

INSTRUCTIONS FOR USE

INTENDED USE

The Streck ARM-D[®] Kit, MCR is a qualitative molecular test for the detection of MCR genes. Positive identification of the gene by this test indicates the presence of MCR resistance genes. The Streck ARM-D Kit, MCR generates data in under one hour. **This product is FOR EXPORT ONLY, not to be sold in the United States.**

INTRODUCTION

Mobilized Colistin Resistance (MCR) genes represent an increased global threat for untreatable infections. These are found on plasmids; hence the gene can spread horizontally to other bacteria species including carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). This resistance mechanism confers resistance to colistin, a last resort antibiotic for multidrug resistant infections. Molecular detection of this antibiotic resistance gene is essential for infection control and surveillance. The Streck ARM-D Kit, MCR will detect the following gene families: MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4, and MCR-5.

SUMMARY AND PRINCIPLES

Nucleic acid tests can identify specific resistance mechanisms associated with antibiotic resistance. As such, this information can be supplemented with susceptibility testing to support test results. Streck ARM-D Kit, MCR allows for identification of five MCR gene families: MCR-1, MCR-2, and MCR-(3 - 5). 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 family as well as fluorophore-labeled, target-specific DNA probes for detection by real-time PCR.

This product has been validated with the Applied Biosystems[™] (ABI) 7500 Fast Real-time PCR System.

CONTENTS

The kit includes one multiplex mix vial, containing all required primers and probes in TE buffer, pH 8.0 (10X PCR Mix), for simultaneous real-time PCR amplification of all targets. One control vial (Control Mix) containing synthetic DNA templates of the corresponding multiplex targets are also included in the kit to use as an external positive DNA control for the multiplex reaction. A premixed 2X Supermix vial containing buffer, dNTPs, MgCl₂, and DNA polymerase is also included in each kit. The kit contents are enough for 100 reactions, including 12 reactions of the control mix.

Primer/Probe Vials	Control Vials	Cap Color	Target Genes
10X PCR Mix	Control Mix	Red	MCR-1, MCR-2, MCR-(3-5), IC

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

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 www.streck.com, by calling 800-843-0912, or by calling your local supplier.

STORAGE AND STABILITY

- When stored at -20 °C, unused kit contents are stable through the expiration date.
- Streck ARM-D Kit reagents should not be subjected to more than 10 freeze-thaw cycles.

SAMPLE EXTRACTION

The Streck ARM-D Kit, MCR was validated with previously characterized DNA samples extracted from pure 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 enough 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 to 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 PCR run.

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, Control Mix, 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	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	1μl	Variable

PCR PROTOCOL

The following protocol has 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
Hot-start	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)

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 the ABI 7500 Fast Real-time PCR System are described in the Data Acquisition and Analysis Guide which can be found on www.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 (see Data Acquisition and Analysis Guide 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.

Master Mix	Target Gene	Fluorophore	Excitation λ _{max}	Emission λ _{em}
PCR Mix	MCR-1	FAM	495nm	520nm
	MCR-2	HEX	538nm	555nm
	MCR-(3-5)	TEX615	596nm	613nm
	IC	Cy5	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 Cq values for the DNA controls are not met, the results are considered invalid and samples must be re-evaluated. Cq 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, Cq values for MCR targets in unknown isolates can range from 10 to 26.

The Streck ARM-D Kit, MCR 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.

- Cq 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 prior to analyzing Cq values for unknown samples, (See instrument-specific Data Acquisition and Analysis Guide for more information).
- Control samples will have a positive Cq value in the FAM, HEX, TEX615, and Cy5 channels. If the Cq value is ≤ 26 for each target, control runs should be considered valid.
- Negative Template Controls should not have a Cq 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 Cq value is ≤ 26 cycles.
- Cq values of unknown samples will vary depending on the starting DNA concentration. If no Cq 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 Cy5 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 Cq values for control targets or unknown samples fall outside the indicated range, please contact Streck Technical Services for further assistance at 800-843-0912 or technicalservices@streck.com.

Notes:

- As a guideline for determining target- and instrument-specific Cq values for each control, please reference the instrument-specific Data Acquisition and Analysis Guides at www.streck.com. These values were determined during Streck's internal validation of the assay for each control target and real-time PCR system indicated.
- In this IFU, the term Cq (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 (Ct) or crossing point (Cp).

LIMITATIONS

- 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 for interpreting the absence of the IC product from a specific sample.
- The gene family targets have been tested against a considerable number of isolates with excellent sensitivity and specificity results. The PCR primers will only amplify the specified target families and will not detect other genes. Extensive testing has been done in DNA extracted from *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, and *Enterobacter* genera. However, given the genomic diversity of bacteria, Streck does not guarantee that all MCR 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.
- Using the Streck ARM-D Kit, MCR with alternative 4-channel real-time PCR platforms or other enzymes not listed in this IFU is possible, but optimization may be required. Contact Streck Technical Services for assistance.

REFERENCES

- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16(2): 161-168.
- Xavier BB, Lammens C, Ruhul R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S, 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium. *Euro Surveill.* 21(27): 30280.
- Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y, 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio.* 8(3): e00543-17.
- Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y, 2018. Towards understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 26(9): 794-808.

5. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poiriel L, Gros MF, 2017. MCR: modern colistin Resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 36(3): 415-420.

ORDERING INFORMATION

Please call our Customer Service Department at 800-228-6090 for assistance. Additional information can be found online at www.streck.com.

GLOSSARY OF SYMBOLS

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

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

See www.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

350733-1
2019-11

MODE D'EMPLOI USAGE PRÉVU

French (Français)

Le Streack ARM-D® Kit, MCR est un test moléculaire qualitatif destiné à détecter les gènes MCR. L'identification positive du gène par ce test indique la présence de gènes de résistance MCR. Le ARM-D® Kit, MCR 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

Les gènes de résistance à la colistine mobilisés ou MCR (de l'anglais Mobilized Colistin Resistance) représentent une menace mondiale accrue pour les infections incurables. Ceux-ci se trouvent sur les plasmides ; par conséquent, le gène peut se propager horizontalement à d'autres espèces de bactéries, y compris les *Enterobacteriaceae* résistantes aux carbapénèmes ou CRE (de l'anglais carbapenem-resistant Enterobacteriaceae). Ce mécanisme de résistance confère une résistance à la colistine, un antibiotique de dernier recours pour les infections multirésistantes. La détection moléculaire de ce gène de résistance aux antibiotiques est essentielle pour le contrôle et la surveillance des infections. Le Streack ARM-D® Kit, MCR détecte les familles de gènes suivantes : MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4 et MCR-5.

RÉSUMÉ ET PRINCIPES

Les tests d'acide nucléique peuvent identifier des mécanismes de résistance spécifiques associés à la résistance aux antibiotiques. À ce titre, ces informations peuvent être complétées par des tests de sensibilité pour corroborer les résultats des tests. Le Streack ARM-D® Kit, MCR permet d'identifier cinq familles de gènes MCR : MCR-1, MCR-2 et MCR-(3-5). 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 famille ainsi que des sondes d'ADN spécifiques de la cible et marquées par un fluorophore pour une détection par PCR en temps réel.

Ce produit a été validé à l'aide de l'Applied Biosystems™ (ABI) 7500 Fast Real-time PCR System.

CONTENU

Le kit inclut un flacon de mélange amorces-sondes multiplexe dans un tampon TE, pH 8 (10X PCR Mix) pour une amplification par PCR en temps réel simultanée de toutes les cibles. Un flacon de contrôle (Control Mix) contenant des ADN matrices synthétiques des cibles multiplexes correspondantes est aussi inclus dans le kit ; il sert de contrôle ADN externe positif pour la réaction multiplexe. Un flacon de 2X Supermix pré-mélangé contenant le tampon, du dNTP, du MgCl₂ et de la DNA polymérase est aussi inclus dans chaque kit. Le contenu du kit suffit pour 100 réactions, y compris 12 réactions de mélange de contrôle.

Flacons amorce/sonde	Flacons de contrôle	Couleur du bouchon	Gènes cibles
10X PCR Mix	Control Mix	Rouge	MCR-1, MCR-2, MCR-(3-5), 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 www.streck.com, en appelant le +1 402 333 1982 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.
- Les réactifs de Streack ARM-D Kit ne doivent pas être soumis à plus de 10 cycles de congélation/décongélation.

EXTRACTION DE L'ÉCHANTILLON

Le Streack ARM-D® Kit, MCR a été validé avec des échantillons d'ADN précédemment caractérisés, extraits d'une culture bactérienne pure à l'aide du QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue Kit. 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 (mode Pulse) 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 analyse PCR respective.

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, de Control Mix ou bien l'eau sans 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 µl	Sans objet
Streack ARM-D Kit	Supermix 2X	12,5 µl	1X
Streack ARM-D Kit	10X PCR Mix	2,5 µl	1X
Distribuer le Master Mix dans les puits ou tubes de PCR comme il se doit avant d'ajouter l'échantillon.			
Fourni par le laboratoire ou Streack ARM-D Kit	Matrice - inconnu ou NTC ou Matrice - Control Mix	1 µl	Variable

PROTOCOLE PCR

Le protocole suivant a été optimisé pour être utilisé 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
Démarrage à chaud	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)

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. Les instructions suivantes portent sur la configuration générale de l'instrument. Les paramètres spécifiques du ABI 7500 Fast Real-time PCR System sont décrits dans le Data Acquisition and Analysis Guide qui se trouve sur le site www.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 (voir le Data Acquisition and Analysis Guide 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.

Master Mix	Gène cible	Fluorophore	Excitation λ _{max}	Émission λ _{em}
PCR Mix	MCR-1	FAM	495 nm	520 nm
	MCR-2	HEX	538 nm	555 nm
	MCR-(3-5)	TEX615	596 nm	613 nm
	IC	Cy5	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 Cq 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 Cq 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 Cq des cibles pour MCR dans les isolats inconnus varient de 10 à 26.

Le Streack ARM-D® Kit, MCR 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 Cq 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 avant d'analyser les valeurs Cq des échantillons inconnus (voir le Data Acquisition and Analysis Guide spécifiques de l'instrument pour de plus amples renseignements).
- Les échantillons de contrôle auront une valeur Cq positive dans les canaux FAM, HEX, TEX615 et Cy5. Si la valeur Cq est ≤ 26 pour chaque cible, les analyses du contrôle doivent être considérées comme valides.
- Les contrôles de matrice négatifs ne doivent pas avoir de valeur Cq (Cycle de quantification).
- Si une analyse échoue sur le système PCR en temps réel, les résultats sont non valides et l'essai doit être répété.
- Les échantillons inconnus sont interprétés comme étant positifs si la valeur Cq est ≤ 26 cycles.
- Les valeurs Cq des échantillons inconnus dépendront de la concentration de départ en ADN. Si aucune valeur Cq 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 Cy5, qui peut être détectée dans le 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.
- 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.
- Si les valeurs Cq 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 :

- À titre d'aide pour déterminer les valeurs Cq cibles et spécifiques de l'instrument pour chaque contrôle, consulter les Data Acquisition and Analysis Guide spécifiques de l'instrument à www.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.
- Dans ce mode d'emploi, le terme Cq (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 (Ct) ou le point de croisement (Cp)

LIMITATIONS

- 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 pour comprendre l'absence du CI d'un échantillon spécifique.
- Les cibles des familles de gènes ont été testées en les comparant à un nombre considérable d'isolats et obtenu d'excellents résultats de sensibilité et de spécificité. Les amorces PCR n'amplifieront que les familles cibles spécifiées et ne détecteront aucun autre gène. De nombreux tests ont été réalisés sur de l'ADN extrait des genres *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* et *Enterobacter*. Mais étant donné la diversité génomique des bactéries, Streck ne garantit pas que tous les gènes MCR seront détectés dans toutes 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.
- Il est possible d'utiliser le Streack ARM-D® Kit, MCR 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 peut être nécessaire. Contacter les services techniques de Streck.

RÉFÉRENCES

- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological

- study. *Lancet Infect Dis.* 16(2): 161-168.
2. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S, 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium. *Euro Surveill.* 21(27): 30280.
 3. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y, 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio.* 8(3) e00543-17.
 4. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y, 2018. Towards understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 26(9): 794-808.
 5. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF, 2017. MCR: modern colistin Resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36(3): 415-420.

INFORMATIONS CONCERNANT LES COMMANDES

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

GLOSSAIRE DES SYMBOLES

Consultez l'onglet Instructions (IFU) dans le menu Ressources sur la page produits affichée sur le site www.streck.com.

Les noms de marque et de produit des instruments sont des marques de commerce de leur détenteur respectif. Consulter le site www.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

350733-1
2019-11

GBRAUCHSANWEISUNG VERWENDUNGSZWECK

German (Deutsch)

Das Streck ARM-D®-Kit, MCR ist ein qualitativer Molekulartest für die Erkennung von MCR-Genen. Eine positive Identifikation des Gens durch diesen Test zeigt die Präsenz von MCR-resistenten Genen an. Das ARM-D-Kit, MCR liefert Daten in weniger als einer Stunde. **Dieses Produkt ist NUR FÜR DEN EXPORT bestimmt und wird in den USA nicht zum Verkauf angeboten.**

EINFÜHRUNG

Mobilisierte Colistin-Resistenz (MCR)-Gene stellen eine gesteigerte globale Bedrohung von nicht behandelbaren Infektionen dar. Sie sind auf Plasmiden zu finden; daher können sich die Gene horizontal auf andere Bakterienarten verbreiten, darunter Carbapenem-resistente Enterobakterien (CRE). Dieser Resistenzmechanismus vermittelt eine Resistenz gegenüber Colistin, einem Reserveantibiotikum, das gegen multiresistente bakterielle Infektionen eingesetzt wird. Die molekulare Erkennung dieses antibiotikaresistenten Gens ist sehr wichtig für die Infektionsbekämpfung und -überwachung. Das Streck ARM-D Kit, MCR erkennt die folgenden Genfamilien: MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4 und MCR-5.

ZUSAMMENFASSUNG UND GRUNDLAGEN

Nukleinsäuretests können spezifische Resistenzmechanismen im Zusammenhang mit Antibiotikaresistenz identifizieren. Daher können diese Informationen durch Empfindlichkeitstests ergänzt werden, um unterstützende Informationen für Testergebnisse zu liefern. Das Streck ARM-D Kit, MCR ermöglicht die Identifizierung von fünf MCR-Genfamilien: MCR-1, MCR-2 und MCR-(3 - 5). 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. Der Test verwendet sequenzspezifische Primerpaare für die PCR-Amplifikation jeder Familie sowie fluorophormarkierte, zielspezifische DNA-Sonden zur Erkennung durch Echtzeit-PCR.

Dieses Produkt wurde mit dem Applied Biosystems™ (ABI) 7500 Fast Real-time PCR System validiert.

INHALT

Das Kit umfasst eine Multiplexmix-Ampulle mit allen erforderlichen Primern und Sonden in TE-Puffer, pH 8,0 (10X PCR Mix) für gleichzeitige Echtzeit-PCR-Amplifizierung aller Ziele. Eine externe DNA-Kontrollampulle (Control Mix) mit synthetischen DNA-Templates der zugehörigen Multiplex-Ziele sind ebenfalls im Kit enthalten, die zur externen positiven DNA-Kontrolle für die Multiplexreaktion eingesetzt wird. Ein vorgemischtes 2X-Supermix-Röhrchen mit Puffer, dNTPs, MgCl₂ und DNA-Polymerase ist ebenso in jedem Kit enthalten. Der Kitumfang ist ausreichend für insgesamt 100 Reaktionen, einschließlich 12 Reaktionen vom Control Mix.

Primer-/Sondenampullen	Kontrollampullen	Kappenfarbe	Zielgene
10X PCR-Mix	Control Mix	Rot	MCR-1, MCR-2, MCR-(3-5), IC

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die entsprechend den Laborrichtlinien festgelegten Sicherheitsvorschriften für biogefährdende Materialien sind einzuhalten.
- Immer DNase-/RNase-freie Kunststoffprodukte/Reagenzien und mit Aerosolbarrieren bestückte Pipettenspitzen verwenden.
- Material Sicherheitsdatenblätter sind unter www.streck.com, erhältlich oder können entweder telefonisch unter +1-402-333-1982 oder bei Ihrem örtlichen Lieferanten angefordert werden.

LAGERUNG UND STABILITÄT

- Bei einer Lagerung bei -20°C bleiben die nicht verwendeten Kit-Inhalte bis zum Verfallsdatum stabil.
- Die Reagenzien aus dem Streck ARM-D Kit sollten nicht mehr als 10 Mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

PROBENENTNAHME

Das Streck ARM-D Kit, MCR wurde durch zuvor charakterisierte DNA-Proben, die mithilfe des QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue Kit aus einer reinen Bakterienkultur extrahiert wurden, validiert. 1,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden gemäß Extraktionskit-Protokoll verwendet und ergaben DNA-Konzentrationen zwischen 10-200 ng/µl, mit 260/280-Verhältnissen, 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 den Inhalt im Vortex durchmischen und die Ampullen vor dem Öffnen stoßweise drehen. Einen Mastermix (ohne Template-DNA) entsprechend der Tabelle unten und auf Grundlage der Anzahl der zu bearbeitenden Proben (plus eine Extra-Reaktion) vorbereiten. Mindestens eine Control Mix-Reaktion und zwei Kontrollproben ohne Template (NTC) für jeweils jeden PCR-Lauf hinzufügen.

Durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren gut durchmischen. 24 µl des Mastermixes in den PCR-Behälter oder das Reaktionsgefäß aliquotieren. Geben Sie 1 µl der unbekannt Probe, der Control Mix ampulle oder des nukleasefreien Wassers (für NTC) zum Mastermix innerhalb des entsprechenden PCR-Behälters oder -Reaktionsgefäßes hinzu. Es wird empfohlen, zwei NTC-Proben durchlaufen zu lassen; eine bei der PCR-Anordnung, 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 µl Reaktion	Endgültige Konzentration
Labor-geliefert	Nukleasefreies Wasser	9,0 µl	NA
Streck ARM-D Kit	Supermix 2X	12,5 µl	1X
Streck ARM-D Kit	10X PCR-Mix	2,5 µl	1X
Verteilen Sie vor Hinzufügen der Probe den Master Mix entsprechend in PCR-Vertiefungen oder -Reaktionsgefäßen			
Labor-geliefert bzw. Streck ARM-D Kit	Template - unbekannt oder NTC bzw. Template - Control Mix	1 µl	Variabel

PCR-PROTOKOLL

Das folgende Protokoll 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
Heißstart	98°C 30 Sek lang
30 Zyklen von:	98°C 5 Sek lang 60°C 10 Sek lang 72°C 20 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 das ABI 7500 Fast Real-time PCR System spezifischen Parameter sind in der auf www.streck.com verfügbaren Data Acquisition and Analysis Guide 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 zur optimalen Datenauswertung eingestellt werden (siehe Data Acquisition and Analysis Guide für die instrumentenspezifischen Schwellenwert- und Basislinienseinstellungen).

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

Master Mix	Zielgen	Fluorophor	Exzitation λ_{max}	Emission λ_{em}
PCR-Mix	MCR-1	FAM	495 nm	520 nm
	MCR-2	HEX	538 nm	555 nm
	MCR-(3-5)	TEX615	596 nm	613 nm
	IC	Cy5	645 nm	665 nm

AUSWERTUNG DER DATEN

Allgemein: Jeder Echtzeit-PCR-Lauf muss mit den Control Mix ampullen, die im Kit mitgeliefert werden, validiert werden. Wenn die Vorgaben für die Cq-Werte nicht mit den DNA-Kontrollen übereinstimmen, dann werden die Ergebnisse als ungültig erachtet, und die Proben müssen neu evaluiert werden. Die Cq-Werte von unbekannt Proben werden, abhängig von der anfänglichen Anzahl von DNA-Kopien, variieren. Die Amplifikationskurven müssen für jede unbekannt Probe geprüft werden, um die Ergebnisse zu validieren. Die allgemeine Richtlinie besagt, dass Cq-Werte für MCR-Ziele in unbekannt Isolaten zwischen 10 und 26 liegen können.

Das Streck ARM-D Kit, MCR ist ein qualitativer Test. Um die Leistung des Kits zu validieren muss jede Echtzeit-PCR-Analyse mit den im Kit mitgelieferten Control Mix ampullen validiert und mithilfe von positiven und negativen Kontrollamplifizierungskurven evaluiert werden.

- Die Cq-Werte für positive Kontrollen können zwischen verschiedenen Echtzeit-PCR-Systemen variieren. Validieren Sie für eine optimale Assayleistung, dass die Schwellenwerte für jedes Ziel und/oder Fluorophor vor der Analyse der Cq-Werte für unbekannt Proben manuell eingestellt wurden (siehe Data Acquisition and Analysis Guide für weitere Informationen).
- Die Kontrollproben haben einen positiven Cq-Wert in den FAM-, HEX-, TEX615- und Cy5-Kanälen. Wenn der Cq-Wert für jedes Ziel ≤ 26 ist, dann sollten die Kontrollläufe für gültig befunden werden.
- Negative Template-Kontrollen sollten keinen Zählzyklus-Wert (Cq-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.
- Unbekannt Proben können als positiv interpretiert werden, wenn der Cq-Wert ≤ 26 Zyklen ist.
- Die Cq-Werte von unbekannt Proben werden abhängig von der anfänglichen DNA-Konzentration variieren. Wenn in den FAM-, HEX- und TEX615-Kanälen für unbekannt Proben kein Cq-Wert festgestellt wird, muss bestätigt werden, dass die Proben den Reaktionen hinzugefügt wurden, indem die positive Amplifikation der internen Kontrolle (IC) im Cy5-Kanal validiert 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.
- 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 Validierung sequenziert werden.
- Wenn die Cq-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:

- Als Richtlinie für die Bestimmung von ziel- und instrumentenspezifischen Cq-Werten für jede Kontrolle wird auf die instrumentenspezifischen Data Acquisition and Analysis Guides unter www.streck.com verwiesen. Diese Werte wurden während der internen Validierung des Assays durch Streck für jedes Kontrollziel und indizierte Echtzeit-PCR-System bestimmt.
- In dieser Gebrauchsanweisung bezieht sich der Begriff Cq (Zählzyklus) auf die Zyklennummer, 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

- Die Primer zur internen Kontrolle (IC) wurden dazu entwickelt, um ein hochkonserviertes Zielgen, das in vielen gramnegativen Bakterien vorkommt, zu amplifizieren. In bestimmten gramnegativen Arten oder Stämmen kann das Zielgen der IC möglicherweise nicht amplifiziert werden. Dies sollte bei der Interpretation des Fehlens des IC-Produkts in einer bestimmten Probe in Betracht gezogen werden.
- Die Genfamilienziele wurden auf eine beträchtliche Zahl von Isolaten mit hervorragenden Ergebnissen bezüglich Sensibilität und Spezifität getestet. Die PCR-Primer amplifizieren nur die angegebenen Zielfamilien und erkennen keine anderen Gene. Es wurden extensive Tests in DNA vorgenommen, die aus den Gattungen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* und *Enterobacter* entnommen wurden. Aufgrund der Genomvielfältigkeit der Bakterien kann Streck nicht garantieren, dass alle MCR-Gene in allen gramnegativen Unterspezies entdeckt werden. Zur akkuraten Interpretation sollten die Ergebnisse dieses Tests in Verbindung mit anderen verfügbaren Labortests verwendet werden.
- Die Verwendung des Streck ARM-D Kit, MCR mit alternativen 4-Kanal Echtzeit-PCR-Plattformen oder weiteren Enzymen, die nicht in dieser Gebrauchsanweisung aufgezählt werden, ist möglich, erfordert jedoch ggf. eine Optimierung. Wenden Sie sich an den Technischen Service von Streck, wenn Sie Unterstützung brauchen.

QUELLENANGABEN

1. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16(2): 161-168.
2. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S, 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium. *Euro Surveill.* 21(27): 30280.
3. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y, 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio.* 8(3) e00543-17.
4. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y, 2018. Towards understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 26(9): 794-808.
5. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF, 2017. MCR: modern colistin Resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36(3): 415-420.

BESTELLINFORMATIONEN

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

SYMBOLLISTE

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

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

Eventuell auf dieses Produkt zutreffende Patente finden Sie unter www.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

350733-1
2019-11

ISTRUZIONI PER L'USO USO PREVISTO

Italian (Italiano)

Il Streack ARM-D® Kit, MCR è un test molecolare qualitativo per l'individuazione dei geni produttori MCR. L'identificazione positiva del gene tramite questo test indica la presenza del gene resistente agli MCR. Il ARM-D Kit, MCR è in grado di generare dati in meno di un'ora. **Questo prodotto è SOLO PER L'ESPORTAZIONE, non per la vendita negli Stati Uniti.**

INTRODUZIONE

I geni di resistenza mobilizzata alla colistina (MCR) rappresentano un'aumentata minaccia globale per le infezioni non trattabili. Questi sono riscontrabili sui plasmidi; quindi il gene può diffondersi orizzontalmente ad altre specie di batteri tra cui Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE). Questo meccanismo di resistenza conferisce resistenza alla colistina, un antibiotico di ultima istanza per le infezioni resistenti a più farmaci. Il rilevamento molecolare di questo gene di resistenza agli antibiotici è essenziale per il controllo e la sorveglianza delle infezioni. Il Streack ARM-D Kit, MCR rileverà le seguenti famiglie geniche: MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4, e MCR-5.

RIEPILOGO E PRINCIPI

I test sull'acido nucleico possono identificare meccanismi di resistenza specifici associati alla resistenza agli antibiotici. Pertanto, queste informazioni possono essere integrate con test di sensibilità per supportare i risultati del test. Il Streack ARM-D Kit, MCR consente l'identificazione di cinque famiglie di geni MCR: MCR-1, MCR-2, e MCR-(3-5). 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 ogni famiglia, nonché sonde di DNA specifiche per il target, con marcatura fluoroforo per il rilevamento mediante PCR in tempo reale.

Questo prodotto è stato convalidato con il Applied Biosystems™ (ABI) 7500 Fast Real-time PCR System.

CONTENUTO

Il kit include una fiala di miscela multiplex, contenente tutti i primer e le sonde necessari nel tampone TE, pH 8,0 (10X PCR Mix), per l'amplificazione simultanea in tempo reale della PCR di tutti i target. Nel kit è inoltre inclusa una fiala di controllo di DNA esterne (Control Mix) contenenti templati sintetici di DNA dei target multiplex corrispondenti, da utilizzare come controllo positivo DNA per ogni reazione multiplex. Ogni kit comprende anche una fiala 2X Supermix premiscelata contenente soluzione tampone, dNTPs, MgCl₂ e DNA polimerasi. Il contenuto del kit è sufficiente per un totale di 100 reazioni, tra cui 12 reazioni di ogni miscela di controllo.

Fiale di primer/sonda	Fiale di controllo	Colore del tappo	Geni target
10X PCR Mix	Control Mix	Rosso	MCR-1, MCR-2, MCR-(3-5), 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 www.streck.com oppure richiesti telefonicamente al numero 402-333-1982 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.
- I reagenti Streack ARM-D Kit non devono essere sottoposti a più di 10 cicli di congelamento/scongellamento.

ESTRAZIONE DEI CAMPIONI

Il Streack ARM-D Kit, MCR è stato convalidato con campioni di DNA precedentemente caratterizzati estratti da coltura batterica pura utilizzando il 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

Scongelare 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.

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, Control Mix o acqua priva di nucleasi (per NTC) alla miscela master nel rispettivo pozzetto e 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
Streack ARM-D Kit	Supermix 2X	12,5μl	1X
Streack ARM-D Kit	10X PCR Mix	2,5μl	1X
Distribuire la Master Mix nei pozzetti o nelle provette per PCR come appropriato prima dell'aggiunta del campione			
Fornita dal laboratorio	Template - Non noto o NTC	1μl	Variabile
Streack ARM-D Kit	Template - Control Mix		

PROTOCOLLO PCR

Il seguente protocollo è stato ottimizzato 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.

Passaggio	Protocollo generale
Inizio a temperatura alta	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)

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 il ABI 7500 Fast Real-time PCR System sono descritti nelle Data Acquisition and Analysis Guide reperibili sul sito www.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 ciclizzazione termica.
- Quando è necessario, assegnare pozzetti di controllo e campioni.
- Per l'interpretazione dei dati, occorre impostare manualmente per ottenere prestazioni ottimali (vedere le Data Acquisition and Analysis Guide 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.

Master Mix	Gene target	Fluoroforo	Eccitazione λ _{max}	Emissione λ _{em}
PCR Mix	MCR-1	FAM	495nm	520nm
	MCR-2	HEX	538nm	555nm
	MCR-(3-5)	TEX615	596nm	613nm
	IC	Cy5	645nm	665nm

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 MCR negli isolati non noti possono variare da 10 a 26. Il Streack ARM-D Kit, MCR 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 prima dell'analisi dei valori di C_q per i campioni non noti, (per ulteriori informazioni vedere le Data Acquisition and Analysis Guide specifiche dello strumento).
- I campioni di controllo avranno un valore di C_q positivo nei canali FAM, HEX, TEX615 e Cy5. Se il valore di C_q è ≤ 26 per ogni target, il test di controllo deve essere considerato valido.
- I controlli negativi del modulo non devono avere un valore C_q (ciclo di quantificazione).
- 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 Cy5, 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 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 Data Acquisition and Analysis Guides specifiche dello strumento, reperibili sul sito www.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 con eccellenti risultati in termini di sensibilità e specificità. I primer per PCR amplificheranno unicamente le famiglie target specificate e non rileveranno altri geni. Un test esauriente è stato effettuato su DNA estratto dai generi *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* e *Enterobacter* genera. Tuttavia, data la diversità genomica dei batteri, Streck non garantisce l'individuazione di tutti i geni produttori MCR 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 Streack ARM-D Kit, MCR 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.

BIBLIOGRAFIA

1. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16(2): 161-168.
2. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S, 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium. *Euro Surveill.* 21(27): 30280.
3. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y, 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio.* 8(3) e00543-17.
4. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y, 2018. Towards understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 26(9): 794-808.
5. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF, 2017. MCR: modern colistin Resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36(3): 415-420.

INFORMAZIONI PER L'ORDINAZIONE

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

GLOSSARIO DEI SIMBOLI

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

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

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



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



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

350733-1
2019-11

INSTRUCCIONES DE USO

USO PREVISTO

El Streck ARM-D® Kit, MCR es una prueba molecular cualitativa para la detección de genes de MCR. La identificación positiva de los genes en esta prueba indica la presencia del gen de resistencia a la MCR. El ARM-D Kit, MCR genera datos en menos de una hora. **Este es un producto SOLO PARA EXPORTACIÓN, no se debe vender en los Estados Unidos.**

INTRODUCCIÓN

Los genes móviles de resistencia a la colistina (MCR) representan un incremento en la amenaza global de infecciones no tratables. Estos se encuentran en plásmidos; por consiguiente, los genes pueden transmitirse horizontalmente a otras especies de bacterias, entre ellas a las enterobacterias resistentes a carbapenemas (CRE). Este mecanismo de resistencia confiere resistencia a la colistina, un antibiótico de último recurso para infecciones resistentes a múltiples fármacos. La detección molecular de este gen de resistencia a antibióticos es esencial para el control y vigilancia de las infecciones. El Streck ARM-D Kit, MCR detecta las siguientes familias de genes: MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4 y MCR-5.

RESUMEN Y PRINCIPIOS

Las pruebas de ácidos nucleicos pueden identificar mecanismos específicos de resistencia asociados con la resistencia a antibióticos. Como tal, esta información puede ser complementada con pruebas de susceptibilidad para respaldar los resultados de las pruebas. El Streck ARM-D Kit, MCR permite identificar cinco familias de genes MCR: MCR-1, MCR-2 y MCR-(3 - 5). 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 PCR, degradación del ADN o extracción molecular deficiente. Esta prueba utiliza pares primers específicos de secuencia para la ampliación de PCR en cada familia, y sondas de ADN específicas para el objetivo y marcadas con fluoróforo para la detección a través del PCR en tiempo real.

Este producto ha sido validado con el Applied Biosystems™ (ABI) 7500 Fast Real-time PCR System.

CONTENIDO

El kit incluye un vial de mezcla múltiple que contiene todos los primers y sondas necesarios en amortiguador TE, pH 8,0 (10X PCR Mix) para amplificación simultánea de PCR en tiempo real de todos los objetivos. El kit también incluye un vial de control (Control Mix) que contiene plantillas de ADN sintético de los objetivos múltiples correspondientes para usar como control positivo externo de ADN para la reacción múltiple. Un vial 2X Supermix premezclado con amortiguador, dNTP, MgCl₂ y ADN polimerasa también se incluyen en cada kit. El contenido del kit es suficiente para un total de 100 reacciones, incluidas 12 reacciones de la Control Mix.

Viales primer/sonda	Viales para control	Color del tapón	Genes objetivo
10X PCR Mix	Control Mix	Rojo	MCR-1, MCR-2, MCR-(3-5), IC

*IC es el gen de control interno, 16S ARNr.

PRECAUCIONES

- Respete las precauciones establecidas con las muestras que puedan ser biológicamente peligrosas de acuerdo con las pautas del laboratorio.
- Utilice siempre recipientes plásticos/reactivos sin ADNasa/ARNasa y puntas de pipeta resistentes a los aerosoles.
- Para obtener hojas de datos de seguridad, vaya al sitio web www.streck.com, o llame al 402-333-1982 o al proveedor de su localidad.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- El contenido del kit sin usar se conserva estable hasta la fecha de vencimiento si se almacena a -20 °C.
- Los reactivos Streck ARM-D Kit no deben someterse a más de 10 ciclos de congelamiento/descongelamiento.

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

El Streck ARM-D Kit, MCR se validó con muestras de ADN previamente caracterizadas, extraídas de un cultivo bacteriano puro con el QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue Kit. 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 Control Mix y dos muestras de control sin plantilla (NTC) para cada ensayo de PCR.

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, Control Mix 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 25μl	Concentración final
Proporcionada por el laboratorio	Agua sin nucleasas	9,0μl	NA
Streck ARM-D Kit	Supermix 2X	12,5μl	1X
Streck ARM-D Kit	10X PCR Mix	2,5μl	1X
Distribuya la Master Mix en los recipientes o tubos de PCR según corresponda antes de agregar la muestra			
Proporcionada por el laboratorio	Plantilla: desconocida, NTC o	1μl	Variable
Streck ARM-D Kit	Plantilla: Control Mix		

Spanish (Español)

PROTOCOLO DE PCR

El siguiente protocolo se ha 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
Inicio en caliente	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)

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 del ABI 7500 Fast Real-time PCR System se describen en las Data Acquisition and Analysis Guide, que se pueden encontrar en www.streck.com.

- Introduzca las placas o los tubos en el sistema de PCR en tiempo real.
- Cree o seleccione un perfil térmico o protocolo de ciclos.
- Asigne recipientes de control y muestra cuando sea necesario.
- Para interpretar los datos, los umbrales deben configurarse de manera manual para un rendimiento óptimo (consulte la Data Acquisition and Analysis Guide para conocer la configuración del umbral y de la línea de 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.

Master Mix	Gen objetivo	Fluoróforo	Excitación λ _{max}	Emisión λ _{em}
Mezcla PCR	MCR-1	FAM	495 nm	520 nm
	MCR-2	HEX	538 nm	555 nm
	MCR-(3-5)	TEX615	596 nm	613 nm
	IC	Cy5	645 nm	665 nm

INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

General: Cada ensayo de PCR en tiempo real se debe validar con los viales para Control Mix proporcionados con el kit. Si no se respetan las especificaciones para los valores Cq en los controles de ADN, los resultados se consideran no válidos y las muestras deben volver a evaluarse. Los valores Cq 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 Cq para los objetivos de MCR en cultivos aislados desconocidos pueden oscilar entre 10 y 26. El Streck ARM-D Kit, MCR es una prueba cualitativa. Para comprobar el rendimiento del kit, cada ensayo de PCR en tiempo real se debe verificar con los viales para Control Mix que se entregan con el kit, y mediante la evaluación de las curvas de amplificación de control positivo y negativo.

- Los valores Cq 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 antes de analizar los valores Cq de muestras desconocidas. (Consulte las Data Acquisition and Analysis Guide específicas del instrumento para obtener más información).
- Las muestras de control ofrecerán un valor Cq positivo en los canales FAM, HEX, TEX615 y Cy5. Si el valor Cq es ≤ 26 en cada objetivo, los ensayos de control deben considerarse válidos.
- Los controles con plantilla negativos no deben tener un valor de ciclo de cuantificación (Cq).
- 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.
- Es posible que las muestras desconocidas se interpreten como positivas si el valor Cq es ≤ 26 ciclos.
- Los valores Cq de muestras desconocidas variarán en función de la concentración de ADN inicial. Si no se detecta ningún valor Cq 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 Cy5, que se puede detectar con la 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 Cq 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 402-691-7510 o escriba a technicalservices@streck.com.

Notas:

- Como pauta para determinar los valores Cq específicos del objetivo y del instrumento para cada control, consulte las Data Acquisition and Analysis Guides específicas del instrumento, disponibles en www.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 Cq (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 (Ct) o punto de cruce (Cp).

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 con excelente sensibilidad y resultados de especificidad. Los primers de PCR solo amplificarán las familias objetivo especificadas y no detectarán otros genes. Se han realizado pruebas exhaustivas en ADN extraído de géneros de Escherichia, Klebsiella, Salmonella y Enterobacter. Sin embargo, debido a la diversidad genómica de las bacterias, Streck no garantiza la detección de todos los genes de MCR 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.

3. Es posible utilizar el Streck ARM-D Kit, MCR con plataformas alternativas 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.

BIBLIOGRAFÍA

1. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16(2): 161-168.
2. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S, 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium. *Euro Surveill.* 21(27): 30280.
3. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y, 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio.* 8(3) e00543-17.
4. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y, 2018. Towards understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 26(9): 794-808.
5. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF, 2017. MCR: modern colistin Resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36(3): 415-420.

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

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

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

Pestaña de Instrucciones (IFU) bajo la sección Recursos en la página del producto en www.streck.com.

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

En www.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

350733-1
2019-11

BRUKSANVISNING

ANVÄNDNINGSGRÄDE

Streck ARM-D®, MCR är ett kvalitativt, molekylärt test för att detektera MCR-gener. Positiv identifikation av genen vid det här testet anger förekomsten av MCR-resistensgener. ARM-D Kit, MCR genererar data på mindre än en timme. **Produkten är ENBART avsedd FÖR EXPORT, ej för försäljning i USA.**

INLEDNING

Mobiliserad kolistinresistens (MCR)-gener representerar ett ökat globalt hot med obehandsbara infektioner. De förekommer på plasmider och genen kan därför sprida sig horisontellt till andra bakteriearter inklusive karbapenemresistenta Enterobacteriaceae (CRE). Denna resistensmekanism ger resistens mot kolistin, en antibiotika som används som en sista utväg mot multi-läkemedelsresistenta infektioner. Molekylär detektion av denna antibiotikaresistenta gen är ytterst viktigt för infektionskontroll och -övervakning. Streck ARM-D Kit, MCR detekterar följande genfamiljer: MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4 och MCR-5.

SAMMANFATTNING OCH PRINCIPER

Nukleinsyratestar kan identifiera specifika resistensmekanismer associerade med antibiotikaresistens. Den här informationen kan därför kompletteras med mottaglighetstestning för att understödja testresultaten. Streck ARM-D Kit, MCR möjliggör identifikation av fem MCR-genfamiljer: MCR-1, MCR-2 och MCR-(3-5). 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-amplifieringen av varje målgrupp samt DNA-sonder för detektion av realtids-PCR.

Den här produkten har godkänts med Applied Biosystems™ (ABI) 7500 Fast Real-time PCR System.

INNEHÅLL

Satsen består av en flaska med multiplexa primer-sondblandningar i TE-bufferten, pH 8,0 (10X PCR Mix) för samtlig PCR-amplifiering i realtid för alla mål. En kontrollflaska (Control Mix) som innehåller syntetiska DNA-templat för motsvarande multiplexmål ingår i satsen som ska användas som en extern positiv DNA-kontroll för varje multiplex reaktion. En förblandad 2X Supermix-flaska innehållande buffert, dNTPs, MgCl₂, och DNA-polymerase finns också med i varje sats. Satsens innehåll räcker till totalt 100 reaktioner, inklusive 12 reaktioner för Control Mix.

Primer/sondfaskor	Kontrollflaskor	Lockfärg	Målgener
10X PCR Mix	Control Mix	Röd	MCR-1, MCR-2, MCR-(3-5), 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 www.streck.com eller kan fås genom att ringa +1-402-333-1982 eller närmaste leverantör.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

- Vid förvaring i -20°C är oanvänt innehåll i setet stabila fram till förfallodatumet.
- Reagenserna i Streck ARM-D Kit får inte utsättas för mer än 10 cykler av nedfrysning och upptining.

PROVEXTRAKTION

Streck ARM-D Kit, MCR godkändes med tidigare karakteriserade DNA-prov som extraherades från ren bakteriekultur med QIAGEN® DNeasy® Blood and Tissue Kit. 1,5 ml av 5 ml övernatkultur användes i enlighet med extraktionsutrustningens protokoll vid framställningen av DNA-koncentrationer som sträcker sig från 10-200ng/μl, med förhållandet 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-cyklars PCR-analysen har inte testats för användning med kliniska prover vars mål finns i antalet låga DNA-kopior (t.ex. direkta ej odlade prover).

REAKTIONSFÖRBEREDELSE

Uptappingsreagenser, virvas kort för att blanda innehållet och flaskorna pulscentrifugeras 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 Control Mix och två prover för reagenskontroll utan templat (NTC, no-template-control) för respektive PCR-körning.

Blandningen kommer att pipetteras upp och ner flera gånger. Alikvoten 24μl på masterblandningen i varje realtids-PCR-brunn eller -rör. Tillsätt 1 μl av okänt prov, Control Mix 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 templet har tillsatts för att testa mot överföring under templetets distribution. Centrifugera PCR-platta eller rör före laddning i respektive instrument.

Källa	Komponent	25μl reaktion	Slutgiltig koncentration
Levererat lab	Nukleasfritt vatten	9,0μl	NA
Streck ARM-D Kit	Supermix 2X	12,5μl	1X
Streck ARM-D Kit	10X PCR Mix	2,5μl	1X
Distribuera Master Mix i PCR-brunnar eller -rör i förekommande fall innan provet tillsätts			
Levererat lab eller Streck ARM-D Kit	Templat - Okänt eller NTC eller Templat - Control Mix	1μl	Variabel

PCR PROTOKOLL

Följande protokoll har optimerats för användning med den medföljande Supermix 2X masterblandningen. Vissa instrument kan kräva längre förlängningstid för signalmottagning (detekteringssteg). Läs manualen till ditt instrument för mer information.

Steg	Allmänt protokoll
Varm start	98°C i 30 sek
30 cykler på:	98°C i 5 sek 60°C i 10 sek 72°C i 20 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 ABI 7500 Fast Real-time PCR System beskrivs i Data Acquisition and Analysis Guide som finns på www.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 (se Data Acquisition and Analysis Guide 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.

Master Mix	Målgen	Fluorofor	Excitation λ _{max}	Emission λ _{em}
PCR-blandning	MCR-1	FAM	495nm	520nm
	MCR-2	HEX	538nm	555nm
	MCR-(3-5)	TEX615	596nm	613nm
	IC	Cy5	645nm	665nm

DATATOLKNING

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

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

- Cq-värden för positiva kontroller kan variera mellan realtids-PCR-system. För optimal analysprestanda, verifiera att tröskelvärdena för varje mål och/eller fluorofor har ställts in manuellt för varje realtids-PCR-system innan du analyserar Cq-värdena för okända prover (se instrumentspecifika Data Acquisition and Analysis Guide för mer information).
- Kontrollprover kommer att ha ett positivt Cq-värde i FAM-, HEX-, TEX615-, och Cy5-kanaler. Om Cq-värdet är ≤ 26 för varje mål bör kontrollkörningarna betraktas som giltiga.
- Negativa mallkontroller får inte ha ett negativt värde för kvantifieringscykeln.
- Om det uppstår ett fel under körningen av realtids-PCR-systemet är resultatet ogiltiga och analysen måste upprepas.
- Okända prover kan tolkas som positiva om Cq-värdet är ≤ 26 cykler.
- Cq-värden på okända prover kommer att variera beroende på den inledande DNA-koncentrationen. Om inget Cq-värde detekteras i FAM-, HEX- och TEX615-kanalerna för okända prover, bekräfta att provet tillsattes i reaktionen genom att verifiera positivt amplifikation på den interna kontrollen (IC) i Cy5-kanalen, som kan detekteras i varje PCR-blandning som ingår i satsen.
- Om ingen amplifikation detekteras med det okända prov kan provet tolkas vara negativt för den målinriktade resistensmekanismen.
- Om amplifikation 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 värdena för kontrollmålen eller okända prover faller utanför angivet område, kontakta Streck's Tekniska Service för ytterligare hjälp på +1-402-333-1982 eller technicalservices@streck.com.

Anmärkningar:

- Som en riktlinje för detektering av mål- och instrumentspecifika Cq-värden för varje kontroll, se instrumentspecifika Data Acquisition and Analysis Guides på www.streck.com. Dessa värden fastställs under Streck's interna validering av analysen för varje angivet kontrollmål och realtids-PCR-system.
- I denna IFU anger termen Cq (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 (Cp).

BEGRÄNSNINGAR

- 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 för att tolka frånvaron av IC-produkten från ett specifikt prov.
- Genens familjemål har testats mot en stor mängd isolat med utmärkt känslighet och specificitetsresultat. PCR-primers kommer endast att amplifiera specifika målfamiljer och kommer inte att detektera andra gener. Omfattande tester har gjorts på DNA som har extraherats från släkten *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* och *Enterobacter*. Dock, med tanke på den genomiska mångfalden av bakterier, garanterar Streck inte att alla MCR-gener kommer att detekteras i alla gramnegativa underarter. Resultat från det här testet bör användas i kombination med andra tillgängliga laboratorietester för korrekt tolkning.
- Du kan använda Streck ARM-D Kit, MCR med alternativa realtids-PCR-plattformar 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.

REFERENSER

- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16(2): 161-168.
- Xavier BB, Lammens C, Ruhul R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S, 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium. *Euro Surveill.* 21(27): 30280.
- Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y, 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio.* 8(3): e00543-17.
- Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y, 2018. Towards understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 26(9): 794-808.
- Caniaux J, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF, 2017. MCR: modern colistin Resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36(3): 415-420.

BESTÄLLNINGSGRÄNSINFORMATION

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

ORDLISTA ÖVER SYMBOLER

Se Instruktionsfliken (IFU) under Resurser på produktsidan på www.streck.com.

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

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



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



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

350733-1
2019-11