

MAST ISOPLEX® CRE-ART

Nur zu Forschungszwecken und *in-vitro*-Diagnostik

DNA/LYO5 10 Tests.

Verwendungszweck

MAST ISOPLEX® CRE-ART ist ein *in-vitro* Diagnostik-Kit für den professionellen Gebrauch. Es basiert auf einer Loop-vermittelten isothermalen Amplifikationsreaktion (LAMP) zum qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Carbapenem-resistenten Enterobacterales (CRE) und anderen Carbapenem-resistenten Bakterien, die aus Übernachtskulturen von klinischen Proben isoliert wurden.

Testprinzip

MAST ISOPLEX® CRE-ART dient dem qualitativen Nachweis und der Differenzierung von OXA-48, OXA-23, OXA-24/OXA-40, KPC, VIM, NDM und IMP DNA. Der Assay umfasst einen Streifen mit acht Reaktionsgefäßen, wobei jedes einzelne Reaktionsgefäß zum Nachweis eines der spezifischen DNA-Targets ausgerichtet ist (sieben der acht Reaktionsgefäße). Im Kit ist DNA als Inhibitions-Kontrolle enthalten, die vor Beginn des Assays hinzugefügt wird. Die Inhibitions-Kontrolle wird in Reaktionsgefäß 8 des 8er-Streifens durchgeführt und dient zum Nachweis einer möglichen Inhibierung der DNA-Amplifikation in der Probe sowie zur Bestätigung der Integrität der Testreagenzien.

An der LAMP-Reaktion sind spezifische Primer für acht bestimmte Sequenzen der Target-DNA, eine DNA-Polymerase mit Strangverschiebungs-Aktivität (strand displacement activity), Substrate sowie ein interkalierender Fluorochromfarbstoff bei konstanter Temperatur beteiligt (63°C für MAST ISOPLEX® CRE-ART). Aufgrund der hohen Spezifität der LAMP-Reaktion kann das Vorhandensein von amplifiziertem Produkt innerhalb von 30 min das Vorhandensein von Target-DNA anzeigen.

Packungsinhalt

Tabelle 1: Kit-Inhalt

Kit-Bezeichnungen	Inhalt	Anzahl	Volumen	Deckelfarbe	Zusätzliche Verpackungsinformationen
IC DNA	DNA der Inhibitions-Kontrolle	1 Reaktionsgefäß	getrocknetes, farbloses Pellet	grün	In einem einzelnen wiederverschließbaren Beutel mit 2 Trockenmittelbeuteln enthalten
RB3	Rekonstitutions-Puffer	1 Reaktionsgefäß	1.5mL	orange	Reaktionsgefäß befindet sich in einem passenden Einsatz
WTR	Wasser (Molecular Grade)	1 Reaktionsgefäß	1.5mL	schwarz	Reaktionsgefäß befindet sich in einem passenden Einsatz
CRE STRIP	LAMP Reaktions-Pellet	10 x 8er-Streifen. Jedes Reaktionsgefäß ist einzeln nummeriert (1 bis 8)	weißes Pellet	farblos	CRE STRIP sind einzeln in wiederverschließbaren Beuteln mit 2 Trockenmittelbeuteln verpackt

Jede Nummer auf den Reaktionsgefäßen des CRE STRIP ist dem jeweils spezifisch nachzuweisendem Target zugeordnet, wie in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: Zuordnung der CRE STRIP-Reaktionsgefäße:

Reaktionsgefäßnummer	Target
1	OXA-48
2	OXA-23
3	OXA-24/OXA-40
4	KPC
5	VIM
6	NDM
7	IMP
8	Inhibitions-Kontrolle

Zusätzliche benötigte Materialien

1. Geeigneter Real-Time-Thermocycler oder Gerät, das zur isothermalen DNA-Amplifikation und zum Nachweis des amplifizierten Produkts mittels Fluoreszenz geeignet ist (siehe Tabelle 3 für Geräte, die zur Verwendung mit MAST ISOPLEX®CRE-ART geeignet sind).
2. Mikrobiologische Kulturmedien zur Isolierung von Einzelkolonien aus einer Patientenprobe (siehe Tabelle 3 für Kulturmedien zur Isolierung von Einzelkolonien aus einer Probe, die während der Entwicklung von MAST ISOPLEX®CRE-ART verwendet wurden).
3. Nuklease-freie 1,5mL-Reaktionsgefäße zur Resuspension isolierter Kolonien (siehe Testdurchführung).
4. Tischzentrifuge mit einem Rotor, der für 1,5mL-Reaktionsgefäße geeignet ist
5. Plattenzentrifuge oder Mikrofuge/Zentrifuge mit einem Einsatz für 8er-Streifen (4Ti-Reaktionsgefäße).
6. Standardmäßig DNase-freies Zubehör wie Reaktionsgefäße, Pipetten und Pipettenspitzen.
7. Einweg-Handschuhe (puderfrei).
8. Einstellbare kalibrierte Pipetten, die Volumina von 10µL bis 200µL dosieren können.
9. Nuklease-freie Zahnstocher oder Pipettenspitzen.
10. Eiskübel mit Eis oder Kühlblock.
11. Heizeinheit mit Heizblock passend für 1,5mL-Reaktionsgefäße zwecks Aufrechterhaltung der Temperatur bei 95°C für fünf Minuten.
12. Persönliche Schutzkleidung (Laborkittel, Handschuhe und Augenschutz (zur Probenvorbereitung)).
13. Abhängig vom verwendeten Amplifikationsgerät kann ein Einsatz für einen 8er-Streifen (für den CRE STRIP werden 4Ti-Reaktionsgefäße verwendet) erforderlich sein (siehe entsprechende Gebrauchsanweisung).

Tabelle 3: Real-Time-Thermocyclergeräte und mikrobiologische Kulturplatten

Hersteller Real-Time-Thermocyclergeräte	Modell
MAST - Qiagen	TS 2.4
Applied Biosystems	ABI 7500 FAST, ABI 7500
Lieferant mikrobiologischer Kulturplatten	Medium
E&O Laboratories Ltd	Columbia Agar, Mueller Hinton
Mast Diagnostica GmbH	CHROMagar™ KPC/CHROMagar™ ESBL, CHROMagar mSuperCARBA

Rekonstitution der Reagenzien

DNA der Inhibitions-Kontrolle (ICDNA) wie folgt resuspendieren:

1. Das Reaktionsgefäß kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich das lyophilisierte Pellet am Boden des Reaktionsgefäßs befindet.
2. Zum Lösen des Pellets 200µL Wasser (WTR) zufügen und 5 Minuten stehen lassen.
3. Den Inhalt durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.
4. Reaktionsgefäß bis zur Verwendung auf Eis oder Kühlblock stellen. Für eine längerfristige Lagerung das rekonstituierte Pellet aliquotieren (jeweils 10µL).

Die Isolierung von Bakterienkolonien aus klinischen Proben ist gemäß den Sicherheitsrichtlinien und Standardmethoden des Labors durchzuführen.



Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road,
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: + 44 (0) 151 472 1444
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
email: sales@mast-group.com
Web: www.mast-group.com



Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld
Germany
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mast-group.com



Lagerung und Haltbarkeit nach erstem Öffnen

1. MAST ISOPLEX® *CRE-ART* Kits werden bei Umgebungstemperatur verschickt.
2. Ungeöffnetes Kit bei 2°C bis 30°C lagern.
3. Reagenzien vor direktem Sonnenlicht schützen.
4. Reagenzien können bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Nach Ablauf des Verfallsdatums kann die Produktqualität nicht mehr garantiert werden.
5. Die resuspendierte DNA der Inhibitions-Kontrolle (ICDNA) kann bei Verwendung am selben Tag bei 2°C bis 8°C gelagert werden. Zur Langzeitlagerung nach Rekonstitution sollten alle Reagenzien aliquotiert (jeweils 10µL) und bei -20 °C gelagert werden, um mehrfaches Auftauen und Einfrieren zu verhindern.
6. RB3 und WTR werden nach dem Öffnen bis zum angegebenen Verfallsdatum bei 2°C bis 30°C gelagert.
7. Rekonstituierte CRE STRIPs während des Testansetzens bei 2°C bis 8°C lagern.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Das Kit ist nur von geschultem Laborpersonal zu verwenden.
2. Vor erstmaliger Verwendung ist die Unversehrtheit von Verpackung, Kennzeichnung und Reagenzieninhalt seitens des Anwenders sicherzustellen (Abweichungen sollten dem Hersteller gemeldet werden).
3. Das MAST ISOPLEX® *CRE-ART* Kit nicht nach Verfallsdatum verwenden.
4. Das Probenmaterial, das zur Isolierung der Kolonien verwendet wird, ist gemäß den örtlichen / nationalen Richtlinien als infektiöses und / oder biologisch gefährliches Material zu behandeln.
5. Es sollte geeignete Schutzkleidung getragen werden.
6. Es sollten entsprechende Vorkehrungen getroffen werden, um eine Kontamination (durch Nukleasen und mikrobielles Material) der MAST ISOPLEX® *CRE-ART* - Reagenzien und des zu testenden Probenmaterials zu verhindern.
7. Nuklease-freie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Zahnstocher verwenden.
8. Reaktionsgefäße sind nach Zugabe von Reagenzien stets geschlossen zu halten und nach Gebrauch gemäß den örtlichen Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien verschlossen zu entsorgen.
9. Niemals ein Reaktionsgefäß nach der Amplifikation öffnen, um jegliche Kontamination mit dem amplifizierten Produkt zu vermeiden.
10. Reaktionsgefäße nicht vortexen, da dies zu Scherspannungen führen kann, welche das Enzym schädigen sowie zur Blasenbildung führen können. Letztere kann zur Störung der Fluoreszenzdetektion führen.
11. Es sollte sichergestellt sein, dass Reaktionsgefäße vor dem Gebrauch keine Kratzer und Risse aufweisen.
12. Es sollten definierte Arbeitsbereiche (mit der jeweils erforderlichen Ausstattung) vorhanden sein, um die Schritte a) Kolonieisolierung/Probenhandhabung; b) Testdurchführung und c) Real-Time-Amplifikation und -Detektion von-einander zu trennen.
13. Sicherstellen, dass die Reaktionsgefäße nach Inkubation für 5 Minuten bei 95°C auf Eis (oder im Eisblock) gelagert werden, um eine Inaktivierung der CRE STRIP-Komponenten nach Zugabe des Inhalts des Reaktionsgefäßes zu verhindern.
14. Sicherstellen, dass die Reaktionsgefäße mit der Probe, RB3 und ICDNA vor der Inkubation bei 95°C fest verschlossen sind.
15. Beim Betrieb von Heizgeräten Vorkehrungen gemäß örtlichen und/oder nationalen Sicherheitsvorschriften einhalten.
16. Sicherstellen, dass alle Geräte gemäß den Herstellerrichtlinien vollständig installiert, kalibriert und gewartet sind.

Entnahme, Handhabung und Lagerung der Primärprobe

Als Primärprobe für den MAST ISOPLEX®*CRE-ART* dient eine isolierte Bakterienkolonie, die aus einer klinischen Probe nach Übernachtkultur kultiviert wurde.

Testdurchführung

1. 90µL RB3-Puffer in ein 1,5mL-Reaktionsgefäß pipettieren.
2. Mit Hilfe eines Zahnstochers oder einer Pipettenspitze die Oberfläche einer isolierten Kolonie von einer Kulturplatte (Übernachtkultur) abnehmen, in das 1,5ml-Reaktionsgefäß (Schritt 1) eintauchen und vorsichtig mischen (~0,2 McFarland/10⁸cfu/mL).
3. 10µL rekonstituierte ICDNA zu dem Reaktionsansatz geben. Durch mindestens fünfmaliges Auf- und Abpipettieren vorsichtig mischen.
4. Sicherstellen, dass das Reaktionsgefäß geschlossen ist. Für 5 Minuten bei 95°C inkubieren.
5. Nach dem Erhitzen sofort das Reaktionsgefäß entfernen und für 5 Minuten auf Eis oder in einen Kühlblock legen.
6. Nach dem Abkühlen das Reaktionsgemisch kurz in einer Zentrifuge für ~ 5 Sekunden bei ~6000 U/min zentrifugieren.
7. 10µL des Reaktionsansatzes in jedes Reaktionsgefäß des CRE STRIP geben.
8. CRE STRIP in einer Plattenzentrifuge 5 Sekunden lang bei ~2500 U/min zentrifugieren.

9. CRE STRIP zur isothermalen Amplifikation in das Instrument stellen (ggf. darauf achten, dass der entsprechende Einsatz für den 8er-Streifen verwendet wird).
10. Das Instrument für die LAMP-Reaktion programmieren:
Hinweise zur Inbetriebnahme und Programmierung des Gerätes dem entsprechenden Gerätehandbuch entnehmen.
 - a. Testparameter einstellen (abhängig von verwendetem Instrument).

Tabelle 4: Testparameter

Instrument	Parameter			
ABI 7500 FAST ABI 7500	Temperatur: 63°C	Testdauer: 30 Minuten	Cycle- Laufzeit: 1 Minute	Hintergrund Referenz: Keine
TS2.4	Protokoll CreArt_Eng_3 auswählen			

Hinweis für nicht aufgeführte Instrumente: Der Anwender sollte die Temperatur und die Testzeit für ABI7500/FAST einhalten.

- b. FAM Detektionskanal auswählen.

Kontrollverfahren

Das MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit (jede Charge) wird anhand definierter Spezifikationen überprüft, um die Einheitlichkeit der Produktqualität gemäß den Anforderungen der Mast Group Limited EN ISO13485:2016 "Medizinprodukte - Qualitätsmanagementsysteme - Anforderungen für regulatorische Zwecke" und der IVDD 98/79/EC "In-vitro-Diagnostika" sicherzustellen.

Das CRE STRIP-Reaktionsgefäß 8 dient als Qualitätskontrollindikator für jeden durchgeführten CRE STRIP, da dieser Assay immer ein positives Ergebnis liefern sollte. Der Assay zielt auf die ICDNA ab, die der Probe vor der Hitzebehandlung zugesetzt wird. Ein positives Ergebnis in Reaktionsgefäß 8 zeigt an, dass die DNA durch die Hitzebehandlung nicht denaturiert wurde, die CRE STRIP-Komponenten wie erwartet funktionieren und ICDNA der Probe vor der Hitzebehandlung hinzugefügt wurde. Ein negatives Ergebnis im CRE STRIP-Reaktionsgefäß 8 zeigt an, dass während der Hitzebehandlung ein DNA-Abbau erfolgt ist, die Probe nicht mit ICDNA versetzt wurde oder die CRE STRIP-Reagenzien nicht ordnungsgemäß funktionieren. Im Falle eines negativen Ergebnisses sollte sichergestellt werden, dass das Instrument richtig eingestellt ist, das Testverfahren korrekt durchgeführt wird und die Reagenzien vor der Wiederholung des Tests das Verfallsdatum nicht überschritten haben.

Um Kontaminationen während der Testdurchführung zu überprüfen, kann ein Assay in Abwesenheit von ICDNA oder Probe durchgeführt werden. Das Volumen der ICDNA oder Probe durch WTR ersetzen, das im MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit enthalten ist. Alle Röhren sollten ein negatives Ergebnis liefern. Ein positives Ergebnis zeigt das Vorhandensein unspezifischer DNA an. Sicherstellen, dass alle Geräte und Arbeitsbereiche vor Testwiederholung frei von Verunreinigungen sind. Bei erneutem Auftreten dieses Ergebnisses, bitte den technischen Support von Mast Group Limited kontaktieren.

Um die Funktionsfähigkeit des CRE STRIP zu überprüfen, kann eine positive Kontroll-DNA, die jeweils spezifisch für das jeweilige Target des CRE-STRIP Reaktionsgefäßes ist, anstelle der Testprobe verwendet werden. Ein positives Ergebnis sollte in jedem Reaktionsgefäß nachgewiesen werden, dem eine positive Kontrolle hinzugefügt wurde. Wenn ein negatives Ergebnis zu sehen ist, deutet dies auf eine Hemmung des LAMP-Tests hin oder darauf, dass die positive Kontroll-DNA nicht hinzugefügt wurde. Den Assay wiederholen. Für weitere Informationen bezüglich der Positivkontrollen den technischen Support von Mast Group Limited kontaktieren.

Tabelle 5: Interpretation der Kontrollen

	CRE STRIP (Reaktionsgefäßnummer)								Ergebnis-Interpretation	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Kontrollprobe										
Kontrolle ohne Template (nur ICDNA zugegeben)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Gültiges Ergebnis:
Kontrolle ohne Template (nur ICDNA zugegeben)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ungültiges Ergebnis. Test wiederholen und sicherstellen, dass die gesamte Ausrüstung frei von DNA ist.
Positive Kontroll-DNA +ICDNA	- In irgendeinem Reaktionsgefäß (Reaktionsgefäß 1 bis 7)								+	Ungültiges Ergebnis: Test wiederholen und sicherstellen, dass Kontroll-DNA zugegeben wurde.

+ kennzeichnet eine positive Amplifikation und Ct < 30; - kennzeichnet eine negative Amplifikation und keinen CT-Wert.

Interpretation der Ergebnisse

Die Analyse der einzelnen Tests wird von der Gerätesoftware durchgeführt. Ein positives Ergebnis wird generell durch einen deutlichen Unterschied in der Intensitätsausgabe zu einem bestimmten Zeitpunkt im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Template (No-Template-Kontrolle) angezeigt. Damit ein Ergebnis gültig ist, muss ein positives Ergebnis in Reaktionsgefäß 8 (ICDNA) vorliegen. Wenn das CRE STRIP Reaktionsgefäß 8 ein negatives Ergebnis liefert, kann der Test in Gegenwart von ICDNA wiederholt werden.

Tabelle 6: MAST ISOPLEX® CRE-ART Interpretation der Ergebnisse

CRE STRIP (Reaktionsgefäßnummer)								Ergebnis-Interpretation
1	2	3	4	5	6	7	8	
+	-	-	-	-	-	-	+	Gültiges Ergebnis: Positiv für OXA-48
-	+	-	-	-	-	-	+	Gültiges Ergebnis: Positiv für OXA-23
-	-	+	-	-	-	-	+	Gültiges Ergebnis: Positiv für OXA-24/OXA40
-	-	-	+	-	-	-	+	Gültiges Ergebnis: Positiv für KPC
-	-	-	-	+	-	-	+	Gültiges Ergebnis: Positiv für VIM
-	-	-	-	-	+	-	+	Gültiges Ergebnis: Positiv für NDM
-	-	-	-	-	-	+	+	Gültiges Ergebnis: Positiv für IMP
-	-	-	-	-	-	-	+	Gültiges Ergebnis: Negative Probe (keine Target-DNA in der Probe)
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	Ungültiges Ergebnis. Test wiederholen und sicherstellen, dass ICDNA dem Testansatz vor dem Proben-Erhitzen zugegeben wurde.
+ in mehr als einem Reaktionsgefäß (Reaktionsgefäß 1-7)							+	Gültiges Ergebnis: Positiv für mehr als eine Target-DNA

+ kennzeichnet eine positive Amplifikation und Ct < 30; - kennzeichnet eine negative Amplifikation und keinen CT-Wert.

Im Falle eines fraglichen Ergebnisses wird empfohlen, die Probe erneut zu testen (in Doppelbestimmung, um das Ergebnis zu bestätigen), oder die Ergebnisse sollten mit einer alternativen Methode bestätigt werden.

Ein positives Amplifikationsergebnis wird durch einen schnellen Anstieg der Fluoreszenzintensität in einem relativ kurzen Zeitraum und innerhalb der 30-minütigen Testzeit angezeigt, während ein negatives Ergebnis keinen schnellen Anstieg der Fluoreszenzintensität im gleichen Zeitraum zeigt (siehe auch Abbildung 1 bis 2).

Abbildung 1: Typischer Amplifikations-Plot des TS2.4 *Klebsiella pneumoniae* mit OXA48 getestet mit MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit.

Hinweis: 1 Zeitintervall ist äquivalent mit 0,5 Minuten, Amplifikations-Plot wurde über 30 Minuten Testzeit erstellt.

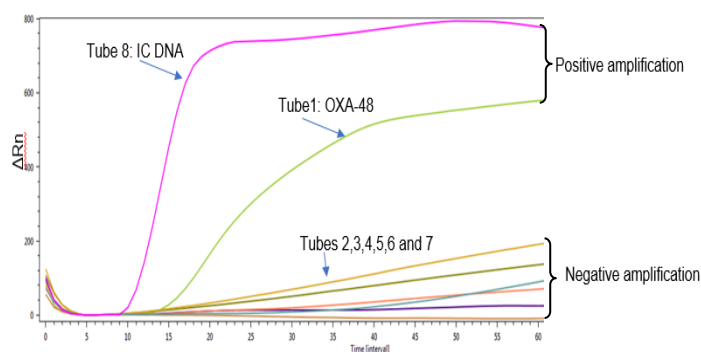
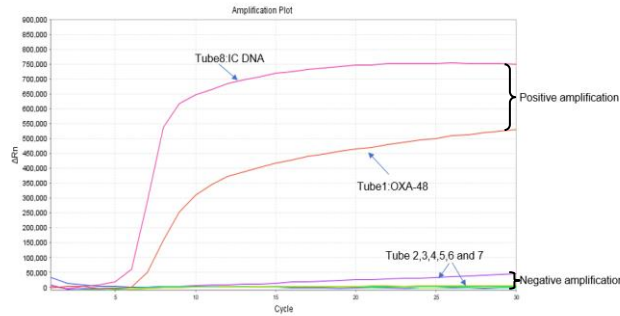


Abbildung 2: Typischer Amplifikations-Plot des ABI 7500 FAST *Klebsiella pneumoniae* mit OXA48 getestet mit MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit.



Leistungsmerkmale

Rückverfolgbarkeit, Kalibrierung und Kontrollmaterialien

Die Kalibrierung, Wartung und Instandhaltung der für das MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit verwendeten Geräte erfolgt in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Richtlinien. Die Qualitätskontrolle aller Komponenten wird nach lokalen und nationalen Richtlinien geprüft und validiert.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des MAST ISOPLEX® CRE-ART wurde mit Hilfe des Plasmids pEX-A218 mit eingefügter Target-Sequenz bestimmt. Es wurden Tests mit 10-fachen seriellen Verdünnungen der Plasmid-DNA im Bereich von 10pg bis 0,001fg durchgeführt. Insgesamt wurden 8 Replikate für jedes Plasmid in jedem Konzentrationsbereich durchgeführt und die Daten mittels Probit-Analyse analysiert.

Tabelle 7: Analytische Sensitivität (basierend auf spezifischen, Plasmid-kodierten Target-Sequenzen)

Target-Gen	Probit value Femtogramm/μL (95% Konfidenz-Intervall)	Probit value DNA Kopienanzahl /μL (95% Konfidenz-Intervall)
OXA-48	0,13fg/μL (0,07 to 0,75)	44 copies/μL (22,5 to 244,2)
OXA-23	0,28 fg/μL (0,15 to 1,19)	92 copies/μL (49,7 to 386,7)
OXA-24/OXA-40	2,1 fg/μL (1,05 to 2,02)	683 copies/μL (344 to 6576)
KPC	0,1 fg/μL (0,05 to 0,58)	35 copies/μL (17,4 to 187,4)
VIM	0,1 fg/μL (0,05 to 0,62)	35 copies/μL (16,6 to 195,7)
NDM	0,2 fg/μL (0,08 to 1,36)	53 copies/μL (27,6 to 442,7)
IMP	2,7 fg/μL (1,12 to 27,8)	879 copies/μL (364,8 to 9035,3)

Tabelle 8: Analytische Sensitivität (basierend auf Carbapenemase-produzierenden Bakterien-Stämmen)

Stamm	ACTC/ATCC Code	Target Genfamilie	Probit value cfu/μL (95% Konfidenz-Intervall)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13422	OXA-48	4 cfu/μL (2,7 to 10,9)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NCTC 13424	OXA-23	57 cfu/μL (16,71 to 925)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NCTC 13302	OXA-24/OXA-40	43 cfu/μL (18,4 to 1043,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC	12 cfu/μL (7,0 to 53,2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM	12 cfu/μL (5.5 to 72.6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2472	NDM	15 cfu/μL (9,8 to 140,3)
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP	5 cfu/μL (2,7 to 25,5)

Analytische Spezifität

MAST ISOPLEX®CRE-ART weist eine analytische Spezifität von 100 % auf bei Testung mit Target-spezifischem Plasmid, welches für die analytische Sensitivitätstestung verwendet wird. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten mit den in Tabelle 9. (Kreuzreaktivitätstest) gelisteten Spezies (mit bekannter β-Lactamase) festgestellt.

Tabelle 9: Kreuzreaktivitätstests

Species	Bekannte β-lactamase	Species	Bekannte β-lactamase
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DHA-1, SVH-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DHA-1, SHV
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DHA-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DHA-1, CTX-M
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fox-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SVH-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fox
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M	<i>Escherichia coli</i>	Lat-3
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M 1	<i>Escherichia coli</i>	TEM 2, CTX-M 9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM-29, SHV 14	<i>Salmonella livingstone</i>	acc-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	dha-1	<i>Escherichia coli</i>	lat-4
<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M9	<i>Enterobacter cloacae</i>	SHV 12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M9, SHV-36	Salmonella species	SHV 12
<i>Escherichia coli</i>	TEM 10	<i>Escherichia coli</i>	TEM 9
<i>Escherichia coli</i>	TEM 4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV 2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV 3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV 2 SHV 5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	K1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV 18
<i>Proteus mirabilis</i>	CMY	<i>Proteus mirabilis</i>	ACC-1
<i>Proteus mirabilis</i>	CMY-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imi-R keine Carbapenemase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10662	Keine Carbapenemase	<i>Acinetobacter baumannii</i>	keine Carbapenemase
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M3	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M 23
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV 12	<i>Escherichia coli</i>	TEM III
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M 33	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M 15
<i>Proteus mirabilis</i>	CTX-M1		



Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road,
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: + 44 (0) 151 472 1444
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
email: sales@mast-group.com
Web: www.mast-group.com



Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld
Germany
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mast-group.com



Präzision

Die Genauigkeit des MAST ISOPLEX® *CRE-ART* Kits wurde in Bezug auf die Wiederholbarkeit (Intra-Batch-Variation unter Verwendung eines einzelnen Batches und sechs Tests an einem einzelnen Tag, siehe Tabelle 10a und 10b) und die Reproduzierbarkeit (Interbatch-Variation - drei getestete Batches, siehe zu Tabelle 11a und 11b).

Da LAMP kein quantitativer Test ist, stellt das Messen der Präzision (hinsichtlich der Zeit bis zur Positivität, CT-Wert) kein absolutes Maß für die Testleistung dar. Die Weiderholbarkeit weist eine Standardabweichung zwischen 0,35 bis 1,94 für die verschiedenen Targets auf mit Variationskoeffizienten im Bereich von 2,29 bis 12,31 (% CV). Die Intra-Lot Reproduzierbarkeit weist eine Standardabweichung zwischen 0,21 bis 3,02 auf mit Variationskoeffizienten im Bereich von 2,1 bis 17,96 (% CV). Ein %CV-Wert <10 gilt als sehr gut, 10-20 als gut, 20-30 als akzeptabel und >30 als nicht akzeptabel; daher sind die erhaltenen Werte gut.

Table 10a: Wiederholbarkeit des MAST ISOPLEX® *CRE ART Kits* für spezifische Targets

Target	Ct Wert (Mittelwert)	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%CV)
OXA-48	15.13	1.12	7.67
OXA-23	15.18	1.87	12.31
OXA-24/OXA-40	19.21	1.94	10.07
KPC	15.34	0.35	2.29
VIM	12.10	1.08	8.88
NDM	10.66	0.47	4.43
IMP	14.23	1.27	8.91

Tabelle 10b: Wiederholbarkeit der Inhibitions-Kontrolle (ICDNA)

Target	Ct Wert (Mittelwert)	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%CV)
ICDNA	11.59	1.35	11.61

Tabelle 11a: Intra-Lot Reproduzierbarkeit des MAST ISOPLEX® *CRE ART Kits*

Target	Ct Wert (Mittelwert)	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%CV)
OXA-48	13.2	1.17	8.86
OXA-23	12.99	1.05	8.03
OXA-24/OXA-40	17.98	3.02	17.96
KPC	14.52	0.57	3.92
VIM	10.34	1.44	13.93
NDM	9.99	0.21	2.1
IMP	13.03	0.58	4.43

Tabelle 11b Intra-Lot Reproduzierbarkeit des MAST ISOPLEX® *CRE ART Kits* für die Inhibitions-Kontrolle (ICDNA)

Target	Ct Wert (Mittelwert)	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%CV)
ICDNA	10.63	0.27	2.52

Diagnostische Leistungsmerkmale

Die diagnostischen Leistungsmerkmale des MAST ISOPLEX® *CRE-ART* Kits (siehe Tabelle 12a und 12b) wurden an 248 klinischen Isolaten bestimmt, die Enterobacterales (n=203), *Acinetobacter* species (n=37) und *Pseudomonas aeruginosa* (n=8) umfassen. Isolate, die Carbapenemase enthalten, auf die der Assay nicht abzielt und die nicht nachgewiesen wurden, werden als echte Negative eingestuft. Die Arbeiten wurden von der Abteilung für Mikrobiologie, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, durchgeführt.

Tabelle 12a: Nachweis von Carbapenemasen in 248 Gram-negativen Bakterien mit dem MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit

Isolat/ Target	Anzahl getestet	Anzahl nachgewiesen mit MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit
Carbapenemase-produzierende Enterobacterales		
KPC	16	16
VIM	13	13
IMP	12	12
OXA-48 like	61	61
NDM	52	52
NCM-A	1	0
Carbapenemase-produzierende <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
VIM	2	2
NDM	2	2
Carbapenemase-produzierende <i>Acinetobacter</i> Species		
OXA-23-like	23	23
OXA-24-like/ OXA-40-like	2	2
NDM	3	3
OXA-51-like	12	0
OXA-58-like	5	0
OXA-69-like	1	0
Isolate ohne Carbapenemase	53	2

Hinweis: Das MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit erfasst nicht NCM-A, OXA-51-like, OXA-58-like oder OXA-69-like DNA. Die Testergebnisse werden als richtig negative Ergebnisse bewertet.

Die aus den oberen Daten ermittelten diagnostischen Leistungsmerkmale des MAST ISOPLEX® CRE-ART Kits sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12b: Diagnostische Leistungsmerkmale des MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit

Diagnostische Eigenschaft	
Sensitivität	100%
Spezifität	97%
Positiver prädiktiver Wert	99%
Negativer prädiktiver Wert	100%

Messbereich

MAST ISOPLEX® CRE-ART ist ein qualitativer Test. Allerdings wurde zur Bestimmung der analytischen Sensitivität ein Bereich von spezifischer Target-DNA im Bereich von 100fg bis 1pg pro Reaktion getestet.

Biologisches Referenzintervall

MAST ISOPLEX® CRE-ART ist ein qualitativer und kein quantitativer Test, daher sind biologische Referenzintervalle nicht relevant.

Limitierungen des Untersuchungsverfahrens

- Die Ergebnisse, die mit Hilfe des MAST ISOPLEX® CRE-ART ermittelt werden, sollten in Verbindung mit anderen klinischen Faktoren und nicht alleine für die Diagnose eines klinischen Zustandes verwendet werden.
- Das MAST ISOPLEX® CRE-ART Kit ist validiert für die Testung isolierter Bakterienkolonien, welche aus klinischen Proben kultiviert werden.



Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road,
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: + 44 (0) 151 472 1444
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
email: sales@mast-group.com
Web: www.mast-group.com



Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld
Germany
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mast-group.com



- Die zu inokulierende Bakterienmenge (siehe Schritt 2 in Testdurchführung) sollte äquivalent mit 0,2 McFarland oder 10⁸ cfu/mL sein.
- Das MAST ISOPLEX[®] CRE-ART Kit wurde mit den in diesem Dokument gelisteten Geräten und mikrobiologischen Medien validiert. Die Verwendung anderer Geräte oder mikrobiologischer Nährmedien muss vom Anwender vor dem diagnostischen Gebrauch validiert werden.
- Die Anwesenheit von DNase oder Protease kann ungültige Ergebnisse verursachen. Der Benutzer muss sicherstellen, dass die gesamte Ausrüstung und Zubehör DNase frei sind.
- Sehr hohe Mengen an Target DNA können einen hohen Hintergrund und somit ein falsch negatives Ergebnis verursachen, wenn der maximale Grenzwert des Geräts für Amplifikationsreaktion überschritten wird. Die Einhaltung der Gebrauchsanleitung, insbesondere das Picken einer kleinen Menge von der Kolonie, sollte ein solches Ereignis verhindern.
- Mittels LAMP-Amplifikation kann ein positives Ergebnis aus einer sehr niedrigen Menge an Target-DNA erzielt werden, wobei dieses jedoch unterhalb des Detektionslimits nicht reduzierbar sein muss.
- Das MAST ISOPLEX[®] CRE-ART Kit ist darauf ausgerichtet spezifisch bestimmte β -Lactamase Klassen und Untergruppe zu amplifizieren. Der Test amplifiziert und identifiziert die in Table 13 genannten Klassen/Untergruppen.

Tabelle 13: Target-Familie und Familienmitglieder identifiziert durch MAST ISOPLEX[®] CRE-ART

Target	
Familie	Familienmitglieder
OXA-48	48, 162, 163, 181, 199, 204, 232, 244, 245, 247, 252, 370, 405, 416, 438, 439, 484, 505, 514, 515, 517, 519, 538, 546, 547, 566, 567, 731, 788, 793, 833
OXA-23	23, 27, 49, 73, 103, 133, 146, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 225, 239, 366, 398, 422, 423, 435, 440, 482, 483, 565, 657, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818
OXA-24/OXA-40	24, 25, 26, 40, 72, 139, 160, 207, 437, 653
KPC	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46,
VIM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68
NDM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28
IMP	1, 3, 4, 6, 10, 25, 26, 30, 34, 38, 40, 42, 52, 55, 61, 60

- MAST ISOPLEX[®] CRE-ART kann nicht OXA-535, OXA-436, OXA-54, VIM-7, VIM 61, NDM-25 und NDM-26 amplifizieren.
- Der Anwender muss sich immer auf den Amplifikations-Plot (Rohdaten) der Messung beziehen, um sicherzustellen, dass ein positives Ergebnis auf der Amplifikation eines spezifischen Targets basiert und es sich nicht um einen Ramping Effekt handelt, welcher bei Instrumenten auftreten kann, bei denen der Grenzwert nicht manuell verändert werden kann.
- Jeder CRE STRIP des MAST ISOPLEX[®] CRE-ART Kit soll mit einer einzigen Testprobe verwendet werden. Um die Gültigkeit einer positiven Amplifikation sicherzustellen, sollte der Anwender einen CRE STRIP als Kontrolle ohne Template und einen CRE STRIP als positive Kontrolle durchführen.

Literatur

Notomi T et al. Nucleic Acids Research (2000) 28 12, 63