

INSTRUCTIONS FOR USE

INTENDED USE

The Streck ARM-D® Kit, β-Lactamase is a qualitative molecular test for the detection of family-specific KPC, ESBL, MBL, and *ampC* gene targets by fluorescently-labeled DNA probes. Positive identification of the gene by this test indicates the presence of the detected β-lactamase gene. The assay involves extraction of DNA from bacterial cells and subsequent amplification and detection using real-time PCR. The kit can be used for active surveillance of antimicrobial resistance patterns and be beneficial for infection control. The ARM-D Kit, β-Lactamase generates data in under one hour compared to 24-48 hours for traditional phenotypic methods. **This product is FOR EXPORT ONLY, not to be sold in the United States.**

INTRODUCTION

Bacterial resistance to antibiotics poses a global threat to public health and in recent years has shown an increase in mortality rates and the potential to spread through the population. Of these resistance mechanisms, β-lactamases are enzymes that cleave β-lactam rings rendering the β-lactam family of antibiotics ineffective for treatment of clinically-important Gram-negative bacterial infections. Specifically, β-lactamases confer resistance to penicillins, cephamycins, and in some cases, carbapenems. β-lactam-resistant Gram-negative organisms producing multiple or plasmid-mediated β-lactamases are difficult to identify phenotypically and necessitate more specific detection methods to identify clinically important β-lactamases. Genetic identification of these resistance mechanisms is critical for active surveillance and infection control. Because these antibiotics are often selected for the management and prevention of infectious disease, the presence and characteristics of specific β-lactamases play a critical role in selecting the appropriate antibiotic therapy.

SUMMARY AND PRINCIPLES

Nucleic acid tests can provide supplemental information as to the resistance mechanisms in addition to conventional culture susceptibility testing. The Streck ARM-D Kit, β-Lactamase allows for identification of nine β-lactamase gene families: IMP-1, NDM, OXA-48, CTX-M-14, CTX-M-15, CMY-2, DHA, VIM, and KPC. Additionally, an endogenous internal control (IC) that targets a conserved region common in Gram-negative bacteria is included to reduce false negatives due to PCR inhibition, DNA degradation, or poor extraction. This test utilizes sequence-specific primer pairs for the PCR amplification of each target group as well as fluorescently-labeled, target-specific DNA probes for detection by real-time PCR.

This product has been validated with the following systems: Applied Biosystems (ABI) 7500 Fast and 7500 Fast Dx Real-Time PCR System, ABI QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System and QIAGEN Rotor-Gene® Q.

CONTENTS

The kit includes three multiplex primers-probe mix vials in TE buffer, pH 8.0 (10X PCR Mix 1, 2, and 3) for simultaneous real-time PCR amplification of all targets between three reaction tubes. Three external DNA control vials (Control Mix 1, 2, and 3) containing synthetic DNA templates of the corresponding multiplex targets are also included in the kit to use as a positive control for each multiplex reaction. Premixed 2X Supermix vials containing buffer, dNTPs, MgCl₂, and DNA polymerase are also included in each kit. The kit contents are sufficient for 100 reactions total, including 12 reactions of each associated control mix.

***IC is the Internal Control Gene, 16S rRNA.**

| Primer/Probe Vials | Control Vials | Cap Color | Target Genes |
|--------------------|---------------|-----------|-------------------------------|
| 10X PCR Mix 1 | Control Mix 1 | Red | CMY-2, CTX-M-14, CTX-M-15, IC |
| 10X PCR Mix 2 | Control Mix 2 | White | OXA-48, IMP, VIM, IC |
| 10X PCR Mix 3 | Control Mix 3 | Black | DHA, KPC, NDM, IC |

PRECAUTIONS

- Use established precautions with potentially biohazardous specimens according to your laboratory guidelines.
- Always use DNase/RNase-free plasticware/reagents and aerosol-barrier pipet tips.
- SDS can be obtained at streck.com, by calling +1 402-691-7510, or by calling your local supplier.

STORAGE AND STABILITY

- When stored at -20 °C, unused kit contents are stable through the expiration date.
- Minimize the number of freeze-thaw cycles where possible. Aliquots of the reagents for long-term storage may be prepared.
- When using reagents for consecutive days, store at 4 °C. Store at -20 °C for extended storage periods.

SAMPLE EXTRACTION

The Streck ARM-D Kit, β-Lactamase was validated with previously characterized DNA samples extracted from bacterial culture using the QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue Kit. 1.5ml of a 5ml overnight culture was used as per the extraction kit protocol yielding DNA concentrations that range from 10-200ng/μl, with 260/280 ratios that range from 1.4 to 2.4. Alternative growth protocols for pure bacterial cultures and nucleic acid extraction techniques/kit should also give DNA of sufficient yield and quality. The 30-cycle PCR assay has not been tested for use with clinical samples in which targets are present in low DNA copy numbers (e.g., direct, uncultured samples).

REACTION PREPARATION

Thaw reagents, vortex briefly to mix contents, and pulse-spin vials prior opening. Prepare a master mix (without template DNA) according to the table below and based upon the number of samples to be processed (plus one extra reaction). Include at least one Control Mix reaction and two no-template-control (NTC) samples for each respective multiplex PCR mix. It is recommended that each unknown sample is amplified with all three multiplex PCR mixes to maximize target identification.

Mix well by pipetting up and down several times. Aliquot 24μl of master mix into each real-time PCR well or tube. Add 1μl of unknown sample, corresponding Control Mix vial (1, 2 or 3), or nuclease-free water (for NTC) to the master mix within the respective PCR well or tube. It is recommended to run two NTC samples; one at PCR set-up to test for contaminated reagents and one after the addition of template to test for carryover during template distribution. Centrifuge PCR plate or tubes prior to loading into the respective instrument.

| Source | Component | 25μl Reaction | Final Concentration |
|--|--|---------------|---------------------|
| Lab Supplied | Nuclease-Free Water | 9.0μl | NA |
| Streck ARM-D Kit | Supermix 2X | 12.5μl | 1X |
| Streck ARM-D Kit | 10X PCR Mix 1, 2 or 3 | 2.5μl | 1X |
| Distribute Master Mix into PCR wells or tubes as appropriate before sample addition | | | |
| Lab Supplied or Streck ARM-D Kit | Template - Unknown or NTC or Template - Control Mix 1,2 or 3 | 1μl | Variable |

PCR PROTOCOL

The following protocols have been optimized for use with the supplied Supermix 2X master mix. Some instruments may require longer extension time for signal acquisition (Detection Step). Consult your instrument manual for additional information.

| Step | General Protocol | ABI 7500 Fast Dx |
|---------------|--|---|
| Hot-start | 98 °C for 30 sec | 98 °C for 30 sec |
| 30 cycles of: | 98 °C for 5 sec 60 °C for 10 sec 72 °C for 20 sec (Detection Step) | 98 °C for 10 sec 60 °C for 15 sec 72 °C for 30 sec (Detection Step) |

INSTRUMENT SET-UP

The detection of each target is based on the fluorescence of the fluorophore conjugated to each target-specific DNA probe as shown in the table below. The following are general instrument set-up instructions. Parameters specific to selected real-time PCR platforms are described in the Data Acquisition and Analysis Guides, which can be found on streck.com.

- Insert plates or tubes into the real-time PCR system.
- Create or select a thermal profile or cycling protocol.
- Assign control and sample wells when necessary.
- For data interpretation, thresholds should be manually set for optimal performance on each real-time PCR system (see Data Acquisition and Analysis Guides for recommended instrument-specific threshold and baseline settings).

Table 1. The detection of each target is based on the optical fluorescence of the fluorophore conjugated to each target-specific DNA probe. Use compatible optical channels for detection.

| Master Mix | Target Gene | Fluorophore | Excitation λ _{max} | Emission λ _{em} |
|------------|-------------|-------------|-----------------------------|--------------------------|
| PCR Mix 1 | CMY-2 | FAM | 495nm | 520nm |
| | CTX-M-15 | HEX | 538nm | 555nm |
| | CTX-M-14 | TEX615 | 596nm | 613nm |
| | IC | TYE665 | 645nm | 665nm |
| PCR Mix 2 | OXA-48 | FAM | 495nm | 520nm |
| | IMP | HEX | 538nm | 555nm |
| | VIM | TEX615 | 596nm | 613nm |
| | IC | TYE665 | 645nm | 665nm |
| PCR Mix 3 | DHA | FAM | 495nm | 520nm |
| | KPC | HEX | 538nm | 555nm |
| | NDM | TEX615 | 596nm | 613nm |
| | IC | TYE665 | 645nm | 665nm |

DATA INTERPRETATION

General: Each real-time PCR run must be validated with the Control Mix vials provided with the kit. If the specifications for C_q values for the DNA controls are not met, the results are considered invalid and samples must be re-evaluated. C_q values of unknown samples will vary depending on the starting DNA copy number. Visually inspect amplification curves for each unknown sample to verify results. As a general guideline, C_q values for β-lactamase targets in unknown isolates can range from 10 to 26.

The Streck ARM-D Kit, β-Lactamase is a qualitative test. To verify performance of the kit, each real-time PCR run must be verified with the Control Mix vials provided with the kit and by evaluating positive and negative control amplification curves.

- C_q values for positive controls may vary between real-time PCR systems. For optimal assay performance, verify that threshold values for each target and/or fluorophore have been manually set for each real-time PCR system prior to analyzing C_q values for unknown samples. (See instrument-specific Data Acquisition and Analysis Guides for more information).
- Control samples will have a positive C_q value in the FAM, HEX, TEX615, and TYE665 channels. If the C_q value is ≤ 26 for each target, control runs should be considered valid.
- Negative Controls should not have a C_q value.
- If there is a run failure on the real-time PCR system, results are invalid and the assay must be repeated.
- Unknown samples may be interpreted as positive if the C_q value is ≤ 26 cycles.
- C_q values of unknown samples will vary depending on the starting DNA concentration. If no C_q value is detected in the FAM, HEX, and TEX615 channels for unknown samples, confirm sample was added to the reactions by verifying positive amplification of the internal control (IC) in the TYE665 channel, which can be detected in each PCR mix included in the kit. If no amplification is detected with the unknown sample, the sample may be interpreted as negative for the targeted resistance mechanisms.
- If amplification of an unknown sample in the FAM, HEX, and TEX615 channels is detected after 26 cycles, the sample requires further investigation. The sample may be re-extracted, the PCR run repeated, or the amplified product could be sequenced for verification.
- If C_q values for control targets or unknown samples fall outside the indicated range, please contact Streck Technical Services for further assistance at +1 402-691-7510 or technicalservices@streck.com.

Notes:

1. As a guideline for determining target- and instrument-specific C_q values for each control, please reference the instrument-specific Data Acquisition and Analysis Guides at streck.com. These values were determined during Streck's internal validation of the assay for each control target and real-time PCR system indicated.
2. In this IFU, the term C_q (Quantification Cycle) indicates the cycle number at which fluorescence from amplification exceeds the background fluorescence as per recommendation by MIQE Guidelines. However, depending on the real-time PCR system manufacturer, the term has also been referred to as threshold cycle (C_t) or crossing point (C_p).

LIMITATIONS

1. The internal control (IC) primers have been designed to amplify a highly conserved gene target present in many Gram-negative bacteria. However, the IC may not successfully amplify from certain Gram-negative species or strains. Therefore, one should consider this in interpreting the absence of the IC product from a specific sample.
2. The gene family targets have been tested against a considerable number of isolates. The PCR primers will only amplify the specified target families, and will not detect other β-lactamases. However, given the genomic diversity of bacteria, Streck does not guarantee that all β-lactamase genes will be detected in all Gram-negative subspecies. Results from this test should be used in combination with other laboratory tests available for accurate interpretation.
3. Using the Streck ARM-D Kit, β-Lactamase with alternative 4-channel real-time PCR systems or other enzymes not listed in this IFU is possible, but optimization may be required. Contact Streck Technical Services for assistance.

ORDERING INFORMATION

Please call our Customer Service Department at +1 402-333-1982 for assistance. Additional information can be found online at streck.com.

GLOSSARY OF SYMBOLS

See the Instructions (IFU) tab under Resources on the product page at streck.com.

The brand and product names of the instruments are trademarks of their respective holders.

See streck.com/patents for patents that may be applicable to this product.



Streck
7002 S. 109 Street, La Vista, NE 68128 USA



MediMark® Europe
11, rue Emile Zola, BP 2332
38033 Grenoble Cedex 2, France

350672-2
2020-02

MODE D'EMPLOI
USAGE PRÉVU

French (Français)

Le kit ARM-D, β-lactamase de Streck est un test moléculaire qualitatif destiné à détecter les gènes cibles spécifiques de la famille KPC, ESBL, MBL et *ampC* à l'aide de sondes d'ADN marquées par fluorescence. L'identification positive du gène par ce test indique la présence du gène β-lactamase détecté. L'essai implique l'extraction d'ADN à partir de cellules bactériennes suivie d'une amplification et d'une détection par PCR en temps réel. Ce kit peut être utilisé pour surveiller activement les schémas de résistance antimicrobiennes et peut être utile pour le contrôle des infections. Comparativement aux méthodes classiques qui prennent de 24 à 48 heures, le kit ARM-D, β-lactamase génère des données en moins d'une heure. **Ce produit est RÉSERVÉ À L'EXPORTATION et n'est pas destiné à la vente aux États-Unis.**

INTRODUCTION

La résistance bactérienne aux antibiotiques représente une menace mondiale pour la santé publique ; ces dernières années, on a observé une augmentation des taux de mortalité et cette résistance a le potentiel de se propager dans toute la population. Parmi ces mécanismes de résistance, les β-lactamases sont des enzymes qui clivent les anneaux β-lactamines, rendant la famille des antibiotiques β-lactamines inefficace pour traiter les infections bactériennes cliniquement importantes à Gram négatif. Spécifiquement, les β-lactamases confèrent une résistance aux pénicillines, aux céphalosporines et dans certains cas aux carbapénèmes. Les organismes à Gram négatif résistants aux β-lactamases produisant de multiples β-lactamases ou des β-lactamases à médiation plasmidique sont difficiles à identifier de façon phénotypique et nécessitent des méthodes de détection plus spécifiques afin de détecter les β-lactamases cliniquement importantes. Une identification génétique de ces mécanismes de résistance est essentielle pour la surveillance active et le contrôle des infections. Du fait que ces antibiotiques sont souvent choisis dans la gestion et la prévention des maladies infectieuses, la présence et les caractéristiques de β-lactamases spécifiques jouent un rôle critique lors du choix d'un traitement antibiotique approprié.

RÉSUMÉ ET PRINCIPES

Les tests d'acide nucléique peuvent apporter des informations supplémentaires quant aux mécanismes de résistance en plus de l'antibiogramme classique. Le kit ARM-D, β-lactamase de Streck permet d'identifier neuf gènes de la famille des β-lactamases : IMP-1, NDM, OXA-48, CTX-M-14, CTX-M-15, CMY-2, DHA, VIM et KPC. En outre, un contrôle interne (CI) endogène, qui cible une région conservée fréquente dans les bactéries à Gram négatif, est inclus pour réduire les faux négatifs dus à l'inhibition par la PCR, la dégradation de l'ADN ou une mauvaise extraction. Le test utilise des paires d'amorces spécifiques de la séquence pour l'amplification par PCR de chaque groupe ainsi que des sondes d'ADN spécifiques de la cible et marquées par fluorescence pour une détection par PCR en temps réel.

Ce produit a été validé à l'aide des systèmes suivants : l'Applied Biosystems (ABI) 7500 Fast et 7500 Fast Dx Real-Time PCR System, l'ABI QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System, le Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System et le QIAGEN Rotor-Gene® Q.

CONTENU

Le kit inclut trois flacons de mélange amorces-sonde multiplexe dans un tampon TE, pH 8 (10X PCR Mix 1 et 3) pour une amplification par PCR en temps réel simultanée de toutes les cibles entre trois tubes de réaction. Trois flacons de contrôle ADN externe (Control Mix 1, 2 et 3) contenant des ADN matrices synthétiques des cibles multiplexes correspondantes sont aussi inclus dans le kit ; ils sont à utiliser comme contrôle positif pour chaque réaction multiplexe. Des flacons contenant un pré-mélange de 2X Supermix, de dNTP, de MgCl₂ et de DNA polymérase sont aussi inclus dans chaque kit. Le contenu du kit suffit pour 100 réactions au total, y compris 12 réactions de chaque mélange de contrôle associé.

| Flacons amorce/sonde | Flacons de contrôle | Couleur du bouchon | Gènes cibles |
|----------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------|
| 10X PCR Mix 1 | Control Mix 1 | Rouge | CMY-2, CTX-M-14, CTX-M-15, CI |
| 10X PCR Mix 2 | Control Mix 2 | Blanc | OXA-48, IMP, VIM, CI |
| 10X PCR Mix 3 | Control Mix 3 | Noir | DHA, KPC, NDM, CI |

*CI est le gène de contrôle interne, ARNr 16S.

PRÉCAUTIONS

- Utiliser les précautions établies par les directives du laboratoire pour les échantillons potentiellement contaminés.
- Toujours utiliser des récipients plastiques/réactifs et des embouts de pipette avec filtre sans DNase/RNase.
- Les fiches de données de sécurité (FDS) peuvent être obtenues sur le site streck.com, en appelant le +1 402-691-7510 ou en appelant votre fournisseur local.

CONSERVATION ET STABILITÉ

- Le contenu, non entamé, du kit est stable jusqu'à la date de péremption lorsqu'il est conservé à -20 °C.
- Si possible, minimiser le nombre de cycles de congélation/décongélation. Il est possible de préparer des aliquotes de réactifs qui pourront être conservées à long terme.
- Si les réactifs sont utilisés sur plusieurs jours consécutifs, les conserver à 4 °C. Si ce n'est pas le cas et qu'ils doivent être conservés pendant une longue période, les conserver à -20 °C.

EXTRACTION DE L'ÉCHANTILLON

Le kit ARM-D, β-lactamase de Streck a été validé avec des échantillons d'ADN précédemment caractérisés, extraits d'une culture bactérienne à l'aide du kit QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue. On a utilisé 1,5 ml d'une culture de nuit de 5 ml, conformément au protocole du kit d'extraction et elle a donné des concentrations d'ADN variant de 10 à 200 ng/μl, avec des rapports de 260/280 variant de 1,4 à 2,4. Si d'autres protocoles de cultures bactériennes pures et kit ou techniques d'extraction de l'acide nucléique sont utilisés, ils doivent aussi donner un ADN de qualité en quantité suffisante. L'essai PCR de 30 cycles n'a pas été testé pour une utilisation sur des échantillons cliniques dans lesquels des cibles sont présentes dans des préparations contenant un nombre faible de copies d'ADN (p. ex. échantillons directs, non mis en culture).

PRÉPARATION DE LA RÉACTION

Décongeler les réactifs, les passer brièvement au vortex pour mélanger le contenu, puis passer les flacons à la centrifugeuse avant de les ouvrir. Préparer le mélange mère (sans ADN matrice) en suivant les indications du tableau ci-dessous et selon le nombre d'échantillons à traiter (plus une extraction supplémentaire). Inclure au moins une réaction Control Mix et deux échantillons contrôle sans matrice (NTC, no-template-

control) pour chaque mélange PCR multiplexe respectif. Il est recommandé d'amplifier chaque échantillon inconnu à l'aide des trois mélanges PCR multiplexe afin de maximiser l'identification des cibles.

Bien mélanger en pipétant plusieurs fois. Aliquoter 24 μl du mélange mère dans chaque puits ou tube pour PCR en temps réel. Ajouter 1 μl d'échantillon inconnu, le flacon de Control Mix correspondant (1, 2 ou 3) ou bien l'eau dépourvue de nucléase (pour le NTC) au mélange mère dans le puits ou le tube PCR respectif. Il est conseillé d'exécuter deux échantillons NTC : un au moment de la PCR pour vérifier que les réactifs ne sont pas contaminés et un après avoir ajouté la matrice pour vérifier s'il y a eu contamination durant la distribution de la matrice. Centrifuger la plaque ou les tubes PCR avant de les charger sur leur instrument respectif.

| Source | Composant | Réaction 25 μl | Concentration finale |
|--|--|----------------|----------------------|
| Fourni par le laboratoire | Eau sans nucléase | 9,0 μl | NA |
| Kit Streck ARM-D | Supermix 2X | 12,5 μl | 1X |
| Kit Streck ARM-D | 10X PCR Mix 1, 2 ou 3 | 2,5 μl | 1X |
| Distribuer le mélange mère dans les puits ou tubes de PCR comme il se doit avant d'ajouter l'échantillon. | | | |
| Fourni par le laboratoire ou kit Streck ARM-D | Matrice - inconnu ou NTC ou Matrice - Control Mix 1,2 ou 3 | 1 μl | Variable |

PROTOCOLE PCR

Les protocoles suivants ont été optimisés pour être utilisés avec le mélange mère Supermix 2X fourni. Certains instruments prennent plus de temps pour acquérir le signal (étape de détection). Pour plus de renseignements, consulter le manuel de l'instrument.

| Étape | Protocole général | ABI 7500 Fast Dx |
|-------------------|--|---|
| Démarrage à chaud | 98 °C pendant 30 s | 98 °C pendant 30 s |
| 30 cycles de : | 98 °C pendant 5 s 60 °C pendant 10 s 72 °C pendant 20 s (étape de détection) | 98 °C pendant 10 s 60 °C pendant 15 s 72 °C pendant 30 s (étape de détection) |

CONFIGURATION DE L'INSTRUMENT

La détection de chaque cible est basée sur la fluorescence du fluorophore conjugué à chaque sonde d'ADN spécifique de la cible comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Suivent les instructions de configuration générales de l'instrument. Les paramètres spécifiques des plateformes PCR en temps réel sélectionnées sont décrits dans les guides d'acquisition des données et des analyses qui se trouvent sur le site streck.com.

- Insérer les plaques ou tubes dans le système pour PCR en temps réel.
- Créer ou sélectionner un profil thermique ou un protocole de cycle.
- Le cas échéant, assigner les puits des contrôles et des échantillons.
- Pour interpréter les données, des seuils doivent être manuellement établis pour une performance optimale de chaque système PCR en temps réel (voir les guides d'acquisition des données et des analyses pour les recommandations relatives aux paramètres de référence et de seuil spécifiques de chaque instrument).

Tableau 1. La détection de chaque cible est basée sur la fluorescence optique du fluorophore conjugué à chaque sonde d'ADN spécifique de chaque cible. Utiliser les canaux optiques compatibles pour la détection.

| Mélange mère | Gène cible | Fluorophore | Excitation λ _{max} | Émission λ _{em} |
|--------------|------------|-------------|-----------------------------|--------------------------|
| PCR Mix 1 | CMY-2 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | CTX-M-15 | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | CTX-M-14 | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| PCR Mix 2 | OXA-48 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | IMP | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | VIM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| PCR Mix 3 | DHA | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | KPC | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | NDM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |

INTERPRÉTATION DES DONNÉES

Général : chaque analyse PCR en temps réel doit être validée avec les flacons de Control Mix fournis avec le kit. Si les spécifications des valeurs C_q pour les contrôles de l'ADN ne sont pas satisfaisantes, les résultats sont considérés comme non valides et les échantillons doivent être réévalués. Les valeurs C_q des échantillons inconnus dépendront du nombre initial de copies d'ADN. De visu, inspecter les courbes d'amplification de chacun des échantillons inconnus pour vérifier les résultats. En général, les valeurs C_q des cibles pour β-lactamase dans les isolats inconnus varient de 10 à 26.

Le kit ARM-D, β-lactamase de Streck est un test qualitatif. Pour vérifier la performance du kit, chaque analyse PCR en temps réel doit être vérifiée à l'aide des flacons Control Mix fournis avec le kit et en évaluant les courbes d'amplification de contrôle positif et négatif.

- Les valeurs C_q des contrôles positifs peuvent varier entre les systèmes PCR en temps réel. Pour une performance optimale de l'essai, vérifier que les valeurs de seuil de chaque cible et/ou de chaque fluorophore ont été manuellement réglées pour chacun des systèmes PCR en temps réel avant d'analyser les valeurs C_q des échantillons inconnus (voir les guides d'acquisition des données et des analyses spécifiques de l'instrument pour de plus amples renseignements).
- Les échantillons de contrôle auront une valeur C_q positive dans les canaux FAM, HEX, TEX615 et TYE665. Si la valeur C_q est ≤ 26 à chaque cible, les analyses du contrôle doivent être considérées comme valides.

3. Les contrôles négatifs ne doivent pas avoir de valeur C_q .
4. Si une analyse échoue sur le système PCR en temps réel, les résultats sont non valides et l'essai doit être répété.
5. Les échantillons inconnus sont interprétés comme étant positifs si la valeur C_q est égale ou supérieure à 26 cycles.
6. Les valeurs C_q des échantillons inconnus dépendront de la concentration de départ en ADN. Si aucune valeur C_q n'est détectée dans les canaux FAM, HEX et TEX615 pour les échantillons inconnus, confirmer l'ajout de l'échantillon aux réactions en vérifiant l'amplification positive du contrôle interne (CI) dans le canal TYE665, qui peut être détectée dans chaque mélange PCR inclus dans le kit. Si aucune amplification n'est détectée dans l'échantillon inconnu, l'échantillon peut être interprété comme étant négatif pour les mécanismes de résistance ciblés.
7. Si l'amplification d'un échantillon inconnu dans les canaux FAM, HEX et TEX615 est détectée après 26 cycles, l'échantillon devra être étudié de plus près. L'échantillon peut être extrait de nouveau, la PCR répétée ou le produit amplifié peut être séquencé pour vérification.
8. Si les valeurs C_q des cibles de contrôle ou des échantillons inconnus se situent en dehors de l'intervalle indiqué, appeler les services techniques de Streck au +1 402-691-7510 ou envoyer un courriel à technicalservices@streck.com.

Remarques :

1. À titre d'aide pour déterminer les valeurs C_q cibles et spécifiques de l'instrument pour chaque contrôle, consulter les guides d'acquisition des données et des analyses spécifiques de l'instrument à streck.com. Ces valeurs ont été déterminées durant la validation interne Streck de l'essai pour chaque cible de contrôle et système pour PCR en temps réel indiqué.
2. Dans ce mode d'emploi, le terme C_q (cycle de quantification) indique le nombre de cycle auquel la fluorescence de l'amplification excède la fluorescence de fond comme recommandé par les directives MIQE. Cependant, selon le fabricant du système PCR en temps réel, le terme peut aussi être appelé le cycle du seuil (C_t) ou le point de croisement (C_p).

LIMITES

1. Les amorces du contrôle interne (CI) sont conçues pour amplifier une cible de gène hautement conservée présente dans de nombreuses bactéries à Gram négatif. Cependant, l'amplification par les CI à partir de certaines espèces ou souches à Gram négatif peut échouer. Cela doit être pris en compte lors de l'interprétation de l'absence du CI d'un échantillon spécifique.
2. Les cibles des familles génétiques ont été testées en les comparant à un nombre considérable d'isolats. Les amorces PCR n'amplifieront que les familles cibles spécifiées et ne détecteront aucun autre β -lactamase. Mais étant donné la diversité génomique des bactéries, Streck ne garantit pas que tous les gènes β -lactamase seront détectés dans toutes les sous-espèces à Gram négatif. Les résultats de ce test doivent être utilisés en association avec d'autres tests de laboratoire pour obtenir une interprétation précise.
3. Il est possible d'utiliser le kit ARM-D, β -lactamase de Streck avec d'autres plateformes PCR en temps réel à 4 canaux ou d'autres enzymes non listés dans ce mode d'emploi, mais une optimisation est nécessaire. Besoin d'aide ? Contacter les services techniques de Streck.

INFORMATIONS CONCERNANT LES COMMANDES

Pour obtenir de l'aide, appeler le service clientèle au +1 402 333 1982. Pour plus de renseignements, consulter le site streck.com.

GLOSSAIRE DES SYMBOLES

Consulter l'onglet Instructions (IFU) dans le menu Ressources sur la page produit affichée sur le site streck.com.

Les noms de marque et de produit des instruments sont des marques de commerce de leurs détenteurs respectifs.

Consulter le site streck.com/patents pour les brevets qui pourraient concerner ce produit.



Streck
7002 S. 109 Street, La Vista, NE 68128 USA



MediMark® Europe
11, rue Emile Zola, BP 2332
38033 Grenoble Cedex 2, France

350672-2
2020-02

GEBRAUCHSANWEISUNG

VERWENDUNGSZWECK

Das Streck ARM-D Kit, β -Lactamase ist ein qualitativer Molekultartest für die Erkennung von familienzuspezifischen KPC, ESBL, MBL und *ampC*-Genen durch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden. Eine positive Identifikation des Gens durch diesen Test zeigt die Präsenz des erkannten β -Lactamase-Gens an. Der Assay beinhaltet die Extraktion von DNA aus Bakterienzellen und die darauffolgende Amplifikation und Erkennung mithilfe von Echtzeit-PCR. Das Kit kann für die aktive Überwachung antimikrobieller Resistenzmuster verwendet werden und kann der Infektionskontrolle dienen. Das ARM-D Kit, β -Lactamase liefert Daten in weniger als einer Stunde im Vergleich zu den 24-48 Stunden bei herkömmlichen phänotypischen Methoden. **Dieses Produkt ist NUR FÜR DEN EXPORT bestimmt und wird in den USA nicht zum Verkauf angeboten.**

German (Deutsch)

EINFÜHRUNG

Bakterielle Resistenz gegen Antibiotika stellt eine weltweite Bedrohung der öffentlichen Gesundheit dar, die sich in den letzten Jahren in einer Steigerung bei den Sterberaten und im Potenzial der Ausbreitung innerhalb ganzer Bevölkerungsgruppen niedergeschlagen hat. Von diesen Resistenzmechanismen sind β -Lactamase Enzyme, die β -Laktamringe aufspalten und dadurch die β -Laktamfamilie der Antibiotika für die Behandlung von klinisch wichtigen gramnegativen bakteriellen Infektionen unwirksam machen. Insbesondere erzeugen β -Lactamase eine Resistenz gegen Penicilline, Cephalosporine und in einigen Fällen Carbapeneme. β -Laktam-resistente gramnegative Organismen, die multiple oder Plasmid-vermittelte β -Lactamase produzieren, sind phänotypisch schwer zu identifizieren und erfordern spezifischere Erkennungsmethoden, um die klinisch wichtigen β -Lactamase zu festzustellen. Die genetische Identifikation dieser Resistenzmechanismen ist für die aktive Überwachung und Infektionskontrolle von größter Bedeutung. Da diese Antibiotika oft zum Management und zur Vermeidung von Infektionskrankheiten ausgewählt werden, spielen das Vorhandensein und die Eigenschaften spezifischer β -Lactamase eine wesentliche Rolle in der Auswahl der geeigneten Antibiotikatherapie.

ZUSAMMENFASSUNG UND GRUNDLAGEN

Nukleinsäuretests können zusätzlich zum herkömmlichen Kulturreistenztest weitere Informationen bezüglich der Resistenzmechanismen liefern. Das Streck ARM-D Kit, β -Lactamase ermöglicht die Erkennung von neun β -Lactamase-Genfamilien: IMP-1, NDM, OXA-48, CTX-M-14, CTX-M-15, CMY-2, DHA, VIM, und KPC. Weiterhin ist eine endogene interne Kontrolle (IC), die auf eine in gramnegativen Bakterien übliche konservierte Region abzielt, enthalten, um die Falsch-Negativ-Raten aufgrund von PCR-Unterdrückung, DNA-Abbau oder ungenügender Extraktion zu reduzieren. Dieser Test verwendet sequenzspezifische Primerpaare für die PCR-Amplifikation jeder Zielgruppe sowie fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden zur Erkennung durch Echtzeit-PCR.

Dieses Produkt wurde mit den folgenden Systemen validiert: Applied Biosystems (ABI) 7500 Fast und 7500 Fast Dx Real-Time PCR System, ABI QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System und QIAGEN Rotor-Gene® Q.

INHALT

Das Kit umfasst drei Multiplex-Primer-/Sondenmix-Ampullen in TE-Puffer, pH 8,0 (10X PCR Mix 1, 2 und 3) für gleichzeitige Echtzeit-PCR-Amplifizierung aller Ziele zwischen drei Reaktionsgefäßen. Drei externe DNA-Kontrollampullen (Kontrollmix 1, 2 und 3) mit synthetischen DNA-Templates der zugehörigen Multiplex-Ziele sind ebenfalls im Kit enthalten und stellen eine positive Kontrolle für jede Multiplexreaktion dar. In jedem Kit sind ebenso Vorgemischte 2X-Supermix-Röhrchen mit Puffer, dNTPs, MgCl₂ und DNA-Polymerase enthalten. Der Kitumfang ist ausreichend für insgesamt 100 Reaktionen, einschließlich 12 Reaktionen von jedem zugehörigen Kontrollmix.

| Primer-/Sondenampullen | Kontrollampullen | Kappenfarbe | Zielgen |
|------------------------|------------------|-------------|-------------------------------|
| 10X PCR Mix 1 | Kontrollmix 1 | Rot | CMY-2, CTX-M-14, CTX-M-15, IC |
| 10X PCR Mix 2 | Kontrollmix 2 | Weiß | OXA-48, IMP, VIM, IC |
| 10X PCR Mix 3 | Kontrollmix 3 | Schwarz | DHA, KPC, NDM, IC |

*IC ist das interne Kontrollgen (Internal Control Gene), 16S rRNA.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die entsprechenden den Laborrichtlinien festgelegten Sicherheitsvorschriften für biogefährdende Materialien sind einzuhalten.
- Immer DNase-/RNase-freie Kunststoffprodukte/Reagenzien und mit Aerosolbarrieren bestückte Pipettenspitzen verwenden.
- Materialiensicherheitsdatenblätter sind unter streck.com oder telefonisch unter +1 402-691-7510 oder bei Ihrem örtlichen Lieferanten erhältlich.

LAGERUNG UND STABILITÄT

- Bei einer Lagerung bei -20 °C bleiben die nicht verwendeten Kit-Inhalte bis zum Verfallsdatum stabil.
- Die Anzahl der Frost-Tau-Zyklen muss nach Möglichkeit minimiert werden. Es können Aliquots der Reagenzien für langfristige Lagerung hergestellt werden.
- Bei Einsatz der Reagenzien an aufeinanderfolgenden Tagen, müssen diese bei 4 °C aufbewahrt werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiträumen müssen die Reagenzien bei -20 °C gelagert werden.

PROBENENTNAHME

Das Streck ARM-D Kit, β -Lactamase wurde durch zuvor charakterisierte DNA-Proben, die mithilfe des QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue Kit aus einer reinen Bakterienkultur extrahiert wurden, validiert. 1,5ml einer 5ml Übernachtkultur wurden gemäß Extraktionskit-Protokoll verwendet und ergaben DNA-Konzentrationen zwischen 10-200ng/ μ l, mit Ratios von 260/280, die zwischen 1,4 und 2,4 liegen. Alternative Wachstumsprotokolle für reine Techniken/Kits für Bakterienkulturen und Nukleinsäureextraktionen sollten auch DNA in ausreichender Menge und Qualität ergeben. Der 30-Zyklus-PCR-Assay wurde nicht zur Verwendung mit klinischen Proben getestet, bei denen die Ziele nur eine geringe Anzahl an DNA-Kopien aufweisen (z. B. direkte, unkultivierte Proben).

REAKTIONSVORBEREITUNG

Reagenzien auftauen, kurz im Vortex mischen, um den Inhalt durchzumischen, und die Ampullen vor dem Öffnen stoßweise drehen. Einen Mastermix (ohne Template-DNA) entsprechend der Tabelle unten und auf der Basis der Anzahl der zu bearbeitenden Proben (plus eine Extra-Reaktion) vorbereiten. Mindestens eine Kontrollmix-Reaktion und zwei Kontrollproben ohne Template (NTC) für jeweils jeden Multiplex-PCR-Mix hinzufügen. Es wird empfohlen, jede unbekannte Probe mit allen drei Multiplex-PCR-Mixen zu amplifizieren, um die Zielidentifikation zu maximieren.

Durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren gut durchmischen. 24 μ l des Mastermixes in den PCR-Behälter oder das Reaktionsgefäß aliquotieren. Geben Sie 1 μ l der unbekannt Probe, der zugehörigen Kontrollmixampulle (1, 2 oder 3) oder des nuklease-freien Wassers (für NTC) zum Master-Mix innerhalb des entsprechenden PCR-Behälters oder -Reaktionsgefäßes hinzu. Es wird empfohlen, zwei NTC-Proben durchlaufen zu lassen; eine bei der PCR-Einrichtung, um auf kontaminierte Reagenzien zu testen, und eine nach dem Zusetzen des Templates, um auf Übertragungen während der Template-Verteilung zu testen. Vor der Beladung des jeweiligen Gerätes die PCR-Platte oder das Reaktionsgefäß zentrifugieren.

| Source (Quelle) | Bestandteil | 25 μ l Reaktion | Endgültige Konzentration |
|--|---|---------------------|--------------------------|
| Labor-geliefert | Nuklease-freies Wasser | 9,0 μ l | NA |
| Streck ARM-D Kit | Supermix 2X | 12,5 μ l | 1X |
| Streck ARM-D Kit | 10X PCR Mix 1, 2 or 3 | 2,5 μ l | 1X |
| Verteilen Sie vor Hinzufügen der Probe den Mastermix entsprechend in PCR-Vertiefungen oder Reaktionsgefäßen | | | |
| Labor-geliefert bzw. Streck ARM-D Kit | Template - unbekannt oder NTC bzw. Template - Kontrollmix 1, 2 oder 3 | 1 μ l | Variabel |

PCR-PROTOKOLL

Die folgenden Protokolle wurden zur Nutzung mit dem zur Verfügung gestellten Supermix-2X-Mastermix optimiert. Einige Instrumente erfordern möglicherweise eine längere Frist zur Signalakquisition (Erkennungsschritt). Konsultieren Sie das Bedienerhandbuch des Instruments hinsichtlich zusätzlicher Informationen.

| Schritt | Allgemeines Protokoll | ABI 7500 Fast Dx |
|----------------|--|---|
| Heißstart | 98 °C 30 Sek lang | 98 °C 30 Sek lang |
| 30 Zyklen von: | 98 °C 5 Sek lang 60 °C 10 Sek lang 72 °C 20 Sek lang (Erkennungsschritt) | 98 °C 10 Sek lang 60 °C 15 Sek lang 72 °C 30 Sek lang (Erkennungsschritt) |

INSTRUMENTENEINSTELLUNG

Die Erkennung eines jeden Ziels basiert auf der Fluoreszenz des Fluorophors, das sich, wie in der Tabelle unten angezeigt, mit jeder zielspezifischen DNA-Sonde verknüpft hat. Sie finden im Folgenden allgemeine Anweisungen zur Instrumentenvorbereitung. Die für die Echtzeit-PCR-Plattformen spezifischen Parameter sind in den auf streck.com verfügbaren Anleitungen zur Datenakquisition und -analyse beschrieben.

- Stecken Sie die Platten oder Reaktionsgefäße in das Echtzeit-PCR-System.
- Erstellen Sie ein Thermalprofil oder Zyklusprotokoll bzw. wählen Sie ein vorhandenes aus.
- Weisen Sie ggf. die Kontroll- und Probenvertiefungen zu.
- Die Schwellenwerte sollten manuell auf dem PCR-Echtzeitsystem zur Datenauswertung eingestellt werden (siehe Anleitungen zur Datenakquisition und -analyse für die instrumentenspezifischen Schwellenwert- und Basislinieneinstellungen).

Tabelle 1. Die Erkennung eines jeden Ziels basiert auf der optischen Fluoreszenz des Fluorophors, das sich mit jeder zielspezifischen DNA-Sonde verknüpft hat. Verwenden Sie kompatible optische Kanäle zur Erkennung.

| Mastermix | Zielgen | Fluorophor | Exzitation λ_{max} | Emission λ_{em} |
|-----------|----------|------------|----------------------------|-------------------------|
| PCR Mix 1 | CMY-2 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | CTX-M-15 | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | CTX-M-14 | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| PCR Mix 2 | OXA-48 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | IMP | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | VIM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| PCR Mix 3 | DHA | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | KPC | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | NDM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |

AUSWERTUNG DER DATEN

Allgemein: Jeder Echtzeit-PCR-Lauf muss mit den Kontrollmixampullen, die im Kit mitgeliefert werden, validiert werden. Wenn die Vorgaben für die C_q-Werte nicht mit den DNA-Kontrollen übereinstimmen, dann sind die Ergebnisse ungültig und die Proben müssen neu evaluiert werden. Die C_q-Werte von unbekannt Proben werden, abhängig von der anfänglichen Anzahl von DNA-Kopien, variieren. Die Amplifikationskurven müssen für jede unbekannte Probe geprüft werden, um die Ergebnisse zu verifizieren. Die allgemeine Richtlinie besagt, dass C_q-Werte für β -Lactamase-Ziele in unbekannt Isolat zwischen 10 und 26 liegen können.

Das Streck ARM-D Kit, β -Lactamase ist ein qualitativer Test. Um die Leistung des Kits zu verifizieren muss jede Echtzeit-PCR-Analyse mit den im Kit mitgelieferten Kontrollampullen verifiziert und mithilfe von positiven und negativen Kontrollamplifikationskurven evaluiert werden.

- Die C_q-Werte für positive Kontrollen können zwischen verschiedenen Echtzeit-PCR-Systemen variieren. Verifizieren Sie für eine optimale Assayleistung, dass die Schwellenwerte für jedes Ziel und/oder Fluorophor bei jedem Echtzeit-PCR-System vor der Analyse der C_q-Werte für unbekannt Proben manuell eingestellt wurden (siehe Anleitungen zur Datenakquisition und -analyse für weitere Informationen).
- Die Kontrollproben haben einen positiven C_q-Wert in den FAM, HEX, TEX615 und TYE665 Kanälen. Wenn der C_q-Wert für jedes Ziel ≤ 26 ist, dann sollten die Kontrollläufe für gültig befunden werden.
- Negative Kontrollen sollten keinen C_q-Wert haben.
- Wenn es zu einem fehlgeschlagenen Lauf auf dem Echtzeit-PCR-System kommt, dann sind die Ergebnisse ungültig und die Assays müssen wiederholt werden.
- Unbekannte Proben können als positiv interpretiert werden, wenn der C_q-Wert ≤ 26 Zyklen ist.
- Die C_q-Werte von unbekannt Proben werden abhängig von der anfänglichen DNA-Konzentration

variieren. Wenn in den FAM-, HEX- und TEX615-Kanälen für unbekannte Proben kein C_q-Wert festgestellt wird, muss bestätigt werden, dass die Proben den Reaktionen hinzugefügt wurden, indem die positive Amplifikation der internen Kontrolle (IC) im TYE665-Kanal verifiziert wird, die in jedem im Kit enthaltenen PCR-Mix ermittelt werden kann. Wenn keine Amplifikation in der unbekannt Probe festgestellt wird, dann kann die Probe als negativ für den Ziel-Resistenzmechanismus interpretiert werden.

7. Wenn nach 26 Zyklen die Amplifikation einer unbekannt Probe in den FAM-, HEX- und TEX615-Kanälen festgestellt wird, dann muss die Probe weiter untersucht werden. Die Probe kann wieder extrahiert, der PCR-Lauf wiederholt oder das amplifizierte Produkt könnte zur Verifizierung sequenziert werden.
8. Wenn die C_q-Werte für die Kontrollziele oder unbekannt Proben außerhalb des angegebenen Bereichs liegen, wenden Sie sich bitte zur weiteren Unterstützung an den Technischen Service von Streck unter +1 402-691-7510 oder technicalservices@streck.com.

Anmerkungen:

1. Als Richtlinie für die Bestimmung von ziel- und instrumentenspezifischen C_q-Werten für jede Kontrolle wird auf die instrumentenspezifischen Richtlinien für Datenakquisition und -analyse unter streck.com verwiesen. Diese Werte wurden während der internen Validierung des Assays durch Streck für jedes Kontrollziel und indizierte Echtzeit-PCR-System bestimmt.
2. In dieser Gebrauchsanweisung bezieht sich der Begriff C_q (Zählzyklus) auf die Zyklusnummer, bei welcher die Fluoreszenz aus der Amplifikation die Hintergrundfluoreszenz gemäß der Empfehlung der MIQE-Richtlinien übersteigt. Abhängig vom Hersteller des Echtzeit-PCR-Systems wurde der Begriff auch als Echtzeit-Zyklus (Ct) oder Kreuzungspunkt (Cp) bezeichnet.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Primer zur internen Kontrolle (IC) wurden dazu entwickelt, um ein hochkonserviertes Zielgen, das in vielen gramnegativen Bakterien vorkommt, zu amplifizieren. Doch die IC ist möglicherweise nicht in der Lage, sich von bestimmten gramnegativen Arten oder Strängen zu amplifizieren. Dies sollte bei der Interpretation des Fehlen des IC-Produkts in einer bestimmten Probe in Betracht gezogen werden.
2. Die Genfamilien-Ziele wurden auf eine beträchtliche Zahl von Isolaten getestet. Die PCR-Primer amplifizieren nur die angegebenen Zielfamilien und erkennen keine anderen β-Laktamasen. Aufgrund der Genomvielfältigkeit der Bakterien kann Streck nicht garantieren, dass alle β-Laktamase-Gene in allen gramnegativen Unterspezies entdeckt werden. Zur akkuraten Interpretation sollten die Ergebnisse dieses Tests in Verbindung mit anderen verfügbaren Labortests verwendet werden.
3. Die Verwendung des Streck ARM-D Kit, β-Lactamase mit alternativen 4-Kanal Echtzeit-PCR-Plattformen oder weiteren Enzymen, die nicht in dieser Gebrauchsanweisung aufgezählt werden, ist möglich, erfordert jedoch möglicherweise eine Optimierung. Wenden Sie sich an den Technischen Service von Streck, wenn Sie Unterstützung brauchen.

BESTELLINFORMATIONEN

Unterstützung bietet unsere Kundendienstabteilung unter der US-Rufnummer +1 402-333-1982. Zusätzliche Informationen finden Sie online unter streck.com.

SYMBOLLISTE

Beachten Sie bitte die Registerkarte Anweisungen (IFU) unter Ressourcen auf der Produktseite unter streck.com.

Die Marken- und Produktnamen der Geräte sind Marken ihrer jeweiligen Inhaber.

Eventuell auf dieses Produkt zutreffende Patente finden Sie unter streck.com/patents.



Streck
7002 S. 109 Street, La Vista, NE 68128 USA



MEDIMARK® Europe
11, rue Emile Zola, BP 2332
38033 Grenoble Cedex 2, France

350672-2
2020-02

ISTRUZIONI PER L'USO

Italian (Italiano)

USO PREVISTO

Il kit Streck ARM-D Kit, β-Lactamase è un test molecolare qualitativo per l'individuazione di geni target per KPC, ESBL, MBL e ampC di famiglie specifiche tramite sonde di DNA con marcatura fluorescente. L'identificazione positiva del gene tramite questo test indica la presenza del gene produttore β-lattamasi rilevato. Il test implica l'estrazione di DNA dalle cellule batteriche e l'amplificazione e il rilevamento successivi mediante PCR in tempo reale. Il kit può essere utilizzato per la sorveglianza attiva dei pattern di resistenza agli agenti antimicrobici ed essere utile per il controllo delle infezioni. Il kit ARM-D Kit, β-Lactamase genera dati in meno di un'ora rispetto alle 24-48 ore necessarie per i metodi fenotipici tradizionali. **Questo prodotto è SOLO PER L'ESPORTAZIONE, non per la vendita negli Stati Uniti.**

INTRODUZIONE

La resistenza batterica agli antibiotici costituisce una minaccia globale per la salute pubblica e negli ultimi anni ha dato luogo a un aumento nel tasso di mortalità con potenziale rischio di diffusione nella popolazione mondiale. Nell'ambito di questi meccanismi di resistenza, le β-lattamasi sono enzimi in grado di scindere gli anelli β-lattamici rendendo la famiglia di antibiotici β-lattamici inefficace per il trattamento delle infezioni batteriche da Gram-negativi di rilevanza clinica. In particolare, le β-lattamasi conferiscono resistenza a penicilline, cefamicine e in alcuni casi a carbapenemi. Gli organismi Gram-negativi resistenti ai β-lattamici, produttori più β-lattamasi o β-lattamasi mediate da plasmidi, sono difficili da individuare dal punto di vista fenotipico e necessitano di metodi di individuazione più specifici che consentano di identificare le β-lattamasi di importanza clinica. L'identificazione genetica di questi meccanismi di resistenza è cruciale nella sorveglianza e nel controllo delle infezioni. Dato che questi antibiotici sono spesso scelti per la cura e la prevenzione di malattie infettive, la presenza e le caratteristiche di β-lattamasi specifiche gioca un ruolo fondamentale nella scelta della terapia antibiotica appropriata.

RIEPILOGO E PRINCIPI

Eseguendo i test degli acidi nucleici, oltre ai test convenzionali di sensibilità delle colture, è possibile ottenere ulteriori informazioni sui meccanismi di resistenza. Il kit Streck ARM-D Kit, β-Lactamase consente l'identificazione di nove famiglie di geni produttori β-lattamasi: IMP-1, NDM, OXA-48, CTX-M-14, CTX-M-15, CMY-2, DHA, VIM e KPC. È inoltre incluso un controllo interno endogeno (IC) mirato a una regione conservata comune nei batteri Gram-negativi, che consente di ridurre i falsi negativi dovuti a inibizione della PCR, danneggiamento del DNA o estrazione non corretta. Questo test utilizza coppie di primer a sequenza specifica per l'amplificazione della PCR di gruppo target, nonché sonde di DNA specifiche per il target, con marcatura fluorescente.

Questo prodotto è stato convalidato con i seguenti sistemi: Applied Biosystems (ABI) 7500 Fast e 7500 Fast Dx Real-Time PCR System, ABI QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System e QIAGEN Rotor-Gene® Q.

CONTENUTO

Il kit contiene tre fiale di miscela primer-sonda multiplex in soluzione tampone TE, pH 8.0 (10X PCR Mix 1, 2 e 3) per l'amplificazione simultanea della PCR in tempo reale di tutti i target presenti tra tre provette di reazione. Nel kit sono inoltre incluse tre fiale di controllo di DNA esterne (Control Mix 1, 2 e 3) contenenti templati sintetici di DNA dei target multiplex corrispondenti, da utilizzare come controllo positivo per ogni reazione multiplex. Ogni kit comprende anche fiale 2X Supermix premiscelate contenenti soluzione tampone, dNTPs, MgCl₂ e DNA polymerase (polimerasi). Il contenuto del kit è sufficiente per un totale di 100 reazioni, tra cui 12 reazioni di ogni miscela di controllo associata.

| Fiale di primer/sonda | Fiale di controllo | Colore del tappo | Geni target |
|-----------------------|--------------------|------------------|-------------------------------|
| 10X PCR Mix 1 | Control Mix 1 | Rosso | CMY-2, CTX-M-14, CTX-M-15, IC |
| 10X PCR Mix 2 | Control Mix 2 | Bianco | OXA-48, IMP, VIM, IC |
| 10X PCR Mix 3 | Control Mix 3 | Nero | DHA, KPC, NDM, IC |

*IC è il gene di controllo interno, 16S rRNA.

PRECAUZIONI

- Con i campioni a potenziale rischio biologico adottare precauzioni consolidate conformemente alle linee guida del laboratorio.
- Utilizzare sempre reagenti/oggetti in plastica privi di DNasi/RNasi e puntali per pipette con barriera aerosol.
- I documenti SDS possono essere reperiti nel sito web streck.com oppure richiedi telefonicamente al numero +1 402-691-7510 o al fornitore di zona.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservato a una temperatura di -20 °C, il contenuto del kit non utilizzato è stabile fino alla data di scadenza.
- Dove possibile, ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelo. È possibile preparare aliquote dei reagenti per la conservazione a lungo termine.
- Quando i reagenti vengono utilizzati per più giorni consecutivi, conservare a 4 °C. Conservare a -20 °C per i periodi di conservazione prolungati.

ESTRAZIONE DEI CAMPIONI

Il kit Streck ARM-D Kit, β-Lactamase è stato convalidato con campioni di DNA precedentemente caratterizzati estratti da coltura batterica utilizzando il kit QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue Kit. Sono stati utilizzati 1,5 ml di una coltura da 5 ml tenuta in incubazione durante la notte, come da protocollo del kit di estrazione, ottenendo concentrazioni di DNA da 10 a 200ng/μl con rapporto di 260/280 compreso fra 1,4 e 2,4. Risultati sufficienti in termini di produzione e qualità del DNA, saranno ottenuti anche con protocolli alternativi per le colture batteriche e altri kit/tecniche di estrazione dell'acido nucleico. Il test PCR in 30 cicli non è stato verificato per l'uso con campioni clinici in cui i target sono presenti in un basso numero di copie di DNA (ad. es. campioni diretti, non da colture).

PREPARAZIONE DELLA REAZIONE

Scongela i reagenti, agitare sul vortex per alcuni secondi per miscelare il contenuto e centrifugare a impulsi le fiale prima di aprirle. Preparare una miscela master (senza DNA template) in conformità alla tabella riportata sotto e in base al numero di campioni da elaborare (oltre a una reazione supplementare). Includere almeno una reazione Control Mix e due campioni NTC (no-template-control, controllo senza template) per ogni miscela per PCR multiplex. Si consiglia di amplificare ogni campione non noto con tutte e tre le miscele per PCR multiplex al fine di massimizzare l'identificazione dei target.

Miscelare il pozzetto pipettando varie volte. Introdurre un'aliquota di 24μl di miscela master in ogni pozzetto o provetta per PCR in tempo reale. Aggiungere 1μl di campione non noto, corrispondente alla fiala Control Mix (1, 2 o 3) o acqua priva di nucleasi (per NTC) alla miscela master nel rispettivo pozzetto o nella rispettiva provetta per PCR. Si consiglia di eseguire test su due campioni NTC: uno al momento della configurazione della PCR per verificare la presenza di eventuali reagenti contaminati e uno dopo l'aggiunta del template per verificare il residuo durante la distribuzione del template. Centrifugare la piastra o le provette per PCR prima di caricarle nello strumento.

| Origine | Componente | Reazione di 25μl | Concentrazione finale |
|--|---------------------------------|------------------|-----------------------|
| Fornita dal laboratorio | Acqua priva di nucleasi | 9,0μl | NA |
| Streck ARM-D Kit | Supermix 2X | 12,5μl | 1X |
| Streck ARM-D Kit | 10X PCR Mix 1, 2 o 3 | 2,5μl | 1X |
| Distribuire la miscela master nei pozzetti o nelle provette per PCR come appropriato prima dell'aggiunta del campione | | | |
| Fornita dal laboratorio | Template - Non noto o NTC | 1μl | Variabile |
| Streck ARM-D Kit | Template - Control Mix 1, 2 o 3 | | |

PROTOCOLLO PCR

I seguenti protocolli sono stati ottimizzati per l'uso con la miscela master Supermix 2X fornita. Alcuni strumenti possono richiedere tempi prolungati per l'acquisizione del segnale (fase di rilevamento). Per ulteriori informazioni consultare il manuale dello strumento.

| Fase | Protocollo generale | ABI 7500 Fast Dx |
|---------------------------|---|--|
| Inizio a temperatura alta | 98 °C per 30 sec. | 98 °C per 30 sec |
| 30 cicli di | 98 °C per 5 sec. 60 °C per 10 sec. 72 °C per 20 sec. (fase di rilevamento) | 98 °C per 10 sec. 60 °C per 15 sec. 72 °C per 30 sec. (fase di rilevamento) |

CONFIGURAZIONE DELLO STRUMENTO

L'individuazione di ogni target si basa sulla fluorescenza del coniugato fluoroforo per ogni sonda DNA specifica per il target, come indicato nella tabella riportata sotto. Le seguenti sono istruzioni generali per la configurazione dello strumento. I parametri specifici per le piattaforme per PCR scelte sono descritti nelle Guide per l'acquisizione dei dati e le analisi reperibili sul sito streck.com.

- Inserire le piastre o le provette nel sistema per PCR in tempo reale.
- Creare o selezionare un profilo termico o un protocollo di cicizzazione termica.
- Quando è necessario, assegnare pozzetti di controllo e campioni.
- Per l'interpretazione dei dati, occorre impostare manualmente le soglie su ogni sistema PCR in tempo reale per ottenere prestazioni ottimali (vedere le Guide per l'acquisizione dei dati e le analisi per le impostazioni consigliate di soglie e linee base specifiche per lo strumento).

Tabella 1. L'individuazione di ogni target si basa sulla fluorescenza ottica del coniugato fluoroforo per ogni sonda DNA specifica per il target. Per l'individuazione, utilizzare canali ottici compatibili.

| Miscela master | Gene target | Fluoroforo | Eccitazione λ _{max} | Emissione λ _{em} |
|----------------|-------------|------------|------------------------------|---------------------------|
| PCR Mix 1 | CMY-2 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | CTX-M-15 | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | CTX-M-14 | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| PCR Mix 2 | OXA-48 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | IMP | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | VIM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| PCR Mix 3 | DHA | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | KPC | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | NDM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |

INTERPRETAZIONE DEI DATI

Informazioni generali: Ogni test PCR in tempo reale deve essere convalidato con le fiale di miscela di controllo Control Mix fornite nel kit. Se le specifiche per i valori di C_q per i controlli del DNA non sono soddisfatte, i risultati sono considerati non validi e i campioni devono essere sottoposti a nuova analisi. I valori di C_q dei campioni non noti, varieranno in base al numero iniziale di copie di DNA. Controllare visivamente le curve di amplificazione di ogni campione non noto per verificare i risultati. Come linea guida generale, i valori di C_q per i target di β-lattamasi negli isolati non noti possono variare da 10 a 26. Il kit Streck ARM-D Kit, β-Lactamase è un test qualitativo. Per verificare le prestazioni del kit, ogni test PCR in tempo reale deve essere controllato con le fiale di miscela di controllo Control Mix in dotazione nel kit e valutando le curve di amplificazione dei controlli positivo e negativo.

- I valori di C_q per i controlli positivi possono variare tra i diversi sistemi per PCR in tempo reale. Per ottenere prestazioni ottimali dal test, verificare che i valori di soglia per ogni target e/o fluoroforo siano stati impostati manualmente per ogni sistema PCR in tempo reale prima dell'analisi dei valori di C_q per i campioni non noti, (per ulteriori informazioni vedere le Guide per l'interpretazione dei dati e le analisi specifiche dello strumento).
- I campioni di controllo avranno un valore di C_q positivo nei canali FAM, HEX, TEX615 e TYE665. Se il valore di C_q è ≤ 26 per ogni target, il test di controllo deve essere considerato valido.
- I controlli negativi non devono presentare un valore di C_q.
- Qualora si verificasse un errore di elaborazione del sistema per PCR in tempo reale, i risultati non saranno validi e il test dovrà essere ripetuto.

- I campioni non noti possono essere interpretati come positivi se il valore di C_q è ≤ 26 cicli.
- I valori di C_q dei campioni non noti, varieranno in base alla concentrazione di DNA iniziale. Se nei canali FAM, HEX e TEX615 non viene rilevato alcun valore di C_q per i campioni non noti, verificare che il campione sia stato aggiunto alle reazioni controllando l'amplificazione positiva del controllo interno (IC) nel canale TYE665, rilevabile in ogni miscela PCR inclusa nel kit. Qualora non fosse rilevata alcuna amplificazione con il campione non noto, il campione può essere interpretato come negativo per i meccanismi di resistenza target.
- Se dopo 26 cicli viene rilevata amplificazione di un campione non noto nei canali FAM, HEX e TEX615, il campione richiede ulteriore indagine. Il campione può essere estratto nuovamente e il test PCR può essere ripetuto oppure il prodotto amplificato può essere sottoposto a sequenziamento per verifica.
- Se i valori di C_q per i target o i campioni non noti di controllo non rientrano nel range indicato, contattare i servizi di assistenza tecnica di Streck per ulteriore supporto al numero +1 402-691-7510 o all'indirizzo technicalservices@streck.com.

Note:

- Come linea guida per la determinazione dei valori di C_q di ogni controllo, specifici per strumento e target, consultare le Guide per le acquisizioni dei dati e le analisi specifiche dello strumento, reperibili sul sito streck.com. Questi valori sono stati determinati durante la convalida interna del test eseguita da Streck per ogni target di controllo e sistema PCR in tempo reale indicato.
- Nelle presenti istruzioni per l'uso, il termine C_q (Quantification Cycle, ciclo di quantificazione) indica il numero di cicli in cui la fluorescenza da amplificazione supera la fluorescenza di fondo come da raccomandazione delle Linee guida MIQE. Tuttavia, a seconda del produttore del sistema per PCR in tempo reale, il termine è indicato anche come ciclo di soglia (Ct) o crossing point (Cp).

LIMITAZIONI

- I primer del controllo interno (IC) sono stati studiati per amplificare un target genico altamente conservato presente in molti batteri Gram-negativi. Tuttavia, l'IC potrebbe non amplificare correttamente target provenienti da determinati ceppi o specie di batteri Gram-negativi. Occorre pertanto considerare questa condizione nell'interpretazione dell'assenza di prodotto da IC di un campione specifico.
- Le famiglie di geni target sono state sottoposte a test rispetto a un numero considerevole di isolati. I primer per PCR amplificheranno unicamente le famiglie target specificate e non rileveranno altre β -lattamasi. Tuttavia, data la diversità genomica dei batteri, Streck non garantisce l'individuazione di tutti i geni produttori β -lattamasi in tutte le sottospecie di Gram-negativi. Per un'interpretazione accurata, i risultati di questo test devono essere utilizzati in combinazione con altri test di laboratorio disponibili.
- L'utilizzo del kit Streck ARM-D Kit, β -Lattamase con sistemi per PCR in tempo reale a 4 canali alternative o altri enzimi non elencati nelle presenti istruzioni per l'uso è possibile, tuttavia può esserne necessaria l'ottimizzazione. Contattare i servizi di assistenza tecnica Streck per ricevere assistenza.

INFORMAZIONI PER L'ORDINAZIONE

Per assistenza rivolgersi al reparto Servizio di Assistenza ai Clienti al numero +1 402-333-1982. Per ulteriori informazioni visitare il sito Web streck.com.

GLOSSARIO DEI SIMBOLI

Vedere la scheda Instructions (Istruzioni) (IFU) in Resources (Risorse) sulla pagina del prodotto all'indirizzo streck.com.

I marchi e i nomi dei prodotti sono marchi di fabbrica dei rispettivi titolari.

Vedere streck.com/patents per i brevetti che potrebbero essere applicabili a questo prodotto.



Streck
7002 S. 109 Street, La Vista, NE 68128 USA



MEDI-MARK® Europe
11, rue Emile Zola, BP 2332
38033 Grenoble Cedex 2, France

350672-2
2020-02

INSTRUCCIONES DE USO

USO PREVISTO

El kit Streck ARM-D, β-Lactamase es una prueba molecular cualitativa para la detección de objetivos de genes KPC, ESBL, MBL y *ampC* específicos de la familia con sondas de ADN marcadas de manera fluorescente. La identificación positiva de los genes en esta prueba indica la presencia del gen de betalactamasa detectado. El ensayo incluye la extracción de ADN a partir de células bacterianas, y la amplificación y la detección posteriores mediante PCR en tiempo real. El kit se puede utilizar para el control activo de patrones de resistencia antimicrobiana y puede ser beneficioso para controlar infecciones. El kit ARM-D, β-Lactamase genera datos en una hora, en comparación con los métodos fenotípicos tradicionales, que demoran entre 24 y 48 horas. **Este producto es SOLO PARA EXPORTACIÓN; no se debe vender en los Estados Unidos.**

Spanish (Español)

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos plantea una amenaza global a la salud pública y, en los últimos años, ha demostrado un aumento en los índices de mortalidad y el potencial de expandirse entre la población. Entre estos mecanismos de resistencia, las betalactamasas son enzimas que atraviesan los anillos betalactámicos y hacen que la familia de antibióticos betalactámicos sea ineficaz para el tratamiento de infecciones bacterianas gram negativas clínicamente importantes. Específicamente, las betalactamasas ofrecen resistencia a las penicilinas, a las cefamicinas y, en algunos casos, a los carbapenemas. Los organismos gram negativos resistentes a los betalactámicos que producen betalactamasas múltiples o mediadas por plásmidos son difíciles de identificar fenotípicamente y requieren de métodos de detección más específicos para identificar las betalactamasas clínicamente importantes. La identificación genética de estos mecanismos de resistencia es fundamental para los controles activo y de las infecciones. Dado que estos antibióticos, en general, se seleccionan para el manejo y la prevención de enfermedades infecciosas, la presencia y las características de las betalactamasas específicas desempeñan un rol fundamental en la selección de la terapia antibiótica apropiada.

RESUMEN Y PRINCIPIOS

Las pruebas de ácido nucleico pueden ofrecer información complementaria de los mecanismos de resistencia, además de pruebas de susceptibilidad al cultivo convencional. El kit Streck ARM-D, β-Lactamase permite identificar nueve familias de genes de betalactamasas: IMP-1, NDM, OXA-48, CTX-M-14, CTX-M-15, CMY-2, DHA, VIM y KPC. Además, se incluye un control interno (IC) endógeno que apunta a una región conservada común en bacterias gram negativas para reducir los falsos negativos debido a la inhibición de PRC, degradación del ADN o extracción deficiente. Esta prueba utiliza pares primer específicos de secuencia para la amplificación de PCR en cada grupo objetivo, y sondas de ADN específicas para el objetivo y marcadas de manera fluorescente para la detección a través de PCR en tiempo real.

Este producto ha sido validado con los siguientes sistemas: Applied Biosystems (ABI) 7500 Fast y 7500 Fast Dx Real-Time PCR System, ABI QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System y QIAGEN Rotor-Gene® Q.

CONTENIDO

El kit incluye tres viales para mezcla con sonda-primers múltiples en amortiguador TE, pH 8.0 (10X PCR Mezcla 1, 2 y 3) para amplificación simultánea de PCR en tiempo real de todos los objetivos entre tres tubos de reacción. Además, el kit incluye tres viales externos para control de ADN (Mezcla para control 1, 2 y 3) que contienen plantillas de ADN sintético de los objetivos múltiples correspondientes para usar como control positivo de cada reacción múltiple. Los viales 2X Supermix premezclados con amortiguador, dNTP, MgCl₂ y DNA polymerase (ADN polimerasa) también se incluyen en cada kit. El contenido del kit es suficiente para un total de 100 reacciones, incluidas 12 reacciones de cada mezcla de control asociada.

| Viales primer/sonda | Viales para control | Color del tapón | Genes objetivo |
|---------------------|---------------------|-----------------|-------------------------------|
| Mezcla 10X PCR 1 | Mezcla de control 1 | Rojo | CMY-2, CTX-M-14, CTX-M-15, IC |
| Mezcla 10X PCR 2 | Mezcla de control 2 | Blanco | OXA-48, IMP, VIM, IC |
| Mezcla 10X PCR 3 | Mezcla de control 3 | Negro | DHA, KPC, NDM, IC |

IC es el gen de control interno, 16S ARN.

PRECAUCIONES

1. Respete las precauciones establecidas con las muestras que puedan ser biológicamente peligrosas de acuerdo con las pautas del laboratorio.
2. Utilice siempre recipientes plásticos/reactivos sin ADNasa/ARNasa y puntas de pipeta resistentes a los aerosoles.
3. Para obtener hojas de datos de seguridad, vaya al sitio web streck.com, o llame al +1 402-691-7510 o al proveedor de su localidad.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. El contenido del kit se conserva estable hasta la fecha de vencimiento si se almacena a -20 °C.
2. Reduzca la cantidad de ciclos de congelamiento/descongelamiento siempre que sea posible. Se pueden preparar alícuotas de los reactivos para el almacenamiento a largo plazo.
3. Al utilizar reactivos durante días consecutivos, almacene a 4 °C. Almacene a -20 °C en caso de períodos de almacenamiento prolongados.

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

El kit Streck ARM-D, β-Lactamase se validó con muestras de ADN previamente caracterizadas, extraídas de un cultivo bacteriano con el kit para sangre y tejidos QIAGEN® DNeasy®. Se utilizaron 1,5 ml de un cultivo nocturno de 5 ml de acuerdo con el protocolo del kit de extracción, lo que produjo concentraciones de ADN a partir de 10-200 ng/μl, con coeficientes de 260/280 desde 1,4 hasta 2,4. Los protocolos de crecimiento alternativos para los cultivos bacterianos puros, y las técnicas/los kits de extracción de ácido nucleico también deberían generar un ADN de calidad y rendimiento suficientes. El ensayo de PCR de 30 ciclos no se ha probado para el uso con muestras clínicas, en donde los objetivos aparecen en baja cantidad de copias de ADN (por ejemplo, muestras directas sin cultivo).

PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN

Descongele los reactivos, agite en vórtex brevemente para mezclar el contenido y pulse-centrifugue los viales antes de abrir. Prepare una mezcla maestra (sin plantilla de ADN) de acuerdo con la siguiente tabla y la cantidad de muestras que se deben procesar (además de una reacción adicional). Incluya al menos una reacción de mezcla de control y dos muestras de control sin plantilla (NTC) para cada mezcla respectiva de PCR múltiple. Se recomienda amplificar cada muestra desconocida con las tres mezclas de PCR múltiple para maximizar la identificación del objetivo.

Mezcle bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces. Coloque una parte alícuota de 24 μl de la mezcla maestra en cada recipiente o tubo de PCR en tiempo real. Agregue 1 μl de muestra desconocida, el vial para mezcla de control correspondiente (1, 2 o 3) o agua sin nucleasas (para NTC) a la mezcla maestra

en el recipiente o tubo de PCR respectivo. Se recomienda realizar un ensayo con dos muestras de NTC; una durante la configuración del PCR para realizar una prueba en busca de reactivos contaminados y la otra, después de agregar la plantilla para probar el arrastre durante su distribución. Centrifugue las placas o los tubos de PCR antes de cargarlos en el instrumento correspondiente.

| Fuente | Componente | Reacción de 25 μl | Concentración final |
|---|---------------------------------------|-------------------|---------------------|
| Proporcionada por el laboratorio | Agua sin nucleasas | 9,0 μl | NA |
| Kit Streck ARM-D | Supermix 2X | 12,5 μl | 1X |
| Kit Streck ARM-D | Mezcla 10X PCR 1, 2 o 3 | 2,5 μl | 1X |
| Distribuya la mezcla maestra en los recipientes o tubos de PCR según corresponda antes de agregar la muestra | | | |
| Proporcionada por el laboratorio | Plantilla: desconocida o NTC | 1 μl | Variable |
| Kit Streck ARM-D | Plantilla: mezcla de control 1, 2 o 3 | | |

PROTOCOLO DE PCR

Los siguientes protocolos se han optimizado para su uso con la mezcla maestra Supermix 2X suministrada. Es posible que algunos instrumentos requieran más tiempo para adquirir la señal (paso de detección). Consulte el manual de su instrumento para obtener más información.

| Paso | Protocolo general | ABI 7500 Fast Dx |
|--------------------|---|--|
| Inicio en caliente | 98 °C durante 30 s | 98 °C durante 30 s |
| 30 ciclos de: | 98 °C durante 5 s 60 °C durante 10 s 72 °C durante 20 s (paso de detección) | 98 °C durante 10 s 60 °C durante 15 s 72 °C durante 30 s (paso de detección) |

CONFIGURACIÓN DEL INSTRUMENTO

La detección de cada objetivo se basa en la fluorescencia del fluoróforo conjugado en cada sonda de ADN específica para el objetivo, como se muestra en la siguiente tabla. A continuación se presentan las instrucciones de configuración general del instrumento. Los parámetros específicos de las plataformas de PCR seleccionado en tiempo real se describen en las Guías de adquisición y análisis de datos, que se pueden encontrar en streck.com.

1. Introduzca las placas o los tubos en el sistema de PCR en tiempo real.
2. Cree o seleccione un perfil térmico o protocolo de ciclos.
3. Asigne recipientes de control y muestra cuando sea necesario.
4. Para interpretar los datos, los umbrales deben configurarse de manera manual para un rendimiento óptimo en cada sistema PCR en tiempo real (consulte las Guías de adquisición y análisis de datos para conocer la configuración del umbral y de la línea base específica del instrumento).

Tabla 1. La detección de cada objetivo se basa en la fluorescencia del fluoróforo conjugado en cada sonda de ADN específica para el objetivo. Utilice canales ópticos compatibles para la detección.

| Mezcla maestra | Gen objetivo | Fluoróforo | Excitación λ _{máx.} | Emisión λ _{em} |
|----------------|--------------|------------|------------------------------|-------------------------|
| Mezcla PCR 1 | CMY-2 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | CTX-M-15 | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | CTX-M-14 | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| Mezcla PCR 2 | OXA-48 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | IMP | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | VIM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| Mezcla PCR 3 | DHA | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | KPC | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | NDM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |

INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

General: Cada ensayo de PCR en tiempo real se debe validar con los viales para mezcla de control proporcionados con el kit. Si no se respetan las especificaciones para los valores C_q en los controles de ADN, los resultados se consideran no válidos y las muestras deben volver a evaluarse. Los valores C_q de muestras desconocidas variarán en función de la cantidad de copias de ADN iniciales. Inspeccione de manera visual las curvas de amplificación de cada muestra desconocida para verificar los resultados. Como pauta general, los valores C_q para los objetivos de betalactamasa en cultivos aislados desconocidos pueden oscilar entre 10 y 26.

El kit Streck ARM-D, β-Lactamase es una prueba cualitativa. Para comprobar el rendimiento del kit, cada ensayo de PCR en tiempo real se debe verificar con los viales para mezcla de control que se entregan con el kit, y mediante la evaluación de las curvas de amplificación de control positivo y negativo.

1. Los valores C_q para controles positivos pueden variar entre los sistemas de PCR en tiempo real. Para lograr un rendimiento óptimo del ensayo, verifique que los valores de umbral de cada objetivo o fluoróforo se hayan configurado de manera manual en cada sistema de PCR en tiempo real antes de analizar los valores C_q de muestras desconocidas. (Consulte las Guías de adquisición y análisis de datos específicas del instrumento para obtener más información).
2. Las muestras de control ofrecerán un valor C_q positivo en los canales FAM, HEX, TEX615 y TYE665. Si el valor C_q es ≤ 26 en cada objetivo, los ensayos de control deben considerarse válidos.
3. Los controles negativos no tienen un valor C_q.
4. Si se produce un error en el ensayo en el sistema de PCR en tiempo real, los resultados no son válidos y el ensayo debe repetirse.
5. Es posible que las muestras desconocidas se interpreten como positivas si el valor C_q es ≤ 26 ciclos.
6. Los valores C_q de muestras desconocidas variarán en función de la concentración de ADN inicial. Si no se detecta ningún valor C_q en los canales FAM, HEX y TEX615 para muestras desconocidas, confirme que la muestra se haya agregado a las reacciones mediante la verificación de la amplificación positiva

del control interno (IC) en el canal TYE665, que se puede detectar en cada mezcla de PCR incluida en el kit. Si no se detecta ninguna amplificación con la muestra desconocida, es posible que la muestra se interprete como negativa para los mecanismos de resistencia objetivos.

- Si se detecta la amplificación de la muestra desconocida en los canales FAM, HEX y TEX615 luego de 26 ciclos, la muestra requiere más investigación. Es posible volver a extraer la muestra, volver a realizar el ensayo de PCR o secuenciar el producto amplificado para la verificación.
- Si los valores C_q de los objetivos de control o de las muestras desconocidas se encuentran fuera del rango indicado, comuníquese con el Servicio Técnico de Streck para obtener más asistencia al +1 402-691-7510 o escriba a technicalservices@streck.com.

Notas:

- Como pauta para determinar los valores C_q específicos del objetivo y del instrumento para cada control, consulte las Guías de adquisición y análisis de datos específicas del instrumento, disponibles en streck.com. Estos valores se determinaron durante la validación interna del ensayo de Streck para cada objetivo de control y sistema PCR en tiempo real indicados.
- En estas IFU, el término C_q (ciclo de cuantificación) indica el número de ciclo en el que la fluorescencia de la amplificación supera la fluorescencia original de acuerdo con las recomendaciones de las Pautas MIQE. Sin embargo, según quién sea el fabricante del sistema PCR en tiempo real, el término también se conoce como ciclo de umbral (C_t) o punto de cruce (C_p).

LIMITACIONES

- Los primers de control interno (CI) han sido diseñados para amplificar un objetivo de gen altamente conservado en muchas bacterias gram negativas. Sin embargo, es posible que el CI no amplifique correctamente ciertas especies o cepas gram negativas. Por lo tanto, esto debería considerarse para interpretar la ausencia del producto de CI en una muestra específica.
- Los objetivos de la familia de genes se han probado respecto de una cantidad considerable de cultivos aislados. Los primers de PCR solo amplificarán las familias objetivo especificadas y no detectarán otras betalactamasas. Sin embargo, debido a la diversidad genómica de las bacterias, Streck no garantiza la detección de todos los genes de betalactamasa en todas las subespecies gram negativas. Los resultados de esta prueba deben utilizarse en combinación con otras pruebas de laboratorio disponibles para llevar a cabo una interpretación precisa.
- Es posible utilizar el kit Streck ARM-D, β -Lactamase con sistemas alternativos de PCR en tiempo real de 4 canales u otras enzimas no enumeradas en esta IFU, pero será necesario realizar una optimización. Comuníquese con el Servicio Técnico de Streck para recibir asistencia.

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Si necesita ayuda, póngase en contacto con nuestro Departamento de Atención al Cliente llamando al +1 402-333-1982. En el sitio web streck.com encontrará más información.

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

Vea la pestaña de instrucciones (IFU) bajo la sección Recursos en la página del producto, en streck.com.

Las marcas y los nombres de productos de los instrumentos son marcas comerciales de sus respectivos titulares.

En streck.com/patents encontrará las patentes que pudieran estar relacionadas con este producto.



Streck
7002 S. 109 Street, La Vista, NE 68128 USA



MediMark® Europe
11, rue Emile Zola, BP 2332
38033 Grenoble Cedex 2, France

350672-2
2020-02

BRUKSANVISNING

ANVÄNDNINGOMRÅDE

Streck ARM-D Kit, betalaktamas är ett kvalitativt molekylärt test för att detektera familjespecifika KPC, ESBL, MBL och ampC genmål genom fluorescensmärkta DNA-sonder. Positiv identifikation av genen vid det här testet anger förekomsten av detekterad cmpC betalaktamasgen. Analysen omfattar extraktion av DNA från bakterieceller och efterföljande amplifiering och detektering med användning av realtids-PCR. Satsen kan användas för aktiv övervakning av antimikrobiellt resistenta mönster och vara till nytta för infektionskontroll. ARM-D Kit, betalaktamas genererar data under mindre än en timme i jämförelse med 24-48 timmar för traditionella fenotypiska metoder. **Produkten är ENBART avsedd FÖR EXPORT, ej för försäljning i USA.**

Swedish (Svenska)

INLEDNING

Bakteriell resistens mot antibiotika utgör ett globalt hot för folkhälsan och har under senare år uppvisat en ökning av dödligheten och potentialen att sprida sig genom befolkningen. Av dessa resistenta mekanismer är betalaktamas enzymer som klyver betalaktama ringar vilket gör den betalaktama antibiotikafamiljen ineffektiv för behandling av kliniskt viktiga gramnegativa bakterieinfektioner. Särskilt betalaktamas ger resistens mot penicillin, cefamyciner, och i vissa fall, karbapenemer. Betalaktamas-resistenta gramnegativa organismer som producerar flera eller plasmidmedierade betalaktamas är fenotypiskt svåra att identifiera och kräver specifika detekteringsmetoder för att identifiera kliniskt viktiga betalaktamas. Genetisk identifikation av dessa resistenta organismer är kritisk för aktiv övervakning och infektionskontroll. Eftersom denna antibiotika ofta väljs för att hantera och förhindra infektionssjukdomar spelar närvaron och egenskaperna på vissa betalaktamas en avgörande roll i valet av en lämplig antibiotikabehandling.

SAMMANFATTNING OCH PRINCIPER

Tester med nukleinsyra kan tillhandahålla kompletterande information om resistensmekanismerna jämte tester för konventionell kulturkänslighet. Streck ARM-D Kit, betalaktamas tillåter identifikation av nio betalaktamas genfamiljer: IMP-1, NDM, OXA-48, CTX-M-14, CTX-M-15, CMY-2, DHA, VIM, och KPC. Dessutom ingår en endogen intern kontroll (IC) som riktar sig mot en bevarad del som är vanlig i gramnegativa bakterier för att minska falska negativa på grund av PCR-hämning, DNA-degradering eller dålig extraktion. Det här testet använder sekvensspecifika primerpar för PCR-amplifiering av varje målgrupp samt DNA-sonder för detektering av realtids-PCR.

Denna produkt har godkänts med följande system: Applied Biosystems (ABI) 7500 Fast och 7500 Fast Dx Real-Time PCR System, ABI QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System och QIAGEN Rotor-Gene® Q.

INNEHÅLL

Satsen består av tre flaskor med multiplexa primer-sondblandningar i TE-bufferten, pH 8,0 (10X PCR-blandning 1 och 3) för samtidig PCR-förstärkning i realtid för alla mål mellan två reaktionsrör. Även tre externa DNA-kontrollflaskor (kontrollblandning 1 och 3) som innehåller syntetiska DNA-templat för motsvarande multiplexmål ingår i satsen som ska användas som en positiv kontroll för varje multiplex reaktion. Förblandade 2X Supermix-flaskor innehållande buffert, dNTPs, MgCl₂ och DNA-polymerase finns också med i varje sats. Satsens innehåll räcker till totalt 100 reaktioner, inklusive 12 reaktioner för varje associerad kontrollblandning.

| Primer/sondfaskor | Kontrollflaskor | Lockfärg | Målgener |
|---------------------|---------------------|----------|-------------------------------|
| 10X PCR-blandning 1 | Kontrollblandning 1 | Röd | CMY-2, CTX-M-14, CTX-M-15, IC |
| 10X PCR-blandning 2 | Kontrollblandning 2 | Vit | OXA-48, IMP, VIM, IC |
| 10X PCR-blandning 3 | Kontrollblandning 3 | Svart | DHA, KPC, NDM, IC |

*IC är den interna kontrollgenen (Internal Control Gene), 16S rRNA.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- Använd etablerade försiktighetsåtgärder med potentiellt biologiskt farliga specimen i enlighet med riktlinjerna i ditt laboratorium.
- Använd alltid plastvara/reagenser som är fria från DNase/RNase och pipettspetsar med aerosol-barriär.
- Säkerhetsdatablad kan hämtas från streck.com eller kan fås genom att ringa +1 402-691-7510 eller närmaste leverantör.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

- Vid förvaring i -20°C är oanvänt innehåll i setet stabila fram till förfallodatumet.
- Minimera om möjligt antalet frys- och upptinningscykler. Alikvoter på reagenserna kan förberedas för långvarig förvaring.
- Förvara i 4°C om du använder reagenser flera dagar i följd. Förvara i -20°C för längre förvaringsperioder.

PROVEXTRAKTION

Streck ARM-D Kit, betalaktamas godkändes med tidigare karakteriserade DNA-prov som extraherades från ren bakteriekultur med QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue Kit. 1,5 ml av 5 ml övernattningskultur användes i enlighet med extraktionsutrustningens protokoll vid framställningen av DNA-koncentrationer som sträcker sig från 0-200ng/μl, med förhållande 260/280 som sträcker sig från 1,4 till 2,4. Alternativa tillväxtprotokoll för rena bakteriekulturer och nukleinsyra-extraktionsutrustning/sats bör även ge DNA med tillräcklig avkastning och kvalitet. 30-cykels PCR-analysen har inte testats för användning med kliniska prover vars mål finns i antalet låga DNA-kopior (t.ex. direkta ej odlade prover).

REAKTION FÖRBEREDELSE

Uppättningsreagenser, virvlas kort för att blanda innehållet och flaskorna pulscentrifugerar innan de öppnas. Förbered en masterblandning (utan templat-DNA) enligt tabellen nedan och baserad på antalet prover som ska processas (plus en extra reaktion). Inkludera åtminstone en reaktion av en kontrollblandning och två prover för reagenskontroll utan templat (NTC, no-template-control) för respektive multiplexa PCR-blandning. Vi rekommenderar att varje okänt prov amplifieras med alla tre multiplex PCR-blandningarna för att maximera målidentifikationen.

Blandningen kommer att pipetteras upp och ner flera gånger. Alikvoten 24μl på masterblandningen i varje realtids-PCR-brunn eller -rör. Tillsätt 1μl av okänt prov som motsvarar flaskan med kontrollblandningen (1, 2 eller 3) eller nukleasfritt vatten (för NTC) till masterblandningen i respektive PCR-brunn eller -rör. Vi rekommenderar att du kör två NTC-prover; en under PCR-installationen för att testa mot kontaminerade reagenser och en efter templatet har tillsatts för att testa mot överföring under templatets distribution. Centrifugera PCR-platta eller rör före laddning i respektive instrument.

| Källa | Komponent | 25μl reaktion | Slutgiltig koncentration |
|---|--|---------------|--------------------------|
| Levererat lab | Nukleasfritt vatten | 9,0μl | |
| Streck ARM-D Kit | Supermix 2X | 12,5μl | 1X |
| Streck ARM-D Kit | 10X PCR-blandning 1, 2 eller 3 | 2,5μl | 1X |
| Distribuera masterblandningen i PCR-brunnar eller -rör i förekommande fall innan provet tillsätts. | | | |
| Levererat lab eller Streck ARM-D Kit | Templat - Okänd eller NTC eller Templat - Kontrollblandning 1,2 eller 3 | 1μl | Variabel |

PCR PROTOKOLL

Följande protokoll har optimerats för användning med den medföljande Supermix 2X mastermixen. Läs manualen till ditt instrument för mer information.

| Steg | Allmänt protokoll | ABI 7500 Fast Dx |
|---------------|---|--|
| Varm start | 98°C i 30 sek | 98°C i 30 sek |
| 30 cykler på: | 98°C i 5 sek 60°C i 10 sek 72°C i 20 sek (Detekteringssteg) | 98°C i 10 sek 60°C i 15 sek 72°C i 30 sek (Detekteringssteg) |

MONTERA INSTRUMENTET

Detekteringen av varje mål baseras på fluoroforens fluorescens som har konjugerats till varje målspecifik DNA-sond såsom visas i tabellen nedan. Nedan följer allmänna instruktioner för instrumentets montering. Parametrar som är specifika för vald realtids-PCR-plattformar beskrivs i guiderna för datainsamling och analyser som finns på streck.com.

- Stoppa in plattor eller rör i realtids-PCR-systemet.
- Skapa eller välj en termisk profil eller cykelprotokoll.
- Tilldela vid behov kontroll- och provbrunnar.
- För datatolkning bör trösklarna ställas in manuellt för optimal prestanda på varje realtids-PCR-system (se guider för datainsamling och analyser för rekommenderad inställning av instrumentspecifik tröskel och baslinje).

Tabell 1. Detekteringen av varje mål baseras på den optiska fluoroforens fluorescens som har konjugerats till varje målspecifik DNA-sond. Använd kompatibla optiska kanaler för detektering.

| Masterblandning | Målgén | Fluorofor | Excitation λ _{max} | Emission λ _{em} |
|-----------------|----------|-----------|-----------------------------|--------------------------|
| PCR-blandning 1 | CMY-2 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | CTX-M-15 | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | CTX-M-14 | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| PCR-blandning 2 | OXA-48 | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | IMP | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | VIM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |
| PCR-blandning 3 | DHA | FAM | 495 nm | 520 nm |
| | KPC | HEX | 538 nm | 555 nm |
| | NDM | TEX615 | 596 nm | 613 nm |
| | IC | TYE665 | 645 nm | 665 nm |

DATATOLKNING

Allmänt: Varje realtids-PCR-körning måste godkännas med flaskorna med kontrollblandningen som medföljer satsen. Om specifikationerna för C_q-värdena för DNA-kontrollerna inte möts ska resultaten anses vara ogiltiga och proverna måste utvärderas på nytt. C_q-värden på ökända prover kommer att variera beroende på det inledande DNA:ets kopieantal. Inspektera amplifieringskurvor visuellt för varje okänt prov för att verifiera resultatet. Som en allmän riktlinje kan C_q-värden för betalaktamas mål i ökända isolater variera från 10 till 26.

Streck ARM-D Kit, betalaktamas är ett kvalitativt test. För att verifiera satsens prestanda måste varje körning av realtids-PCR verifieras med flaskor med kontrollblandningen som medföljer satsen och genom att utvärdera positiva och negativa kontrollamplifieringskurvor.

- C_q-värden för positiva kontroller kan variera mellan realtids-PCR-system. För optimal analysprestanda, verifiera att tröskelvärdena för varje mål och/eller fluorofoer har ställts in manuellt för varje realtids-PCR-system innan du analyserar C_q-värdena för ökända prover (se instrumentspecifikt datainsamling och analysguider för mer information).
- Kontrollprover kommer att ha ett positivt C_q-värde i FAM-, HEX-, TEX615-, och TYE665-kanaler. Om C_q-värdet är ≤ 26 för varje mål bör kontrollkörningarna betraktas som giltiga.
- Negativa kontroller ska inte ha ett C_q-värde.
- Om det uppstår ett fel under körningen av realtids-PCR-systemet är resultaten ogiltiga och analysen måste upprepas.
- Ökända prover kan tolkas som positiva om C_q-värdet är ≤ 26 cykler.
- C_q-värden på ökända prover kommer att variera beroende på den inledande DNA-koncentrationen. Om inget C_q-värde detekteras i FAM-, HEX- och TEX615-kanalerna för ökända prover, bekräfta att provet tillsattes i reaktionen genom att verifiera positiv amplifikation på den interna kontrollen (IC) i TYE665-kanalen, som kan detekteras i varje PCR-blandning som ingår i satsen. Om ingen amplifikation detekteras med det ökända prov som provet tolkas vara negativt för den målinriktade resistensmekanismen.
- Om amplifikationen på ett okänt prov i FAM-, HEX- och TEX615-kanalerna detekteras efter 26 cykler måste provet utredas ytterligare. Provet kan extraheras på nytt, PCR-körningen kan upprepas eller så kan den amplifierade produkten sekvenseras för verifiering.
- Om C_q-värdena för kontrollmålen eller ökända prover faller utanför angivet område, kontakta Streck's Tekniska Service för ytterligare hjälp på +1 402-691-7510 eller technicalservices@streck.com.

Anteckningar:

1. Som en riktlinje för detektering av mål- och instrumentspecifika C_q-värden för varje kontroll, se instrumentspecifika datainsamling och analysguider på streck.com. Dessa värden fastställdes under Streck's interna validering av analysen för varje angivet kontrollmål och realtids-PCR-system.
2. I denna IFU anger termen C_q (Kvantifieringscykel) antalet cykler där fluorescensen från amplifikationen överstiger bakgrundens fluorescens enligt rekommendationerna i MIQE:s riktlinjer. Dock, beroende på tillverkaren av realtids-PCR-system, hänvisar termen även till en tröskelcykel (ct) eller korsningspunkt (C_p).

BEGRÄNSNINGAR

1. Interna kontrollprimers (IC) har utformats för att amplifiera ett mycket konserverat genmål som finns i många gramnegativa bakterier. Dock kanske IC inte lyckas amplifiera från vissa gramnegativa arter eller -stammar. Därför bör man överväga detta i tolkningen av frånvaron av IC-produkten från ett specifikt prov.
2. Genens familjemål testats mot en stor mängd isolat. PCR-primers kommer endast att förstärka specifika målfamiljer och kommer inte att detektera andra betalaktamaser. Dock, med tanke på den genomiska mångfalden av bakterier, garanterar Streck inte att alla betalaktamasa gener kommer att detekteras i alla gramnegativa underarter. Resultat från det här testet bör användas i kombination med andra tillgängliga laboratorietester för korrekt tolkning.
3. Du kan använda Streck ARM-D Kit betalaktamas med alternativa realtids-PCR-system med 4 kanaler eller andra enzymer som inte listas i denna IFU, men en optimering kan komma att krävas. Kontakta Streck tekniska service för hjälp.

BESTÄLLNINGSPERIOD

Kontakta Customer Service-avdelningen på +1 402-333-1982 för assistans. Ytterligare information finns online på streck.com.

ORDLISTA ÖVER SYMBOLER

Se Instruktionsfiken (IFU) under Resurser på produktsidan på streck.com.

Instrumentens märkes- och produktnamn är varumärken som tillhör respektive innehavare.

Se streck.com/patents för information om patent som kan omfatta denna produkt.



Streck
7002 S. 109 Street, La Vista, NE 68128 USA



MEDIMARK® Europe
11, rue Emile Zola, BP 2332
38033 Grenoble Cedex 2, France

350672-2
2020-02