Kontamination zu verhindern.
- Die Durchführung des Check-Direct CPE for BD MAX™ Tests außerhalb der empfohlenen Zeiträume kann zu ungültigen Ergebnissen führen. Tests, die nicht innerhalb der festgelegten Zeiträume durchgeführt werden, sollten mit einer neuen Probe wiederholt werden.
- Zusätzliche Kontrollen können gemäß der Richtlinien oder Anforderungen lokaler, Landes- und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder Akkreditierungsorganisationen getestet werden.
- In Fällen, in denen Kultur- oder andere PCR-Tests im Labor durchgeführt werden, muss sichergestellt werden, dass die Check-Direct CPE for BD MAX™ Testkomponenten, die für die Prüfung erforderliche Reagenzien sowie das BD MAX™-System nicht kontaminiert werden. Vermeiden Sie zu allen Zeiten mikrobielle und Desoxyribonuklease (DNase) Kontamination. Handschuhe müssen vor der Handhabung von Reagenzien und Cartridges gewechselt werden.
- Proben immer so behandeln, als wären sie infektiös und in Übereinstimmung mit sicheren Laborverfahren wie diejenigen, wie diese in dem CLSI-Dokument M2911 und in Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboratorien beschrieben sind.
- Schutzkleidung und Einweghandschuhe tragen, während alle Reagenzien gehandhabt werden.
- Nach Durchführung des Tests die Hände gründlich waschen.
- Nicht rauchen, trinken, kauen oder in Bereichen essen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien benutzt werden.
- Entsorgen Sie nicht benötigte Reagenzien und Abfälle gemäß den örtlichen, Landes- und/oder Bundesvorschriften.
- Lesen Sie das Handbuch des BD MAX™ Systems für zusätzliche Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren.

**Bitte lesen Sie das vollständige Protokoll vor Beginn des Tests**

# Gebrauchsanweisung

## Probenvorbereitungsverfahren

### Vorbereitung von Bakterien aus Kultur

1. Inokulieren Sie Nähragarplatten mit den klinischen Proben oder den zu testenden Bakterienstämmen und inkubieren Sie diese über Nacht bei 37 °C. Typische Wachstumsmedien umfassen Blut-Agar, MacConkey-Agar und CASO-Agar.
2. Bereiten Sie eine bakterielle Zellsuspension in Saline von McFarland 0,5-1,0 ( $\approx 1 - 2 \times 10^8$  KBE/ml) aus einem oder mehreren Kolonien von jeder Platte unter Verwendung einer 1 oder 10 µl Öse vor.
3. Pipettieren Sie 10 µL der Bakterienzellsuspension ( $\approx 1 - 2 \times 10^6$  KBE/ml) und 500 µl Milli-Q-Wasser oder Aqua bidest in ein DNA-Probenpuffer Röhrchen SBT. (Von BD mit dem DNA-Extraktions-Kit mitgeliefert, beziehen Sie sich auf *Nicht mit dem Kit mitgelieferte, benötigte Materialien*).
4. Schließen Sie das Probenpufferröhrchen mit einer Septumkappe und vortexen Sie für 10 Sekunden bei niedriger Geschwindigkeit.
5. Bringen Sie die Probenpufferröhrchen mit den zu analysierenden bakteriellen Zellsuspensionen, die in dem PCR-Raum vorbereitet wurden.

### Vorbereitung von Kontrollreaktionen

Um den Lauf zu validieren, führen Sie positive und negative Kontrollreaktionen für jeden Check-Direct CPE-PCR-Durchlauf durch. Die Positivkontrolle ist im Kit inbegriffen.

- **Positivkontrolle:**  
10 µl der positiven Kontrolle und 500 µl Milli-Q-Wasser oder Aqua bidest in ein Probenpufferröhrchen pipettieren. Für 10 Sekunden vortexen.
- **Negativkontrolle:**  
500 µl Milli-Q-Wasser oder Aqua bidest in ein Probenpufferröhrchen pipettieren. Für 10 Sekunden vortexen.

## BD MAX™ Betrieb

### 1. Multiplex Echtzeit PCR-Einstellung

Tabelle 1 zeigt die Multiplex-Echtzeit-PCR-Einstellung mit den erfassten Zielen in jedem Detektorkanal des BD MAX™-Systems.

**Tabelle 1:** Multiplex qPCR-Einstellung

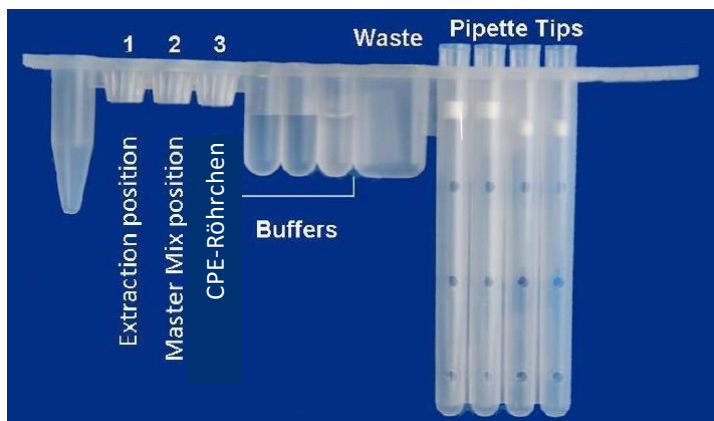
Detektor	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Kanal	1	2	3	4	5
Ziel	KPC	VIM	OXA-48	NDM	SPC*

\* SPC: Probenprozesskontrolle

Wenn der Test zum ersten Mal durchgeführt wird, erstellen Sie das PCR-Testprogramm „Check-Direct CPE“ wie in Anhang 1 beschrieben.

### 2. Beladen der BD MAX™ Racks

- 2.1. Beladen Sie die BD MAX™ System-Racks mit der Anzahl der DNA Einzelreagenzienstreifen, die für die Anzahl der zu testenden Proben notwendig sind. Klopfen Sie sanft auf jeden Streifen, um sicherzustellen, dass sich alle Flüssigkeiten am Boden ihrer Behälter befinden.
- 2.2. Bereiten Sie Einzelreagenzienstreifen vor:
  - 2.2.a. Rasten Sie ein BD Exk-1 DNA-Extraktions Reagenzröhrchen (weißes Siegel) in Position 1 des DNA-Streifens, siehe Abbildung 1.
  - 2.2.b. Rasten Sie ein DNA-MMK Master Mix Röhrchen (grünes/gelbes Siegel) in Position 2 des DNA-Streifens, siehe Abbildung 1.
  - 2.2.c. Rasten Sie ein CPE-Reagenzröhrchen (blaues Siegel) in Position 3 des DNA-Streifens, siehe Abbildung 1.



**Abbildung 1:** Vorbereitung der DNA Einzelreagenzstreifen.

### 3. Einstellung des BD MAX™ Systems

3.1 Öffnen Sie die Registerkarte **Ausführen** der BD MAX™ Systemsoftware v4.30B oder höher und füllen Sie die **Arbeitsliste** aus.

3.2 Wählen Sie den **Test** „Check-Direct CPE“. Siehe Anhang 1, um den „Check-Direct CPE“ Test zu erstellen, falls sich dieser noch nicht im Test-Menü befindet.

3.3 Geben Sie den Barcode des **Probenpufferröhrchens** unter Verwendung des Barcodescanners ein (Sie können den Barcode auch manuell eingeben). Beginnen Sie mit der Position 1 von Rack A. Setzen Sie jedes der Probenpufferröhrchen in seine entsprechenden Position in die BD MAX™ Racks (mit Septumkappe) ein.

3.4 Geben Sie die Probe oder Patientenidentifikationsinformationen in das Feld Accession ein. Überprüfen Sie, dass jede Probe oder Patienteninformationen mit ihren spezifischen Probenpufferröhrchen im Rack übereinstimmen.

3.5 Legen Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ -System ein. (Rack-A befindet sich auf der linken Seite des Instruments und Rack-B auf der rechten Seite).

3.6 Laden Sie die BD MAX™ PCR Cartridge(s).

3.7 Schließen Sie die Gerätetür und wählen Sie **Lauf starten**.

### Interpretation der Ergebnisse

**Wichtige Punkte vor dem Beginn:** Für eine detaillierte Beschreibung, wie die Daten zu analysieren sind, beziehen Sie sich auf das *BD MAX™ System Benutzerhandbuch*.

**Kontrollieren Sie die Amplifikationskurve für jede getestete Probe und vergleichen Sie die Kurve mit den C<sub>T</sub>-Werten, die mit der Software erhalten wurden.**

#### 1. Angegebene Ergebnisse

Die BD MAX™ Software gibt die C<sub>T</sub>-Werte und Amplifikationskurven für jeden Detektorkanal einer jeden getesteten Probe auf folgende Weise an:

- Ein C<sub>T</sub>-Wert von **0** bedeutet, dass kein C<sub>T</sub>-Wert von der Software mit dem angegebenen Schwellenwert berechnet wurde (siehe Anhang 1). Die Amplifikationskurve der Probe, die einen „0“ C<sub>T</sub>-Wert anzeigt, muss manuell geprüft werden.
- Ein C<sub>T</sub>-Wert von **-1** zeigt an, dass kein gültiger Amplifikationsprozess erfolgt ist. Überprüfen Sie, dass keine Amplifikationskurve für die Probe mit einem C<sub>T</sub>-Wert von -1 auf den graphischen Ergebnissen vorliegt.
- Jeder andere C<sub>T</sub>-Wert sollte zusammen mit der Amplifikationskurve und nach den in den Tabellen 2 und 3 beschriebenen Richtlinien für die Auslegungsmethode interpretiert werden.

#### 2. Interpretation

##### 2.1 Validierung des Laufs

Stellen Sie sicher, dass der Echtzeit-PCR-Lauf gültig ist, bevor Sie die Ergebnisse interpretieren. Überprüfen Sie, dass kein Bericht zu einem BD MAX™ Systemfehler vorliegt. Überprüfen Sie ggf. die Amplifikationskurven der Positiv- und Negativkontrolle. Tabelle 2 zeigt die Kriterien für einen gültigen Check-Direct CPE-Laufs auf dem BD MAX™-System an. Falls die C<sub>T</sub>-Werte der Kontrollen nicht wie erwartet ausfallen, beziehen Sie sich auf die häufig gestellten Fragen und Fehlersuche „3“.

**Tabelle 2:** Kriterien für einen gültigen Lauf mit Check-Direct CPE-Test. (N.R. = nicht relevant)

Probentyp*	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
Positivkontrollen	32 ± 3	30 ± 3	29 ± 3	31 ± 3	N.R.
Negative Probe	-1	-1	-1	-1	29 ± 3

## 2.2 Interpretation der Ergebnisse

Wenn der Lauf validiert wurde, interpretieren Sie die Ergebnisse als positiv, negativ oder ungelöst basierend auf den C<sub>T</sub>-Werten, die für die Proben nach den in Tabelle 3 zusammengefassten Richtlinien erhalten wurden. Ungelöste Läufe sollten erneut getestet werden.

C<sub>T</sub>-Werte, die mit Bakterienzellen erhalten wurden, werden sich in der Regel für jedes Ziel in einem bestimmten C<sub>T</sub>-Fenster aufgrund der definierten Menge von verwendeten Zellen als Eingangsmaterial für den Test befinden. Beachten Sie jedoch, dass sich C<sub>T</sub>-Werte zwischen den einzelnen Stämmen erheblich unterscheiden können. **Tabelle 3** gibt die obere Grenze dieses C<sub>T</sub>-Fensters an, ein höherer C<sub>T</sub>-Wert deutet auf eine Kontamination der Probe oder einen Stamm hin, der nicht rein ist. Daher wird dies als ein „ungelöstes“ Ergebnis angesehen werden.

**Tabelle 3:** Richtlinien zur Dateninterpretation für Bakterienzellen (N.R. = nicht relevant)

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	Interpretation
≤33	≤27	≤26	≤32	N.R.	Positiv
-1	-1	-1	-1	29 ± 3	Negativ
>33	>27	>26	>32	N.R.	Ungelöst
-1	-1	-1	-1	-1	Ungelöst

### WICHTIGE HINWEISE:

- Falls das BD MAX™ System unbestimmte oder unvollständige Ergebnisse (IND oder INC) aufgrund eines BD MAX™ Systemfehlers anzeigt, setzen Sie sich bitte mit Ihrem BD-Vertreter vor Ort in Verbindung.

## Häufig gestellte Fragen (FAQ) und Fehlerbehebung

Siehe Abschnitt „Fehlersuche“ des BD MAX™-System Benutzerhandbuchs für zusätzliche Informationen

### 1. Echtzeit-PCR-Ergebnisse zeigen keine CT-Werte oder die Interpretation zeigt an, dass die Probe ungelöst ist. Mögliche Ursachen und Fehlerbehebung:

- Die PCR-Reaktion ist durch exogene oder endogene Substanzen gehemmt worden. Bitte wiederholen Sie den Test. Wenn diese noch immer gehemmt ist, könnte eine geringere Menge der Eingangsprobe die Ergebnisse verbessern.
- Die DNA-Extraktion ist fehlgeschlagen, da die SPC nicht erkannt wurde.
- Das BD-DNA MMK ist möglicherweise abgelaufen.
- Ein Fehler bei der Handhabung der Flüssigkeit ist aufgetreten: Einzel-Reagenzstreifen und PCR-Cartridge überprüfen, um zu bestimmen, wo das Problem bei der Handhabung der Flüssigkeit aufgetreten ist (Beispiel: Luftblase in der Cartridge) und die Probe einem erneuten Durchlauf unterziehen. Falls das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an Ihren BD-Vertreter vor Ort.

### 2. Fehlerbehebung für ungelöste Ergebnisse.

Für ungelöste Ergebnisse: Test mit der ursprünglichen Probe wiederholen, indem Sie ein neues Probenpufferröhrchen vorbereiten. Testen Sie alternativ neu gesammelte Proben oder verwenden Sie eine geringere Menge der Probe.

### 3. Echtzeit-PCR-Ergebnisse zeigen keine C<sub>T</sub>-Werte für die Positivkontrolle oder die Interpretation zeigt an, dass die Probe ungelöst ist?

Mögliche Ursachen und Fehlerbehebung:

- Die positive Kontrolllösung wurde nicht zugegeben.
- Das BD-DNA MMK ist möglicherweise abgelaufen.
- Luftblasen sind in der PCR-Reaktionskammer der Positivkontrolle aufgetreten.

### 4. Echtzeit-PCR-Ergebnisse zeigen sehr niedrige Fluoreszenzsignale bei allen Proben und Detektorkanälen einschließlich des SPC-Signals an.

Mögliche Ursachen und Fehlerbehebung:

- Die CPE-Reagenzröhrchen, die fluoreszierende Sonden und Primer enthalten, könnten degradiert sein. Bitte überprüfen Sie das Ablaufdatum und stellen Sie sicher, dass die CPE-Röhrchen sachgemäß gelagert wurden.
- Das BD MAX™-System kann für diese Ergebnisse verantwortlich sein. Bitte beziehen Sie sich auf das BD MAX™ Benutzerhandbuch oder setzen Sie sich mit Ihrem BD-Vertreter vor Ort in Verbindung.

### 5. Das BD MAX™ System gibt einen Fehler oder Ausfall an.

Beziehen Sie sich auf das Benutzerhandbuch des BD MAX™ Instruments oder kontaktieren Sie Ihren BD-Vertreter vor Ort.

### 6. Doppelte Proben, die mit Check-Direct CPE getestet wurden, ergeben keine identischen Ergebnisse.

C<sub>T</sub>-Werte von identischen Proben können zwischen den einzelnen Reaktionen variieren. Große Abweichungen, >2 C<sub>T</sub>-Werte, sprechen für Pipettierfehler oder andere Unterschiede zwischen den doppelten Proben.










## Einschränkungen

Check-Direct CPE nutzt eine Reihe von spezifischen DNA-Markern, um das Vorliegen der Carbapenemase-Gene KPC, NDM, OXA-48 und VIM zu erkennen, die derzeit die klinisch am häufigsten verbreiteten Carbapenemasen darstellen. Der Test erkennt alle derzeit bekannten Varianten von KPC, NDM, OXA-48 und VIM außer VIM-7, eine seltene Variante, die nur in *Pseudomonas aeruginosa* gefunden wird. Es sollte beachtet werden, dass andere seltene Familien des Carbapenemase-Gens nicht erkannt werden. Der Test ist zur Verwendung mit reinen Bakterienzellen als Eingangsmaterial vorgesehen.

Die Qualität der eingegebenen DNA ist ein wichtiger Faktor für den Erhalt von zuverlässigen Ergebnissen mit Check-Direct CPE. Für Zellsuspensionen sind die richtigen Zelldichten ein wichtiger Faktor, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, und das in diesem Handbuch beschriebene Verfahren muss strengstens eingehalten werden. Die Analyse wurde ausgiebig mit DNA, die von gramnegativen Bakterien wie *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Pseudomonas* gereinigt wurde, mit ausgezeichneten Ergebnissen getestet. Es kann jedoch niemals ausgeschlossen werden, dass andere gramnegative Bakterien oder gewisse Stämme der obengenannten Arten schlechtere Ergebnisse ergeben werden. Check-Direct CPE kann und wird keine Zusicherung oder Garantie gewährleisten, dass es in der Lage ist, Carbapenemase-Gene in allen gramnegativen Arten, Unterarten oder Typen oder bei allen klinischen Proben richtig zu erkennen. Die Ergebnisse müssen möglicherweise in bestimmten Fällen (z. B. für behördliche Proben) durch weitere Methoden bestätigt werden. Aufgrund der hohen Variabilität der bakteriellen Genome ist es möglich, dass bestimmte Unterarten nicht erkannt werden. Der Test spiegelt den Wissensstand von Check-Points Health B.V. wieder.

Das Vorliegen von mehreren Bakterienarten in einer Probe kann die Interpretation des Tests erschweren. Wie bei anderen diagnostischen Analysen können die Ergebnisse dieses Tests nur in Kombination mit zusätzlichen Labor- und klinischen Daten ausgelegt werden, die der verantwortlichen Person zur Verfügung stehen. Die Verwendung dieser Analyse ist auf entsprechend qualifiziertes Personal eingeschränkt, das zur Durchführung von DNA-basierten molekularen Nachweismethoden ausgebildet wurde.

## Legende der verwendeten Symbole

Symbol	Definition
	CPE-Kontrolle
	Für die <i>In-Vitro</i> Diagnostik
	Katalognummer
	Chargen-Code
	Vor MM-JJJJ verwenden
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	Temperaturbegrenzung
	Beinhaltet ausreichendes Material für < n > Tests

## Technische Unterstützung

support@check-points.com

+31 317 453 908

Trotz größter Sorgfalt bei der Entwicklung und Herstellung des Protokolls übernimmt Check-Points keine Haftung für Fehler, Auslassungen und/oder zukünftige Änderungen daran.

**Zitierung der Literatur:** Wenn ein Verfahren zur Veröffentlichung die Verwendung dieses Produkts beschreibt, beziehen Sie sich bitte auf dieses als *Check-Direct CPE*.

### Hinweis für den Käufer:

Dieses Produkt wird unter Lizenz von PHRI Properties verkauft und kann gemäß der Patentrechte von PHRI Properties nur bei Menschen für *in-vitro*-Diagnostik, Lebensmittelkontrolle, Veterinärtests oder Forschung verwendet werden.

Farbstoffe- & Quencher-Reagenzien in diesem Produkt werden unter der Genehmigung von Biosearch Technologies, Inc. vertrieben und sind durch U.S. und weltweite Patente geschützt, die entweder erteilt wurden oder sich in der Anmeldung befinden. Die Lizenzgewährung umfasst die Anwendung bei menschlicher *in-vitro*-Diagnostik (IVD).

### Handelsmarken

BD, BD MAX™ sind Handelsmarken von Becton Dickinson GmbH

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

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



## Anhang 1: Erstellen des Check-Direct CPE Test-Programms v.4.30B und höher

Wichtige Punkte vor dem Beginn: Beziehen Sie sich auf das BD MAX™ System-Benutzerhandbuch für detaillierte Anweisungen, wie das BD MAX™ System und die Software-Version **4.30B oder höher** betrieben wird.

Um einen neuen Test in der Registerkarte **Test Editor** zu erstellen, wählen Sie **Erstellen** und wenden Sie die folgenden Anweisungen an:

- Geben Sie in der Registerkarte **Basisinformationen** die folgenden Parameter ein:
  - Testname:** *Check-Direct CPE.*
  - Extraktionsart:** Wählen Sie *Exk DNA-1 (Plasma/Serum).*
  - Master Mix Format:** Wählen Sie *Typ 1: BD MMK oder MMK (SPC) und getrocknete Primer und Sonden.*
  - Probenentnahme-Parameter:** *Standardeinstellungen* wählen, siehe Tabelle A.
  - C<sub>T</sub>-Berechnung:** wählen Sie *C<sub>T</sub> am Wendepunkt aufrufen.*

### Die Parameter speichern

- Geben Sie in der Registerkarte **PCR-Einstellungen** die folgenden Parameter ein:
  - Alias, PCR-Verstärkung und Schwellenwert:** Geben Sie für jeden Kanaldetektor die richtigen Parameter ein, die in Tabelle B angegeben sind.
  - Farbkompensation:** Geben Sie die korrekten Parameter ein, wie diese in Tabelle C angegeben sind.

### Die Parameter speichern

- Geben Sie in **Testschritte** die PCR-Schritte ein, wie in Tabelle D angegeben.

### Die Parameter speichern

**Tabelle A:** Parameter der Probenextraktion.

Parameter	Wert
Lyse-Heizdauer	10
Lyse-Temperatur	37
Probenspitzenhöhe	1600
Probenvolumen	937,5
Waschvolumen	500
Neutralizationsvolumen	12,5
DNase-Aufwärmzeit	----

**Tabelle B:** Kanaleinstellungen.

Wellenlänge	Alias	PCR-Zunahme	Threshold
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

**Tabelle C:** Farbkompensation.

	Falscher Empfangskanal					
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Anregungskanal	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	

**Tabelle D:** Testparameter der PCR-Schritte.

Schrittname	Profiltyp	Zyklen	Zeit (s)	Temp (°C)	Nachweisen
Denaturierung	Halten	1	600	98	NEIN
Amplifikation & Detektion	2 - Temperatur	45	15	98	NEIN
			62	60	JA



## Anhang 2: Leistungsmerkmale

### ***In-silico* Spezifität**

Die Spezifität des Check-Direct CPE for BD MAX™ Echtzeit-PCR-Diagnostest wird durch die Auswahl der richtigen Primer und Sonden sowie durch die Auswahl der stringenten Reaktionsbedingungen gewährleistet. Primer und Sonden-Sequenzen wurden entworfen, um spezifisch die Genvarianten in der untenstehend aufgeführten Tabelle zu erkennen. Eine 100%-ige Sequenzübereinstimmung mit den Primern und Sonden durch *in silico*-Analyse wurde angenommen, um die zuverlässige Detektion von jeder der dargestellten Varianten zu gewährleisten. Einzelne Fehlpaarungen mit den Primern und Sonden bestehen bei einigen Varianten, von denen wir erwarteten, dass die Detektion nicht beeinträchtigt werden würde. Dies wurde durch Testen solcher Varianten im Vergleich mit Varianten bestätigt, die zu 100% homolog waren.

Primer und Sonden-Sequenzen wurden unter Verwendung aller Gen-Sequenzen, die in der internationalen Genbank am 1. April 2014 vorhanden waren, auf potentielle Homologien mit Genen von anderen Organismen unter Verwendung von Sequenzvergleichsanalyse getestet. (GenBank®, NIH Gensequenz-Datenbank). Keine Kreuzhomologie mit anderen Organismen für die ausgewählten Primer und Sonden wurde gefunden.

Carbapenemase-Gen	Detektierte Varianten
KPC	1 – 17
NDM	1 – 10
VIM	1 – 6 & 8 – 38
OXA-48	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247, 370

### **Analytische Spezifität**

Die analytische Spezifität des Check-Direct CPE for BD MAX™ Echtzeit-PCR-Diagnostest wurde durch das Testen der Kreuzreaktivität mit Proben bestimmt, die einen hohen Anteil an Nicht-Zielorganismen enthalten. Eine Übersicht dieser Stämme ist in der Tabelle unten aufgeführt. Eine retrospektive Studie wurde mit 100 Bakterienstämmen von 9 verschiedenen gramnegativen Spezies durchgeführt, die vormals mit den Check-Point-Microarray-Diagnostik-Test Check-MDR CT103 (Check-Points Health) typisiert wurden.

Alle Isolate waren negativ mit dem Check-Direct CPE for BD MAX™-Assay, und die interne Kontrolle wurde in allen Proben zuverlässig erkannt. Die Spezifität basierte zu 100% auf die getesteten Referenzstämme.

Spezies	Getestete Stämme
<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

## Analytische Inklusivität

Eine retrospektive Studie wurde mit 94 Bakterienstämmen von 14 verschiedenen gramnegativen Spezies durchgeführt, die vormalig mit dem Check-Point-Mikroanalyse-Diagnostik-Test Check-MDR CT103 (Check-Points Health) als Carbapenemase-positiv erkannt wurden. Alle 94 Bakterienstämme wurden korrekt für die gezielte Carbapenemase-Gene typisiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unten dargestellt. Die Inklusivität betrug 100% für die getesteten Stämme.

Anzahl der getesteten Stämme	Check-MDR CT103 Ergebnis	Check-Direct CPE Ergebnis	Inklusivität der Ergebnisse
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%

## Klinische Leistung

Die klinische Leistung des Check-Direct CPE for BD MAX™-Assay wurde in einem zentralen Referenzlabor mit Carbapenem-unempfindlichen bakteriellen Isolaten ausgewertet, die von verschiedenen geographisch verteilten, klinischen Zentren eingereicht wurden. Insgesamt wurden 450 Isolate ausgewählt und bestanden aus 438 Enterobacteriaceae und 12 Pseudomonas spp. Zur Bezugnahme wurde das Vorliegen und die Identität von Carbapenemase-Genen in diesen Isolaten durch genspezifische PCR und/oder Analyse mit dem Check-Points Check-MDR CT102 Assay beurteilt. Isolate wurden auf MacConkey-Agar-Platten mit einer 10 mg Ertapenem-Plättchen kultiviert und unter Verwendung des Verfahrens in diesem Handbuch verarbeitet. In Bezug auf die Referenzmethode zeigte der Check-Direct CPE-Test eine Gesamtsensitivität und -spezifität von 100% bzw. 100%.

### Spezies und Carbapenemas-Gene der Auswahl der bakteriellen Isolate

Spezies	CPE-spezifische Gene						
	KPC	NDM	VIM	OXA-48	NDM + OXA-48	IMP	KEINE
<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
Sonstige*	5	6	9	1	0	1	1
<b>Gesamt</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>24</b>

\*23 Isolate, die *Citrobacter spp.* umfassen (n=15), *Raoultella spp.* (n=3), *Leclercia adecarboxylata* (n=2), *Serratia marcescens* (n=2) und *Kluyvera georgiana* (n=1).

### Gesamtleistung des Check-Direct CPE im Vergleich zur Referenzmethode

	CPE		Referenz		Gesamt
	+	-	+	-	
BD MAX™	+	402	0	402	402
CPE PCR	-	0	48	48	48
<b>Gesamt</b>		<b>402</b>	<b>48</b>	<b>450</b>	

Sensitivität: 100%

Spezifität: 100%

**Check-Direct CPE Leistung im Vergleich zur Referenzmethode für KPC**

	KPC	Referenz		Gesamt
		+	-	
BD MAX™	+	100	0	100
CPE PCR	-	0	350	350
Gesamt		100	350	450

Sensitivität: 100%  
Spezifität: 100%

**Check-Direct CPE Leistung im Vergleich zur Referenzmethode für OXA48**

	OXA-48	Referenz		Gesamt
		+	-	
BD MAX™	+	102	0	102
CPE PCR	-	0	348	348
Gesamt		102	348	450

Sensitivität: 100%  
Spezifität: 100%

**Check-Direct CPE Leistung im Vergleich zur Referenzmethode für VIM**

	VIM	Referenz		Gesamt
		+	-	
BD MAX™	+	100	0	100
CPE PCR	-	0	350	350
Gesamt		100	350	450

Sensitivität: 100%  
Spezifität: 100%

**Check-Direct CPE Leistung im Vergleich zur Referenzmethode für NDM**

	NDM	Referenz		Gesamt
		+	-	
BD MAX™	+	102	0	102
CPE PCR	-	0	348	348
Gesamt		102	348	450

Sensitivität: 100%  
Spezifität: 100%

**Bezugsquellen:**

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