

REF 410500

IVD For *in vitro* Diagnostic Use



Rx Only

INTENDED USE

The Revogene® Carba C assay, performed on the Revogene instrument, is a qualitative *in vitro* diagnostic test designed for the detection and differentiation of the *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}*, and *bla_{IMP}* gene sequences associated with carbapenem-non-susceptible pure colonies of *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii*, or *Pseudomonas aeruginosa*, when grown on blood agar or MacConkey agar. The test utilizes automated real-time Polymerase Chain Reaction (PCR).

The Revogene Carba C assay should be used in conjunction with other laboratory tests including phenotypic antimicrobial susceptibility testing. A negative Revogene Carba C assay result does not preclude the presence of other resistance mechanisms.

The Revogene Carba C assay is intended as an aid for infection control in the detection of carbapenem-non-susceptible bacteria that colonize patients in healthcare settings. The identification of a *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* or *bla_{VIM}* metallo-β-lactamase gene (i.e., the genes that encode the IMP, NDM and VIM metallo-β-lactamases, respectively) may be used as an aid to clinicians in determining appropriate therapeutic strategies for patients with known or suspected carbapenem non-susceptible infections.

SUMMARY AND EXPLANATION

Resistance to carbapenems may be due to different mechanisms, and one of them is the production of carbapenemases. Carbapenemases are heterogeneous enzymes capable of hydrolyzing carbapenem antibiotics¹. Genes encoding carbapenemases are mainly located on mobile elements such as plasmids, facilitating their dissemination between different bacterial species. Plasmids carrying genes encoding carbapenemases of classes A (KPC), B (IMP, NDM, VIM) and D (OXA-48-like) have spread beyond healthcare institutions to cause critical community-acquired infections². Bacteria harboring those plasmid genes are often referred as carbapenemase-producing organisms (CPO) or carbapenem-resistant organisms (CRO).

Gram-negative *Enterobacteriaceae* bacilli are part of the normal gut flora and are reported as hosts of carbapenemase genes. *Enterobacteriaceae* that are non-susceptible to carbapenem antibiotics through the production of carbapenemase(s) are known as carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE). CPE can cause infections in almost any body part including bloodstream and urinary tract infections, ventilator-associated pneumonia and intra-abdominal abscesses³. The treatment of infections caused by these organisms is extremely difficult because of their multidrug resistance and hence, results in high mortality rates⁴.

Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter baumannii* are two (2) major opportunistic pathogens of the non-fermentative Gram-negative bacilli group. As intrinsic antibiotic resistance to multiple antibiotic classes is common with these organisms, carbapenems are often used for treatment⁵. Non-fermentative Gram-negative bacilli are increasingly acquiring resistance to carbapenem antibiotics as well, leaving few therapeutic options. Non-fermentative Gram-negative bacteria that are non-susceptible to carbapenem(s) through the production of carbapenemase(s) are known as carbapenemase-producing non-fermenters (CP-NF). CP-NF can be recovered from all body sites but are most commonly associated with healthcare-acquired pneumonias⁶.

Early identification and isolation of colonized or infected patients are key infection control measures to limit the spread of these organisms in healthcare settings and to help in a better guidance of treatment.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The Revogene Carba C assay can provide results from one (1) up to eight (8) samples in approximately 70 minutes using characterized carbapenem-non-susceptible isolated colonies of *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii*, or *Pseudomonas aeruginosa*. The assay minimizes operator intervention from the loading of the sample into the single-use microfluidic cartridge (PIE) to final result.

The test is performed using the Revogene instrument which automates sample homogenization and dilution, cells lysis, DNA amplification and detection of the amplified PCR products. User intervention is only required for the preparation of a standardized bacterial suspension from characterized carbapenem-non-susceptible isolated colonies, inoculation of the sample into the Sample Buffer Tube (SBT), transfer of the sample from the SBT into the PIE, and insertion of the PIES into the Revogene carousel.

Each PIE is a fully integrated and closed device, in which a sample is dispensed and processed through different microfluidic chambers and channels which allow for the sample processing (i.e. sample homogenization, sample dilution, cells lysis and DNA extraction) and subsequent real-time PCR steps (Figure 1). The liquid from a single sample is transferred by centrifugation from one (1) chamber to the next in sequence and all reagents specific for the PCR are incorporated and dried within the PCR wells. A Process Control (PrC) is incorporated into each PIE to verify sample processing and amplification steps including the verification of potential inhibitory substances as well as microfluidic, instrument or reagent failure. The amplified products are detected in real-time using target-specific TaqMan® chemistry-based probes.

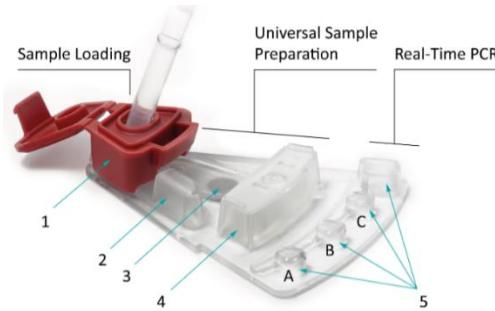


Figure 1. Top view of a PIE.
1: Sample Loading Chamber, 2: Overflow Chamber,
3: Homogenization Chamber containing PrC, 4: Dilution/Lysis Chamber,
5: Three (3) PCR Wells (A to C from left to right) and one (1) Waste Chamber (at the right end).

The Revogene can process from one (1) up to eight (8) samples simultaneously in the same run. The carousel must contain eight (8) PIES to maintain thermodynamic balance throughout the run. At run completion, the results are computed by the system from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms. Results are displayed on the touchscreen, and may be printed, transferred and stored by the user using the USB port or the connectivity option.

REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED

The Revogene Carba C kit contains sufficient reagents and materials to process 24 samples. The kit contains the following materials:

1. 24 Disposable Transfer Tools (DTT): Plastic pipette with minimal and maximal volume marks for transferring the sample from the SBT to the PIE.
2. 24 Sample Buffer Tubes (SBT): Tube containing Tris-HCl pH 8.0/EDTA.Na₂ (TE 1X) buffered solution as a dilution and preservation buffer for sample.
3. 24 individual pouches containing one (1) Carba C microfluidic cartridge (PIE): Integrated device which comprises dried reagents allowing sample process and real-time PCR steps for *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}*, and *bla_{IMP}* gene sequence amplification and detection. Each PIE contains PrC, PrC-specific primers and probe, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}*, and *bla_{IMP}* gene-specific primers and probes, dNTPs, buffer and DNA polymerase.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Revogene® (cat# 610210)
2. Disposable powderless gloves
3. Disposable sterile swabs
4. Saline solution (0.45% to 0.9% NaCl recommended)
5. Blood agar or MacConkey agar plates
6. 10 µg meropenem disc (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, cat# 231704 or equivalent)
7. Vortex mixer with a maximal speed of at least 3200 rpm (VWR cat# 58816-121 or equivalent)
8. Densitometer (VWR cat# 89402-910 or equivalent) or card with a white background and contrasting black lines (Wickerham Card for turbidity reading, 2x3 inches, black stripes recommended; cat# Z08 or equivalent)
9. Calibrated micropipette (P20 recommended, VWR cat# 89079-964 or equivalent)
10. DNase/RNase-free, aerosol resistant micropipette tips (extended length tips recommended; Sarstedt cat# 70.1189.215 or equivalent)
11. Sample rack (cat# 132539; optional)
12. MOCK PIE(s) (cat# 610208; optional)

WARNING AND PRECAUTIONS

1. The Revogene Carba C assay can only be used on the Revogene.
2. Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken upon arrival.
3. Do not use PIEs if the protective pouches are open or broken upon arrival.
4. Do not interchange DTT, SBT, and PIE between kit lots.
5. Each single-use PIE and DTT are used to process one (1) sample. Do not reuse PIE and DTT.
6. Always handle samples as if they are infectious and in accordance with Good Laboratory Practices such as those described in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁷ and in Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document M29-A4⁸.
7. Wear disposable powderless gloves while handling samples and thoroughly wash hands afterwards.
8. The PIE contains dried reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the test.
9. Dispose of unused reagents and waste in accordance with country, federal, provincial, state and local regulations.
10. Do not open or break apart the PIE after use. The cap and the seals in the PIE prevent contamination with amplification products and/or infectious particles.
11. Do not use a PIE that has been dropped, shaken or inverted after the sample has been loaded as this may cause invalid results.
12. Do not use a kit that has passed its stated expiration date.
13. Do not refrigerate the loaded PIE.
14. Each run must be performed with eight (8) PIEs in the Revogene carousel to maintain thermodynamic and mechanical balance within the run. Place MOCK PIEs or assay PIEs loaded with Sample Buffer in empty positions if less than eight (8) samples are tested.
15. Local, state, and federal rules and regulations for notification of reportable diseases are continually updated and specify a number of organisms that are important for surveillance and outbreak investigation^{9, 10}. Laboratories are responsible for following their state and/or local rules pertaining to reportable pathogens and should consult their local and/or state public health laboratories for isolate and/or clinical sample submission guidelines.

HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

There are no known hazards associated with this product.

STORAGE AND STABILITY

1. Store the Revogene Carba C kit at 2-25°C. The expiration date is indicated on the kit box label.
2. Do not open a pouch until ready to perform testing. Use the PIE within one (1) hour after opening the pouch.
3. Inoculated SBT can be stored at 25°C for up to four (4) days or, at 2-8°C for up to seven (7) days.

INSTRUCTION FOR USE

SAMPLE PREPARATION

1. Organisms must be identified as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter baumannii*, and carbapenem non-susceptibility status must be determined in accordance with the antibiotic disc package insert or the latest version of CLSI M100 Standards¹¹ prior to testing with the Revogene Carba C assay.
2. Inoculate the organism onto a blood agar or a MacConkey agar plate, streak for isolation, and place a 10 µg meropenem disc in the first quadrant as a means to ensure that the isolate retains its non-susceptibility to carbapenem.
3. Incubate the plate at 35°C for 18–24 hours in aerobic conditions.
4. Prepare a standardized 0.5 McFarland suspension in saline solution by collecting carbapenem-non-susceptible isolated colonies selected from the incubated agar plates close to the meropenem disc using a sterile swab.
5. Adjust the suspension to achieve a turbidity equivalent to a 0.5 McFarland standard. Use either a photometric device or, if performed visually, adequate light to compare the suspension and the 0.5 McFarland standard against a card with a white background and contrasting black lines. This results in a suspension containing approximately 1 to 2 x 10⁶ Colony-Forming Units (CFU)/mL.

SBT PREPARATION

1. For each sample to be tested, obtain one (1) SBT from the kit box.
2. Identify (or label) the SBT with the appropriate sample identification without obscuring or writing over the barcode. Place the SBT on the Sample rack, if used.
3. Vortex the 0.5 McFarland suspension at maximal speed for 15 seconds.
4. Using a micropipette, aspirate 15 µL of the standardized 0.5 McFarland suspension.
5. Remove the cap from the SBT and dispense the McFarland aliquot into the SBT, taking care not to produce aerosols. Pipet liquid up and down to ensure complete transfer of the aliquot. Make sure only one (1) SBT is open at any given moment.
6. Replace the cap on the SBT, close tightly, and replace the SBT on the Sample rack (if used).
7. Prepare any additional samples for testing by repeating steps 1 to 6.
8. When all samples are processed, proceed to step 9 (PIE PREPARATION).

PIE PREPARATION

NOTE: Process one (1) sample at a time.

9. Mix the SBT for a minimum of 15 seconds at maximal speed (≥ 3200 rpm) using a vortex mixer.
10. Unseal the PIE pouch and remove the PIE. Once unsealed, the PIE must be used within one (1) hour.
11. Obtain one DTT from the kit box and aspirate the inoculated Sample Buffer (SB) by squeezing the entire bulb. The liquid level into the DTT must be anywhere between the two marks (Figure 2). If the liquid level is not between the two marks, discharge the SB completely into the SBT and repeat this step.
12. Completely discharge the SB volume contained in the DTT into the Sample Loading Chamber of the PIE (Figure 1). Make sure not to touch the outer edges or the bottom of the Sample Loading Chamber with the DTT.
13. Close the cap of the PIE tightly. Place the PIE on the Sample rack, if used. Do not refrigerate the loaded PIE.
14. Prepare all additional samples for testing by repeating steps 9 to 13 then proceed to step 1 of the REVOCENE SYSTEM OPERATION section.

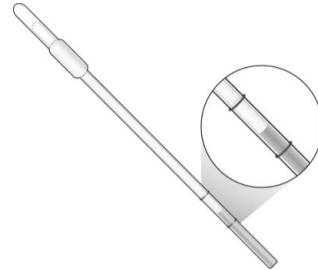


Figure 2.
Representation of an appropriate Sample Buffer (SB) level using the Disposable Transfer Tool (DTT).

REVOCENE SYSTEM OPERATION

NOTE 1: Each run must be performed with eight (8) PIEs in the Revogene. When less than eight (8) samples are processed, fill the empty places with MOCK PIEs*.

NOTE 2: Refer to the Revogene Operator's Manual¹² for further information regarding Revogene set-up and operation.

1. Power on the Revogene (if not already done). The software will launch automatically.
2. Log in by entering <Username> and <Password> and tap <Login>. The main menu will appear automatically.
3. Tap <Setup Run>.
4. Enter the sample identification number using either the barcode scanner or manual entry. Manual entry can be done by tapping the pencil icon of the <Scan or Enter Sample ID> line.
5. Enter the SBT and PIE barcodes using the barcode scanner by gently positioning the PIE almost vertically in front of the scanner. Alternatively, SBT and PIE barcodes may be entered manually (tap the pencil icon of their respective lines). Handle the PIE carefully without shaking or dropping it.
6. (Optional) Tap the pencil icon of the <Add Comments> line and type a comment.
7. Insert the PIE into the Revogene at any position of the carousel. The software will automatically associate sample and SBT to the correct PIE.
8. Confirm that the PIE is inserted by tapping <OK> on the <Insert PIE into instrument> line and repeat steps 4 to 8 for all samples. If less than eight (8) PIEs are being tested, load MOCK PIEs* in the carousel remaining positions. No scan is required when inserting MOCK PIEs into the Revogene.
9. When all PIEs are inserted into the carousel, tap <Next>.
10. If you have entered MOCK PIEs into the carousel, follow the instructions on the screen.
11. Scan the retention ring and place it on the carousel. Close the instrument lid.
12. Initiate the test run by tapping <Start>.
13. Store inoculated SBT in appropriate conditions (refer to STORAGE AND STABILITY section) for further repeat testing, if needed.

*If MOCK PIEs are not available, use new assay PIEs filled with SB (BLANK).

VIEWING AND EXPORTING RESULTS

- Once the run is completed, the lid opens automatically.
- If the Revogene has logged out, re-enter <Username> and <Password> and tap <Login>. The main menu will appear automatically.
- Tap Results icon to access test results. The Results window shows the reported result(s) for each sample (**Figure 3**).

Sample ID	Patient ID	Started	Assay	Result
1295227899		11/23/2018 2:53 PM	CARBA	
1295227900		11/23/2018 2:53 PM	CARBA	
1295227901		11/23/2018 2:53 PM	CARBA	
1295227902		11/23/2018 2:53 PM	CARBA	
1295227903		11/23/2018 2:53 PM	CARBA	
1295227904		11/23/2018 2:53 PM	CARBA	
1295227905		11/23/2018 2:53 PM	CARBA	
1295227906		11/23/2018 2:53 PM	CARBA	

Results:

IMP	Negative
KPC	Positive
NDM	Negative
OXA-48-like	Negative
VIM	Negative

Figure 3.
Results window showing the reported result(s) for each sample.

- Tap <Last Run> to see the latest test results.
- Tap <Reports> to see the specific target result for each sample. Refer to the RESULTS INTERPRETATION section in order to confirm if any additional action needs to be taken according to the target(s) result(s) obtained.
NOTE: In the case of a repeat test of a sample, all positive results from both the initial and the repeat test should be reported, even if there is a discrepancy between the results for the same target.
- From the <Last Run>, select samples for which results report(s) has (have) to be exported. All samples can be selected simultaneously by checking the box on the upper left corner of the screen.
- Tap <Exports> and save where appropriate (e.g. USB key).
- (Optional) Tap <Search> to find a specific sample and its result.
- Remove the retention ring and PIEs from the Revogene. The used PIEs should be disposed in the appropriate waste containers according to your institution's standard practices.

QUALITY CONTROL

Quality control procedures monitor the accuracy and precision of the analytical process. Each laboratory must establish the number, type and frequency of testing control materials per applicable regulations or accrediting agencies. The procedure described below may be employed, if appropriate, based on local policies and procedures.

PROCESS CONTROL

Each PIE contains a Process Control (PrC) that verifies the sample homogenization, sample dilution, cell lysis, DNA amplification inhibition and assay reagents failure.

EXTERNAL CONTROLS

NOTE: Separate DTT, SBT and PIE must be used for each External Control.

- Good laboratory practice recommends the use of control materials. User should follow the appropriate guidelines concerning the running of External Controls. It is recommended that one (1) Positive External Control and one (1) Negative External Control should be run at least on a daily basis until adequate process validation is achieved with the Revogene Carba C assay on the Revogene in each laboratory setting.
- External Control materials are not provided by Meridian Bioscience, Inc. External Controls are not used by the Revogene software for the purpose of sample test result interpretation. External Controls are treated as if they are specimens.

Five (5) different Positive External Controls and one (1) Negative External Control are recommended and listed below.

Positive External Controls

A standardized 0.5 McFarland suspension of isolated colonies from characterized carbapenem-non-susceptible commercially available strains, diluted in saline solution, is recommended as a Positive External Control. Recommended strains are:

- K. pneumoniae* bla_{KPC-2} (CCUG 59348),
- K. pneumoniae* bla_{NDM-1} (ATCC® BAA-2146™),
- K. pneumoniae* bla_{VIM-1} (NCTC 13440),
- E. coli* bla_{OXA-48} (ATCC® BAA-2523™),
- E. coli* bla_{IMP-1} (NCTC 13476).

Each of the five (5) recommended Positive External Controls may be tested alternately.

Negative External control

A standardized 0.5 McFarland suspension in saline of isolated colonies from a representative, carbapenem-non-susceptible strain of *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* or *P. aeruginosa* that does not carry any of the resistance genes targeted by the Revogene Carba C assay is recommended as a Negative External Control.

EXTERNAL CONTROLS PREPARATION

- Inoculate the organism onto a blood agar or a MacConkey agar plate, streak for isolation, and place a 10 µg meropenem disc in the first quadrant as a means to ensure that the isolate retains its non-susceptibility to carbapenem.
- Incubate the plate at 35 °C for 18–24 hours in aerobic conditions.
- Prepare a standardized 0.5 McFarland suspension in saline solution by collecting isolated colonies selected from the incubated agar plate close to the meropenem disc using a sterile swab.
- Adjust the suspension to achieve a turbidity equivalent to a 0.5 McFarland standard. Use either a photometric device or, if performed visually, adequate light to compare the suspension and the 0.5 McFarland standard against a card with a white background and contrasting black lines. This results in a suspension containing approximately 1 to 2 × 10⁶ Colony-Forming Units (CFU)/mL.

Process and test External Control suspensions according to SBT PREPARATION/PIE PREPARATION sections, then follow the REVOGENE SYSTEM OPERATION section.

REPEAT TESTING PROCEDURE

INDETERMINATE OR UNRESOLVED RESULT

When an Indeterminate (IND) or an Unresolved (UNR) target result is obtained for a sample, a repeat test from the corresponding inoculated SBT must be performed within the specified timeframe described in the STORAGE AND STABILITY section.

Use the original corresponding inoculated SBT to load a new PIE from the same kit lot and discard the unused SBT. Follow steps 9 to 13 of the PIE PREPARATION section for each sample and then, the REVOGENE SYSTEM OPERATION section. If needed, a new SBT can be inoculated from a new standardized 0.5 McFarland suspension.

Indeterminate or Unresolved Results for an External Control

When an Indeterminate (IND) or an Unresolved (UNR) target result is obtained for an External Control, the run should be considered invalid. A repeat test of Positive and Negative External Controls, as well as of the samples included in the same run, should be performed from the corresponding inoculated SBT. All inoculated SBT must be tested within the specified timeframe described in the STORAGE AND STABILITY section.

Use the corresponding inoculated SBT to load a new PIE from the same kit lot. Follow the PIE PREPARATION section from step 9, then follow the REVOGENE SYSTEM OPERATION section.

Unexpected Negative or Unexpected Positive Result for an External Control

When an unexpected Negative or an unexpected Positive target result is obtained for an External Control, the run should be considered invalid. A repeat test of Positive and Negative External Controls should be performed with a new set of External Controls, as described in the QUALITY CONTROL section. Handling and preparation techniques should be reviewed.

In addition, repeat testing should be performed for all samples included in the run, using the original corresponding inoculated SBT within the timeframe defined in the STORAGE AND STABILITY section with a new set of External Controls. Refer to the QUALITY CONTROL section for preparation of a new set of External controls.

Use the corresponding inoculated SBT to load a new PIE from the same kit lot. Follow the PIE PREPARATION section from step 9, then follow the REVOGENE SYSTEM OPERATION section.

RESULTS INTERPRETATION

The results are computed by the Revogene from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms and are available on the "Results" window. Possible reported results are listed below.

Sample type	Symbol(s) displayed on user screen	Reported result(s)	Interpretation	Additional step
Isolated Colony		Positive	KPC, NDM, VIM, OXA-48-like and IMP target DNA detected.	No additional step needed.
		Negative	KPC, NDM, VIM, OXA-48-like and IMP target DNA not detected.	No additional step needed.
		Positive /Negative	KPC and/or NDM and/or VIM and/or OXA-48-like and/or IMP target DNA detected AND Whether KPC and/or NDM and/or VIM and/or OXA-48-like and/or IMP target DNA not detected.	No additional step needed.
		Unresolved	Amplification/detection failure of the Process Control. This could be caused by inhibitory samples, microfluidic or reagent failure.	Repeat testing must be performed (refer to the REPEAT TESTING PROCEDURE section).
		Positive/ Unresolved	KPC and/or NDM and/or VIM and/or OXA-48-like and/or IMP target DNA detected AND Amplification/detection failure of the Process Control. This could be caused by inhibitory samples, microfluidic or reagent failure.	Repeat testing must be performed (refer to the REPEAT TESTING PROCEDURE section). All initial Positive results must be considered as Positive even if the repeat test reports a different result for those targets.
		Indeterminate	No reportable result due to possible Revogene detection error during the assay processing or the data analysis, or if the run is interrupted.	Repeat testing must be performed (refer to the REPEAT TESTING PROCEDURE section).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The Revogene Carba C assay detects *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48-like}, and *bla*_{IMP} gene sequences, and is not for bacterial identification.
2. The performance of the Revogene Carba C assay with bacteria other than *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* has not been evaluated. Organisms should be identified, and carbapenem non-susceptibility status should be determined, prior to testing with the Revogene Carba C assay.
3. *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* exhibit intrinsic resistance to ertapenem. Determination of the carbapenem susceptibility of these species and applicability of the Revogene Carba C assay should be based on testing with meropenem, imipenem and/or doripenem.
4. The Revogene Carba C assay is not a sub-typing tool and does not report variants of the *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48-like}, and *bla*_{IMP} genes.
5. The Revogene Carba C assay must only be used with the Revogene instrument by trained personnel.
6. Only Revogene Carba C PIEs can be used within a single run. PIEs from other Revogene assays are not compatible with the Revogene Carba C assay and should not be used.
7. Results from the Revogene Carba C assay should be used as an adjunct to clinical observations and other information available to the physician.
8. Erroneous test results may occur from improper culture preparation, handling or storage, technical error, or sample mix-up. Careful compliance with the instructions of this insert, the Revogene Operator's Manual and to established guidelines is necessary to avoid erroneous results.
9. Contamination or unexpected positive results may occur if a PIE cap is incorrectly closed or if a droplet has been dropped on the edges of the Sample Loading Chamber.
10. Storage longer than the time period indicated in the STORAGE AND STABILITY section for the SBT samples may yield unexpected or invalid results.
11. Mutations or polymorphisms in current, new or unknown *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48-like} and *bla*_{IMP} gene sequences may affect detection, resulting in false negative results.
12. *In silico* predictions of the inclusivity of the Revogene Carba C primers and probes were performed using sequence data available in GenBank in 2018. Analysis of new variant sequences of the targeted carbapenemase genes deposited in GenBank after 2018 has not been performed.
13. Performance of the Revogene Carba C assay with non-target carbapenemase genes, other than *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SME}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SPM} is unknown.

EXPECTED VALUES

A total of 512 carbapenem non-susceptible bacterial isolates were evaluated during the Carba C clinical study at three (3) sites in United States and Canada. Revogene Carba C assay results for each gene target in comparison to the Reference Method (a marketed Nucleic Acid Amplification Test [NAAT]) are presented in **Tables 1 to 4**.

CLINICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of the Revogene Carba C assay was established in a clinical study conducted at three (3) sites in United States and Canada.

Bacterial isolates characterized as *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* were grown on both blood agar and MacConkey agar plates. *Enterobacteriaceae* isolates were intermediate or resistant to doripenem, ertapenem, imipenem and/or meropenem according to CLSI M02¹³ Standards. *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates were intermediate or resistant to doripenem, imipenem and/or meropenem, since they are intrinsically resistant to ertapenem. Colonies isolated on blood agar and MacConkey agar were diluted in saline to obtain a 0.5 McFarland standard equivalent suspension and tested with the Revogene Carba C assay. The Reference Method consisted of a high-performing FDA-cleared NAAT for the detection of the targeted carbapenemase genes from isolated colonies of known carbapenem non-susceptible organisms, the performance of which was established in comparison to PCR/bidirectional sequencing and which was used according to the manufacturer's instructions.

The sensitivity and specificity were calculated by comparing Revogene Carba C assay results with Reference Method. Discrepant analysis was performed on samples with discordant results between the Revogene Carba C assay and reference NAAT using an alternative PCR method for the amplification and detection of *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48-like}, and *bla*_{IMP} genes followed by bi-directional sequencing of the amplified product.

RESULTS

A total of 532 bacterial isolates (475 clinical stock isolates and 57 prospectively collected fresh isolates) were tested during the clinical study. Twenty isolates were excluded from the analysis of performance because either they belonged to a non-target species, their identity could not be confirmed, they exhibited susceptibility to carbapenems, there was a laboratory error or valid PCR results were not obtained. Therefore, a total of 512 bacterial isolates were used to establish the performance of the Revogene Carba C assay in comparison to the Reference Method.

The sensitivity and specificity of the Revogene Carba C assay for the detection of the five (5) targeted carbapenemase genes from colonies grown on blood agar and MacConkey agar are shown in **Tables 1 and 2**, respectively.

A total of 24 isolates contained more than one carbapenemase gene as determined by the Revogene Carba C assay. The reported carbapenemase gene content of 21 of these isolates was confirmed by the Reference Method. However, the Reference Method only detected one carbapenemase gene in the other three (3) isolates.

The initial non-reportable rates (combining Unresolved and Indeterminate rates), at the media level, were 1.7% (9/516) from blood agar, and 1.4% (7/516) from MacConkey agar. At the target level, from blood agar, the rates were 1.7% (9/516) for *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{OXA-48-like} gene targets and 1.6% (8/516) for *bla*_{VIM} gene target, with an overall rate of 1.7% (9/516). From MacConkey agar, the non-reportable rates were 1.4% (7/516) across all targets. After repeat testing, the non-reportable rates were 0.8% (4/516) across all media and gene targets.

The Revogene Carba C assay performance for each organism group for blood agar and MacConkey agar are presented in **Tables 3 and 4**.

Table 1. Performance of Revogene Carba C Assay on Isolated Colonies Grown on Blood Agar

Target	N	TP	FP	TN	FN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98.9% (96.2 – 99.7)	99.4% (97.8 – 99.8)
KPC	512	113	3 ^b	395	1	99.1% (95.2 – 99.8)	99.2% (97.8 – 99.7)
OXA-48-like	512	65	3 ^c	444	0	100.0% (94.4 – 100.0)	99.3% (98.0 – 99.8)
IMP	512	27	19 ^d	466	0	100.0% (87.5 – 100.0)	96.1% (94.0 – 97.5)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100.0% (93.1 – 100.0)	99.8% (98.8 – 100.0)

N: Number; TP: True Positive; FP: False Positive; TN: True Negative; FN: False Negative; CI: Confidence Interval

Note: Discrepant testing consisted of five (5) alternative PCR followed by bi-directional sequencing and was performed for every discrepant target result. The results from discrepant testing of 21/31 samples agreed with those of the Revogene Carba C assay.

^a One (1) out of two (2) was NDM-1 positive.

^b Two (2) out of three (3) were KPC-3/KPC-38 positive.

^c One (1) out of three (3) was OXA-48 positive. Investigation suggested an OXA-48 cross-contamination at the step of sample preparation in one (1) out of three (3) isolates. Discrepant testing did not produce a sequence match with the OXA-48-like target.

^d Seventeen (17) out of 19 were found IMP positive including 1 (one) variant of IMP-4 (from Australia [2010]).

11 variants IMP-13/IMP-37 one (1) from Argentina [2006], one (1) from North America [2014], nine (9) from Europe [2005–2015], one (1) variant of IMP-27/IMP-64 (from Canada [2017]), one (1) variant of IMP-15 (from Argentina [2004]), one (1) variant of IMP-16 (from Brazil [2004]) and two (2) variants of IMP-62 (from Argentina [2006]). The discrepant analysis pointed out potential differences in IMP variant coverage between the Revogene Carba C assay and the Reference Method. Investigation suggested an IMP cross-contamination at the step of sample preparation in two (2) out of 19 isolates for which discrepant testing did not produce a sequence match with the IMP target.

^e Investigation suggested a VIM cross-contamination at the step of sample preparation. Discrepant testing did not produce a sequence match with the VIM target but produced a sequence match for the NDM target.

^f Discrepant testing did produce a sequence match with the NDM-1 target in one (1) out of two (2) isolates and produced a sequence match for the OXA-48-like target in one (1) out of two (2) isolates. The OXA-48 positive isolate was classified as FP.

Table 2. Performance of Revogene Carba C Assay on Isolated Colonies Grown on MacConkey Agar

Target	N	TP	FP	TN	FN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98.9% (96.2 – 99.7)	99.4% (97.8 – 99.8)
KPC	512	114	3 ^b	395	0	100.0% (96.7 – 100.0)	99.2% (97.8 – 99.7)
OXA-48-like	512	65	2 ^c	445	0	100.0% (94.4 – 100.0)	99.6% (98.4 – 99.9)
IMP	512	27	21 ^d	464	0	100.0% (87.5 – 100.0)	95.7% (93.5 – 97.2)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100.0% (93.1 – 100.0)	99.8% (98.8 – 100.0)

N: Number; TP: True Positive; FP: False Positive; TN: True Negative; FN: False Negative; CI: Confidence Interval

Note: Discrepant testing consisted of five (5) alternative PCR followed by bi-directional sequencing and was performed for every discrepant target result. The results from discrepant testing of 21/31 samples agreed with those of the Revogene Carba C assay.

^a One (1) out of two (2) was NDM-1 positive.^b Two (2) out of three (3) were KPC-3/KPC-38 positive.^c One (1) out of two (2) was OXA-48 positive. Investigation suggested an OXA-48 cross-contamination at the step of sample preparation in one (1) out of two (2) isolates. Discrepant testing did not produce a sequence match with the OXA-48-like target.^d Seventeen (17) out of 21 were found IMP positive including one (1) variant of IMP-4 (from Australia [2010]).

11 variants IMP-13/IMP-37 (one (1) from Argentina [2006], one (1) from North America [2014], nine (9) from Europe [2005–2015]), one (1) variant of IMP-27/IMP-64 (from Canada [2017]), one (1) variant of IMP-15 (from Argentina [2004]), one (1) variant of IMP-16 (from Brazil [2004]) and two (2) variants of IMP-62 (from Argentina [2006]). The discrepant analysis pointed out potential differences in IMP variant coverage between the Revogene Carba C assay and the Reference Method. Investigation suggested an IMP cross-contamination at the step of sample preparation in four (4) out of 21 isolates for which discrepant testing did not produce a sequence match with the IMP target.

^e Investigation suggested a VIM cross-contamination at the step of sample preparation. Discrepant testing did not produce a sequence match with the VIM target but produced a sequence match for the KPC target.^f Discrepant testing did produce a sequence match with the NDM-1 target in one (1) out of two (2) isolates and produced a sequence match for the OXA-48-like target in one (1) out of two (2) isolates. The OXA-48 positive isolate was classified as FP.

Table 3. Performance of Revogene Carba C Assay by Organism Category and by Target Gene, for Isolated Colonies Grown on Blood Agar

Medium	Organisms	Target	N	TP	FP	TN	FN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Blood agar	Enterobacteriaceae	NDM	306	85	1	219	1	98.8% (93.7 – 99.8)	99.5% (97.5 – 99.9)
		KPC	306	112	3	190	1	99.1% (95.2 – 99.8)	98.4% (95.5 – 99.5)
		OXA-48-like	306	64	3	239	0	100.0% (94.3 – 100.0)	98.8% (96.4 – 99.6)
		IMP	306	14	5	287	0	100.0% (78.5 – 100.0)	98.3% (96.1 – 99.3)
		VIM	306	12	0	294	0	100.0% (75.8 – 100.0)	100.0% (98.7 – 100.0)
	Pseudomonas aeruginosa	NDM	107	26	1	80	0	100.0% (87.1 – 100.0)	98.8% (93.3 – 99.8)
		KPC	107	0	0	107	0	N/A	100.0% (96.5 – 100.0)
		OXA-48-like	107	1	0	106	0	100.0% (20.7 – 100.0)	100.0% (96.5 – 100.0)
		IMP	107	5	14	88	0	100.0% (56.6 – 100.0)	86.3% (78.3 – 91.6)
		VIM	107	39	0	68	0	100.0% (91.0 – 100.0)	100.0% (94.7 – 100.0)
	Acinetobacter baumannii	NDM	99	75	0	23	1	98.7% (92.9 – 99.8)	100.0% (85.7 – 100.0)
		KPC	99	1	0	98	0	100.0% (20.7 – 100.0)	100.0% (96.2 – 100.0)
		OXA-48-like	99	0	0	99	0	N/A	100.0% (96.3 – 100.0)
		IMP	99	8	0	91	0	100.0% (67.6 – 100.0)	100.0% (96.0 – 100.0)
		VIM	99	1	1	97	0	100.0% (20.7 – 100.0)	99.0% (94.4 – 99.8)

N: Number; TP: True Positive; FP: False Positive; TN: True Negative; FN: False Negative; CI: Confidence Interval

More than one (1) targeted genes were detected for some isolates.

Table 4. Performance of Revogene Carba C Assay by Organism Category and by Target Gene, on Isolated Colonies Grown on MacConkey Agar

Medium	Organisms	Target	N	TP	FP	TN	FN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
MacConkey agar	Enterobacteriaceae	NDM	306	85	1	219	1	98.8% (93.7 – 99.8)	99.5% (97.5 – 99.9)
		KPC	306	113	3	190	0	100.0% (96.7 – 100.0)	98.4% (95.5 – 99.5)
		OXA-48-like	306	64	2	240	0	100.0% (94.3 – 100.0)	99.2% (97.0 – 99.8)
		IMP	306	14	5	287	0	100.0% (78.5 – 100.0)	98.3% (96.1 – 99.3)
		VIM	306	12	1	293	0	100.0% (75.8 – 100.0)	99.7% (98.1 – 99.9)
	Pseudomonas aeruginosa	NDM	107	26	1	80	0	100.0% (87.1 – 100.0)	98.8% (93.3 – 99.8)
		KPC	107	0	0	107	0	N/A	100.0% (96.5 – 100.0)
		OXA-48-like	107	1	0	106	0	100.0% (20.7 – 100.0)	100.0% (96.5 – 100.0)
		IMP	107	5	14	88	0	100.0% (56.6 – 100.0)	86.3% (78.3 – 91.6)
		VIM	107	39	0	68	0	100.0% (91.0 – 100.0)	100.0% (94.7 – 100.0)
	Acinetobacter baumannii	NDM	99	75	0	23	1	98.7% (92.9 – 99.8)	100.0% (85.7 – 100.0)
		KPC	99	1	0	98	0	100.0% (20.7 – 100.0)	100.0% (96.2 – 100.0)
		OXA-48-like	99	0	0	99	0	N/A	100.0% (96.3 – 100.0)
		IMP	99	8	2	89	0	100.0% (67.6 – 100.0)	97.8% (92.3 – 99.4)
		VIM	99	1	0	98	0	100.0% (20.7 – 100.0)	100.0% (96.2 – 100.0)

N: Number; TP: True Positive; FP: False Positive; TN: True Negative; FN: False Negative; CI: Confidence Interval

More than one (1) targeted genes were detected for some isolates.

ANALYTICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS
INCLUSIVITY

Inclusivity of the Revogene Carba C assay was determined for 58 carbapenem non-susceptible isolates of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from various geographic and temporal origins including:

- Two (2) strains with two (2) resistance genes;
- Eleven (11) strains including five (5) variants with the *bla_{KPC}* resistance gene;
- Eleven (11) strains including at least three (3) variants with the *bla_{KPC}* resistance gene;
- Fourteen (14) strains including five (5) variants with the *bla_{NDM}* resistance gene;
- Eleven (11) strains including three (3) variants with the *bla_{OXA-48-like}* resistance gene;
- Nine (9) strains including four (4) variants with the *bla_{VIM}* resistance gene.

Each strain was tested from a standardized 0.5 McFarland bacterial suspension corresponding to 1.5 to 3x10⁶ CFU/mL of SB. Three (3) replicates per strain were tested using three (3) different Revogene Carba C kit lots (1 replicate per kit lot). The 58 strains were detected by the Revogene Carba C assay and are described in Table 5.

Table 5. Carbapenem Non-susceptible Strains Tested for Inclusivity with the Revogene Carba C Assay

Species	Collection Number	Resistance Gene and Variant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® BAA-2793™	KPC-2 VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23061	OXA-232 NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-1705™	KPC-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21587	KPC-2
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21578	KPC-4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CCRI-21581	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19587	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19570	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59413	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59348	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 56233	KPC-2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2340™	KPC ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13443	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2146™	NDM-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22255	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-21711	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22199	NDM-1
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22257	NDM-1
<i>Providencia stuartii</i>	CCRI-22256	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22254	NDM-4
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23064	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23464	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23065	NDM-6
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23066	NDM-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC® BAA-2468™	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 60138	NDM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19585	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22258	VIM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21588	VIM-2
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22261	VIM-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-22720	VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22259	VIM-19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13442	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22263	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22265	OXA-48
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22266	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22264	OXA-181
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22267	OXA-181
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23060	OXA-204
<i>Citrobacter freundii</i>	CCRI-23374	OXA-204
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2523™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2524™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 64452	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP-1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-19488	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19569	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19582	IMP-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21589	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19583	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19588	IMP-4
<i>Citrobacter youngae</i>	CCRI-21591	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19584	IMP-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21590	IMP-9
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22262	IMP-11

^a Identification of the resistance gene variant is not available.

In addition, an *in silico* analysis was performed on November 7th, 2018 to assess inclusivity of the primers and probes of the Revogene Carba C assay targets. For each target, all the *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}* and *bla_{IMP}* resistance gene sequences listed in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database were analyzed. One (1) representative sequence of each known variant was aligned. The number of variants analyzed and predicted to be detected is summarized for each target in Table 6.

Table 6. Summary of Targeted Resistance Gene Variants Detection Based on the *in silico* Prediction.

Target	Tested with Revogene® Carba C			<i>in silico</i> Prediction		
	Nb. of Samples	Variants Detected	Variants not Detected	Detectable ^a	Potentially Detectable ^b	Not Detectable
KPC	12	2, 3, 4	None	2 to 38	None	N/A
NDM	15	1, 4, 5, 6, 7	None	1 to 24	None	N/A
IMP	11	1, 4, 8, 9, 11	None	1, 2, 4 to 6, 8 to 10, 13 to 20, 23 to 26, 28 to 30, 32, 33, 37, 38, 40, 42, 45, 47 to 49, 53 to 56, 59, 60, 62, 66, 69 to 72, 74 to 79	3, 7 ^c , 11 ^d , 21, 22, 27, 34, 41, 43, 44, 51, 52, 58, 61, 64, 67, 68, 73	12, 31, 35, 63
OXA-48-like	12	48, 181, 204, 232	None	48, 162, 181, 199, 204, 232, 244, 245, 252 ^e , 370, 484, 505, 514 ^f , 515 ^e , 519, 546 ^e , 547 ^e , 566	None	54 ^e , 163 ⁱ , 247 ^j , 405 ⁱ , 416 ^e , 436, 438 ⁱ , 439 ⁱ , 517, 535 ^e , 538 ^e , 567
VIM	10	1, 2, 10, 19	None	1 to 6, 8 to 12, 14 to 20, 23 to 46, 48 to 50, 52 to 55, 57, 59, 60	51, 56, 58	7, 13, 47

^a Based on alignments with identity and query cover ≥ 95% and E-values < 0.01.^b Based on alignments presenting not more than two (2) nucleotides mismatches.^c A recombinant strain carrying an IMP-7 gene was tested with the Revogene Carba C assay, in complement to the *in silico* study, and its detection was confirmed.^d A clinical strain carrying an IMP-11 gene was tested with the Carba C assay in the analytical inclusivity study and its detection was confirmed.^e Variants only identified in the rare opportunistic human pathogens of the *Shewanella* genus.^f Variants presenting a deletion in their sequence resulting in no carbapenemase activity.**CROSS-REACTIVITY**

The cross-reactivity of the Revogene Carba C assay was assessed with high loads of carbapenem-non-susceptible strains carrying different β-lactamase resistance genes that are not targeted by the assay.

The study included 50 *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying different β-lactamase resistance genes (i.e., *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AMP}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SME}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SPM}) (**Table 7**). Strains were tested at a minimal load of 8.18x10⁶ CFU/mL of SB. Three (3) replicates per strain were tested using three (3) different Revogene Carba C kit lots (1 replicate per kit lot).Under the conditions of the study, 49 strains were found non-reactive with the Revogene Carba C assay. *Klebsiella pneumoniae* CCUG 59359 *bla*_{TEM-52} strain was found reactive at a final concentration of 1.13x10⁷ CFU/mL of SB but was found non-reactive when diluted 10-fold at a final concentration of 1.13x10⁶ CFU/mL of SB.The cross-reactivity with primers and probes of the Revogene Carba C assay was evaluated by an *in silico* analysis performed on sequences contained in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database on September 0th, 2018. No other resistance gene than the assay targets (i.e. *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48-like} and *bla*_{IMP} resistance genes) was found to have a homology with the primers and probes of the Revogene Carba C assay, including *bla*_{MRI} and *bla*_{VEB}, which are two (2) other β-lactamase resistance genes that are not targeted by the assay.**Table 7. List of Strains Tested for Cross-Reactivity with the Revogene Carba C Assay.**

Species	Collection Number	Non-Targeted Resistance Gene(s) ¹
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22353	ACT-15
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23473	No β-lactamase Gene Identified
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21540	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22075	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22097	ACT-16
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23318	TEM-206, CTX-M-15, CMH-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21970	AmpC1, AmpC2, MrdA, AmpH, CMY-44
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CCRI-19495	SHV-5, AmpC
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-21537	SRT-1
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-23334	SME-4, SRT-1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21536	ACT-5
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21603	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21692	ACT-14
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1016	TEM-90, Mbl, BlaA2, OXA-65 ³ , Zn-dependent hydrolase
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-1015	TEM-171, SCO-1, PER-2, OXA-9 ³ , SHV-39, AmpH
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1017	TEM-206, SCO-1, Mbl, BlaA2, OXA-67 ³ , Zn-dependent hydrolase
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-831	TEM-206, CTX-M-2, OXA-2 ³
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-825	TEM-33, CTX-M-2, OXA-2 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-873	OXA-50 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-1228	OXA-50 ³
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8892	TEM-166, CTX-M-5, OXA-1 ³
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8893	TEM-95, CTX-M-5, OXA-1 ³
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-785	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-779	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-778	AmpC2, MrdA
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3854	ACT-4 ²
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3879	AmpC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3853	AmpC
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3852	ACT-7
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	CCRI-806	OKP-B-11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-784	SHV-27, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-878	AmpC2, MrdA, AmpH
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-826	TEM-215
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 54718	TEM-33, CTX-M-15, OXA-1 ³ , AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59358	SHV-14, OXA-1 ³ , LAP-2
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13441	CTX-M-15, TEM-198, MrdA, OXA-1 ³ , AmpC2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 58546	SHV-44, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59349	CTX-M-15, OXA-1 ³ , TEM-105, SHV-11, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59359	SHV-70, TEM-15, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59360	TEM-168, SHV-12, OXA-9 ³ , AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55970	CTX-M-9, AmpC2, TEM-206, MrdA, AmpC1, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55971	TEM-143, CTX-M-15, AmpC2
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55972	AmpC1, CTX-M-2, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58540	AmpC2, TEM-206, CTX-M-15, OXA-1 ³ , MrdA, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58541	CTX-M-14, TEM-104, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58542	CTX-M-15, AmpC2, OXA-1 ³ , MrdA
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-21789	No β-lactamase Gene Identified
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13465	SHV-85, TEM-206, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21710	AmpC2, MrdA, CTX-M-15, AmpH, OXA-1 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C72	SPM

¹ Analyzed by Whole Genome Sequencing, except for *P. aeruginosa* C72 strain.² Resistance gene identified with 99.9% homology.³ These *bla*_{OXA} variants are not part of the *bla*_{OXA-48-like} family, but are part of the Ambler class D.

INTERFERING SUBSTANCES

The potentially inhibitory effect of 12 combinations of agar plates and sterile saline solutions that may be used for isolation and 0.5 McFarland (McF) suspension preparation was assessed using five (5) positive bacterial strains, each harboring one (1) of the resistance genes detected by the Revogene Carba C assay, and one (1) negative carbapenem-non-susceptible strain that does not carry any of the resistance genes targeted by the assay. Each strain was first cultured on Blood Agar Plates (BAP) and MacConkey Agar Plates (MAP) in presence of a 10 µg meropenem disc, and then sub-cultured on fresh BAP or MAP. Isolated colonies obtained from the fresh BAP or MAP were sampled using a sterile dry swab and diluted in a sterile saline solution at a concentration equivalent to a standardized 0.5 McFarland suspension. A total of 12 combinations were tested (**Table 8**). For each combination, one (1) replicate of each strain was tested with three (3) Revogene Carba C kit lots. None of the 12 combinations showed reportable interference with the Revogene Carba C assay.

Table 8. List of Combinations of Agar Plates and Saline Solutions Tested with the Revogene Carba C Assay.

Agar Plate / Saline Solution (Manufacturer)
Colombia Blood Agar 5% (Hardy Diagnostics) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
Colombia Blood Agar 5% (Hardy Diagnostics) / Saline 0.85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Prepared Media BD BBL™ Columbia Agar with 5% Sheep Blood (BD) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
Prepared Media BD BBL™ Columbia Agar with 5% Sheep Blood (BD) / Saline 0.85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Columbia Agar with 5% Sheep Blood (bioMérieux) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
Columbia Agar with 5% Sheep Blood (bioMérieux) / Saline 0.85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
MacConkey Agar (Hardy Diagnostics) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
MacConkey Agar (Hardy Diagnostics) / Saline 0.85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
MacConkey Agar Medium (Thermo Scientific™ Remel™) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
MacConkey Agar Medium (Thermo Scientific™ Remel™) / Saline 0.85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
MacConkey Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
MacConkey Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™) / Saline 0.85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)

CARRY-OVER AND CROSS-CONTAMINATION

The carry-over (between-run) and cross-contamination (within-run) were assessed using high positive and negative samples. The concentration of each bacterial suspension was standardized to 4 McFarland ($\geq 1.14 \times 10^7$ CFU/mL of Sample Buffer), higher than the nominal concentration of 0.5 McFarland that is specified for use in the assay. Positive samples were prepared with the *Klebsiella pneumoniae* CCUG 59348 strain which harbors the *bla_{KPC}* gene. Negative samples were prepared with the carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* CCR1-22760 strain that does not carry any of the carbapenemase resistance genes targeted by the assay.

For the carry-over study, a run of eight (8) replicates of high positive samples followed by a run of eight (8) replicates of negative samples was performed by two (2) operators with the Revogene Carba C assay, for a total of ten (10) runs on one (1) Revogene.

For the cross-contamination study, four (4) high positive samples and four (4) negative samples were tested by alternating sample preparation between positive and negative samples for each run. A total of ten (10) runs were performed with the Revogene Carba C assay by two (2) operators on one (1) Revogene.

No carry-over or cross-contamination of *bla_{KPC}* was observed.

REPRODUCIBILITY AND PRECISION

A study was conducted to assess the reproducibility and precision of the Revogene Carba C assay, including the between-laboratory reproducibility, the between-lot reproducibility and the within-laboratory precision study.

Between-laboratory reproducibility study was performed on three (3) sites, by two (2) operators per site, over five (5) distinct days using one (1) Revogene Carba C kit lot. A total of 120 replicates for each of the ten (10) positive bacterial carbapenem-non-susceptible strains, each one harboring one (1) resistance gene targeted by the Revogene Carba C assay (n=2 strains per resistance gene), were tested. A total of 240 replicates of the negative bacterial carbapenem-non-susceptible strain that does not carry any of the resistance genes targeted by the assay were tested.

Between-lot reproducibility study was performed on one (1) site, by two (2) operators, over 15 days using three (3) Revogene Carba C kit lots (5 days per kit lot). A total of 120 replicates for each of the ten (10) positive bacterial carbapenem-non-susceptible strains, each one harboring one (1) resistance gene targeted by the Revogene Carba C assay (n=2 strains per resistance gene), were tested. A total of 240 replicates of the negative bacterial carbapenem-non-susceptible strain that does not carry any of the resistance genes targeted by the assay were tested.

The within-laboratory precision was established with data obtained with kit lot #1 tested by two (2) operators exclusively on site #1 over a total of five (5) days. A total of 40 replicates for each of the ten (10) positive bacterial carbapenem-non-susceptible strains, each one harboring one (1) resistance gene targeted by the Revogene Carba C assay (n=2 strains per resistance gene), were considered for the analysis. A total of 80 replicates of the negative bacterial carbapenem-non-susceptible strain that does not carry any of the resistance genes targeted by the assay were also considered.

All strains were tested from standardized 0.5 McFarland (McF) suspensions.

For the between-laboratory reproducibility, the overall percent agreement was 100% (120/120) for each positive strain and was 98.8% (237/240) for the negative strain (**Table 9**). For the between-lot reproducibility, the overall percent agreement was 100% (120/120) for each positive strain and was 99.6% (239/240) for the negative strain (**Table 10**). Mean Cycle Threshold (Ct) values with variance components of Standard Deviation (SD) and Coefficient of Variation (CV) are also shown in **Tables 9 and 10**.

For the within-laboratory precision, the percent agreement was 100% (40/40) for each positive strain, and was 100% (80/80) for the negative strain (**Table 11**).

Table 9. Between-Laboratory Reproducibility Study Results Using One (1) Revogene Carba C Assay Kit Lot

Species	Resistance Gene and Variant	Site 1		Site 2		Site 3		Overall Results/Total	Overall Percent Agreement ¹	Overall 95% CI	Ct Values ²		
		Results/Total	Percent Agreement	Results/Total	Percent Agreement	Results/Total	Percent Agreement				Overall Mean	SD	CV%
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	29.7	1.6	5.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	29.6	1.3	4.3
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	30.5	2.1	7.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	30.4	2.2	7.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	30.3	1.0	3.1
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	30.2	1.5	4.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	28.5	1.4	4.8
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	30.5	1.9	6.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	27.6	1.0	3.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	28.5	1.2	4.3
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negative	80/80	100%	79/80	98.8%	78/80	97.5%	237/240	98.8%	96.4%-99.6%	34.9	1.9	5.5

¹ For the negative strain, percent agreement was calculated from the negative results.² For resistance genes and variants, Ct values reported are for the specified gene. For the negative strain, Ct values reported are for the PrC.

Table 10. Between-Lot Reproducibility Study Results on One (1) Site Using Three (3) Revogene Carba C Assay Kit Lots

Species	Resistance Gene and Variant	Lot 1		Lot 2		Lot 3		Overall Results/Total	Overall Percent Agreement ¹	Overall 95% CI	Ct Values ²		
		Results/Total	Percent Agreement	Results/Total	Percent Agreement	Results/Total	Percent Agreement				Overall Mean	SD	CV%
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	29.0	1.1	3.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	29.2	1.4	4.7
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	29.6	2.2	7.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	30.8	2.3	7.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	29.5	1.4	4.8
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	28.9	1.5	5.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	28.2	1.5	5.2
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	28.6	1.6	5.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	27.5	1.0	3.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96.9%-100.0%	28.1	1.4	4.8
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negative	80/80	100%	79/80	98.8%	80/80	100%	239/240	99.6%	97.7%-99.9%	33.0	2.9	8.8

¹ For the negative strain, percent agreement was calculated from the negative results.² For resistance genes and variants, Ct values reported are for the specified gene. For the negative strain, Ct values reported are for the PrC.

Table 11. Within-Laboratory Precision Study Results on One (1) Site Using One (1) Revogene Carba C Assay Kit Lot

Species	Resistance Gene and Variant	Overall Percent Agreement ¹	Overall 95% CI
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100% (40/40)	91.2%-100.0%
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negative	100% (80/80)	95.4%-100.0%

¹ For the negative strain, percent agreement was calculated from the negative results.**E-LABELING**Documentation related to this product can be accessed online at www.meridianbioscience.com/pi. Additionally, paper copies are available upon request by contacting your local distributor or via the phone number listed on the kit box.

revogene[®]

Carba C

Per l'uso con il Revogene®

REF 410500

IVD Per l'uso diagnostic *in vitro*



Rx Only

USO PREVISTO

La procedura analitica Carba C Revogene®, eseguita sul Revogene è un test diagnostico *in vitro* qualitativo ideato per l'identificazione e la differenziazione delle sequenze di geni *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{simile a OXA-48}* e *bla_{IMP}* associate a colonie pure non suscettibili ai carbapenemi di *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa*, se cresciute su agar sanguine o agar MacConkey. Questo test utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) in tempo reale automatizzata.

La procedura analitica Carba C Revogene deve essere utilizzata insieme ad altri test di laboratorio, fra cui il test di suscettibilità antimicrobica fenotipico. I risultati negativi di una procedura analitica Carba C Revogene non precludono la presenza di altri meccanismi di resistenza.

La procedura analitica Carba C Revogene è indicata come ausilio per il controllo di infezioni nell'identificazione di batteri non suscettibili ai carbapenemi che colonizzano pazienti in ambienti di assistenza sanitaria. L'identificazione di un gene *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* o *bla_{VIM}* metallo-β-lattamasi (ovvero, i geni che codificano rispettivamente IMP, NDM e VIM metallo-β-lattamasi) può essere impiegata come ausilio per i medici specialisti nel determinare le strategie terapeutiche adeguate per pazienti con infezioni note o sospette non suscettibili ai carbapenemi.

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

La resistenza ai carbapenemi può essere dovuta a diversi meccanismi e uno di loro è la produzione di carbapenemasi. Le carbapenemasi sono enzimi eterogenei capaci di idrolizzare gli antibiotici carbapenemici.¹ I geni che codificano le carbapenemasi si trovano soprattutto su elementi mobili, come i plasmidi, facilitando quindi la loro disseminazione tra specie batteriche diverse. I plasmidi che trasportano i geni codificanti le carbapenemasi delle classi A (KPC), B (IMP, NDM, VIM) e D (simile a OXA-48) si sono diffusi oltre gli istituti di assistenza sanitaria, causando gravi infezioni acquisite nella comunità.² I batteri che ospitano questi geni plasmidici spesso vengono chiamati organismi produttori di carbapenemasi (CPO) oppure organismi resistenti ai carbapenemi (CRO).

I bacilli *Enterobacteriaceae* Gram-negativi fanno parte della normale flora intestinale e vengono segnalati come ospiti di geni di carbapenemasi. Gli *Enterobacteriaceae* che non sono suscettibili agli antibiotici carbapenemici tramite la produzione di carbapenemasi sono noti come *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi (CPE). I CPE possono causare infezioni in quasi ogni parte del corpo, incluse infezioni del tratto urinario e del flusso sanguigno, polmonite associata al ventilatore e accessi intradomestici.³ Il trattamento delle infezioni dovute a questi organismi è estremamente difficile a causa della loro resistenza multifarmaco e quindi risulta in elevati tassi di mortalità.⁴

Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter baumannii* sono due (2) importanti patogeni opportunisti del gruppo di bacilli Gram-negativi non fermentativi. Poiché la resistenza antibiotica intrinseca verso molteplici classi di antibiotici è comune con questi organismi, i carbapenemni vengono usati spesso per il trattamento.⁵ Anche i bacilli Gram-negativi non fermentativi stanno diventando sempre più resistenti agli antibiotici carbapenemici, lasciando poche opzioni terapeutiche. I batteri Gram-negativi non fermentativi che non sono suscettibili ai carbapenemni tramite la produzione di carbapenemasi sono noti come agenti non fermentativi produttori di carbapenemasi (CP-NF). I CP-NF possono essere ottenuti da tutte le parti del corpo ma sono associati più comunemente alle polmoniti correlate ad assistenza sanitaria.⁶

L'identificazione e l'isolamento precoci di pazienti colonizzati o infettati sono misure di controllo delle infezioni fondamentali per limitare la diffusione di questi organismi in ambienti di assistenza sanitaria e facilitare una migliore direzione del trattamento.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

La procedura analitica Carba C Revogene può fornire risultati da uno (1) fino a otto (8) campioni in circa 70 minuti utilizzando colonie caratterizzate isolate non suscettibili ai carbapenemni di *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa*. Questa procedura analitica riduce al minimo l'intervento dell'operatore dal caricamento del campione nella cartuccia microfluidica monouso (PIE) al risultato finale.

Il test viene eseguito utilizzando il Revogene, che automatizza l'omogeneizzazione e la diluizione dei campioni, nonché la lisì delle cellule, l'amplificazione del DNA e l'identificazione dei prodotti PCR amplificati. L'intervento dell'utente è richiesto solo per la preparazione di una sospensione batterica standardizzata da colonie caratterizzate isolate non suscettibili ai carbapenemni, l'inoculazione del campione nella Sample Buffer Tube (SBT), il trasferimento del campione dall'SBT nella PIE e l'inserimento delle PIE nel carrello del Revogene.

Ogni PIE è un dispositivo chiuso e completamente integrato in cui un campione viene distribuito e trattato attraverso vari canali e camere microfluidici, che consentono il trattamento del campione (ovvero omogeneizzazione e diluizione del campione, lisì delle cellule ed estrazione di DNA), e successive fasi di PCR in tempo reale (**Figura 1**). Il liquido di un singolo campione viene trasferito tramite centrifugazione da una (1) camera alla successiva, in sequenza, e tutti i reagenti specifici per la reazione PCR vengono incorporati ed essiccati all'interno dei pozetti PCR. In ogni PIE è incorporato un controllo di processo (PrC) per verificare le fasi di trattamento del campione e amplificazione, inclusa la verifica di potenziali sostanze inibitorie, oltre del guasto di elementi microfluidici, di strumenti o di reagenti. I prodotti amplificati vengono identificati in tempo reale tramite sonde basate sulla chimica TaqMan® con target specifico.

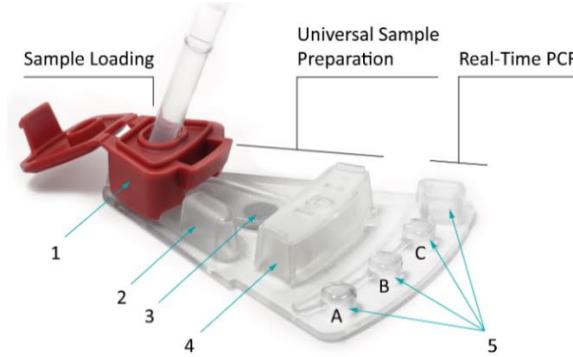


Figura 1. Vista superiore di una PIE.
1. Camera di caricamento del campione, 2. Camera di troppo pieno, 3. Camera di omogeneizzazione contenente PrC, 4. Camera di diluizione/lisi, 5. Tre (3) pozetti PCR (da A a C da sinistra a destra) e una (1) camera delle scorie (sull'estremità destra).

Il Revogene è in grado di trattare da uno (1) fino a otto (8) campioni simultaneamente durante la stessa analisi. Il carrello deve contenere otto (8) PIE per mantenere l'equilibrio termodinamico durante l'intero ciclo. Al termine di un'analisi, i risultati vengono calcolati dal sistema in base ai segnali fluorescenti misurati e agli algoritmi di calcolo incorporati. I risultati vengono visualizzati sul touchscreen e possono essere stampati, trasferiti e/o archiviati dall'utente impiegando la porta USB o l'opzione di connettività.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Il kit Carba C Revogene contiene una quantità sufficiente di reagenti e materiali per il trattamento di 24 campioni. Il kit contiene i seguenti materiali:

1. 24 Disposable Transfer Tool (DTT): pipetta in plastica con contrassegni di volume minimo e massimo per il trasferimento del campione dall'SBT alla PIE.
2. 24 Sample Buffer Tube (SBT) Carba C: provetta contenente soluzione tamponata Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na₂ (TE 1X) come tampone di diluizione e conservazione per il campione.
3. 24 buste singole contenenti una (1) cartuccia microfluidica Carba C (PIE): dispositivo integrato composto da reagenti essiccati per consentire il trattamento del campione e le fasi PCR in tempo reale per l'amplificazione e l'identificazione di sequenze di geni *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{simile a OXA-48}* e *bla_{IMP}*. Ogni PIE contiene PrC, primer specifici per il PrC e sonda, primer specifici per geni *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{simile a OXA-48}* e *bla_{IMP}* e sonde, dNTP, tampone e polimerasi di DNA.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Revogene® (n. cat. 610210)
2. Guanti senza polvere monouso
3. Tamponi sterili monouso
4. Soluzione fisiologica (consigliato NaCl dallo 0,45% allo 0,9%)
5. Piatre di agar sanguine o agar MacConkey
6. Dischetti di meropenem da 10 µg (dischetti di test di suscettibilità antimicrobica BD BBL™ Sensi-Disc™, n. cat. 231704 o prodotto equivalente)
7. Mixer Vortex con velocità massima di almeno 3200 giri/min (VWR n. cat. 58816-121 o prodotto equivalente)
8. Densitometro (VWR n. cat. 89402-910 o prodotto equivalente) o scheda con sfondo bianco e righe nere contrastanti (consigliata scheda Wickerham per lettura della torbidità, 2x3 pollici, righe nere; n. cat. Z08 o prodotto equivalente)
9. Micropipetta calibrata (consigliata P20, VWR n. cat. 89079-964 o prodotto equivalente)
10. Puntali per micropipetta resistenti all'aerosol, privi di DNase/RNase (consigliati puntali di lunghezza estesa; Sarstedt n. cat. 70.1189.215 o prodotto equivalente)
11. Supporto per campioni (n. cat. 132539; opzionale)
12. MOCK PIE (n. cat. 610208; opzionali)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. La procedura analitica Carba C Revogene può essere utilizzata solo nel Revogene.
2. Non utilizzare il kit se alla consegna l'etichetta che sigilla la confezione esterna non è integra.
3. Non utilizzare le PIE se alla consegna le buste protettive sono aperte o non integre.
4. Non abbinare DTT, SBT e PIE provenienti da diversi lotti di kit.
5. Ogni PIE e DTT monouso vengono utilizzati per il trattamento di un (1) campione. Non riutilizzare PIE e DTT.
6. Maneggiare i campioni sempre come se fossero contagiosi e conformemente alle Buone pratiche di laboratorio, come quelle descritte nella biosicurezza di laboratori biomedici e microbiologici⁷ e nel documento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M29-A4⁸.
7. Indossare guanti senza polvere monouso quando si maneggiano i campioni e lavarsi le mani accuratamente dopo la manipolazione.
8. La PIE contiene reagenti essiccati. La busta protettiva non deve essere aperta finché non si è pronti a eseguire il test.
9. Smaltire i reagenti inutilizzati e i rifiuti conformemente alle normative nazionali, federali, provinciali, statali e locali.
10. Non aprire o disgregare la PIE dopo l'uso. Il tappo e i sigilli della PIE impediscono la contaminazione con prodotti di amplificazione e/o particelle contagiose.
11. Non utilizzare una PIE che sia stata fatta cadere, agitata o capovolta dopo il caricamento del campione, poiché ciò potrebbe dare risultati non validi.
12. Non usare kit oltre la data di scadenza indicata.
13. Non refrigerare la PIE caricata.
14. Ogni analisi deve essere eseguita con otto (8) PIE nel carosello del Revogene per mantenere l'equilibrio termodinamico e meccanico durante l'analisi. Posizionare le MOCK PIE o le PIE per la procedura analitica caricate con il Sample Buffer in ubicazioni vuote se vengono testati meno di otto (8) campioni.
15. Le norme e i regolamenti federali, statali e locali per la notifica di malattie che devono essere denunciate vengono aggiornati continuamente e descrivono in dettaglio una grande quantità di organismi che sono importanti per la sorveglianza e le indagini di epidemie.^{9,10} I laboratori sono responsabili dell'osservanza delle loro norme statali e/o locali relative a patogeni denunciabili e devono consultare i laboratori di sanità pubblica statali e/o locali per le linee guida relative alla consegna di campioni clinici e/o isolati.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Conservare il kit Carba C Revogene a 2-25 C. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit.
2. Non aprire una busta finché non si è pronti a eseguire il test. Usare la PIE entro una (1) ora dall'apertura della busta.
3. L'SBT inoculata può essere conservata a 25 C per un massimo di quattro (4) giorni o a 2-8 C per un massimo di sette (7) giorni.

ISTRUZIONI PER L'USO

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

1. Gli organismi devono essere identificati come *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* e deve essere determinato lo stato di non suscettibilità ai carbapenemi conformemente all'inserto della confezione del dispositivo antibiotico o all'ultima versione degli Standard M100 CLSI¹¹ prima di eseguire il test con la procedura analitica Carba C Revogene.
2. Inoculare l'organismo su una piastra di agar sangue o agar MacConkey, striare per l'isolamento e posizionare un dischetto di meropenem da 10 µg nel primo quadrante per garantire che l'isolato mantenga la sua mancanza di suscettibilità ai carbapenemi.
3. Incubare la piastra a 35 C per 18-24 ore in condizioni aerobiche.
4. Preparare una sospensione McFarland 0,5 standardizzata in soluzione fisiologica raccogliendo colonie isolate non suscettibili ai carbapenemi selezionate dalle piastre di agar incubate vicino al dischetto di meropenem utilizzando un tampone sterile.
5. Regolare la sospensione per ottenere una turbidità equivalente a uno standard McFarland 0,5. Utilizzare un dispositivo fotometrico o, se eseguito visivamente, una luce adeguata per confrontare la sospensione e lo standard McFarland 0,5 contro una scheda con sfondo bianco e righe nere contrastanti. Ciò risulta in una sospensione contenente circa da 1 a 2×10^5 unità formanti colonie (CFU)/mL.

PREPARAZIONE DELL'SBT

1. Per ogni campione da analizzare, estrarre una (1) SBT dalla confezione del kit.
2. Identificare (o etichettare) l'SBT con l'identificazione appropriata del campione senza nascondere o scrivere sul codice a barre. Collocare l'SBT nel supporto per campioni Revogene, se utilizzato.
3. Trattare la sospensione McFarland 0,5 con il mixer Vortex a velocità massima per 15 secondi.
4. Aspirare con una micropipetta 15 µL della sospensione McFarland 0,5 standardizzata.
5. Rimuovere il tappo dall'SBT e distribuire l'aliquota McFarland nell'SBT, facendo attenzione a non produrre aerosoli. Pipettare il liquido su e giù per garantire il completo trasferimento dell'aliquota. Assicurarsi che sia aperta solo una (1) SBT alla volta.
6. Riposizionare il tappo sull'SBT, chiudere saldamente e ricollocare l'SBT nel supporto per campioni (se utilizzato).
7. Preparare eventuali campioni aggiuntivi per il test ripetendo le fasi da 1 a 6.
8. Quando tutti i campioni sono stati trattati, passare alla fase 9 (Preparazione della PIE).

PREPARAZIONE DELLA PIE

NOTA: trattare un (1) campione alla volta.

9. Miscelare l'SBT per un minimo di 15 secondi a velocità massima (≥ 3200 giri/min) utilizzando un mixer Vortex.
10. Aprire la busta della PIE ed estrarre la PIE. Una volta tolto il sigillo, la PIE deve essere utilizzata entro una (1) ora.
11. Estrarre un DTT dalla confezione del kit e aspirare l'SB (Sample Buffer) inoculato comprendendo l'intero bulbo. Il livello del liquido nel DTT deve trovarsi in un punto qualsiasi tra i due contrassegni (Figura 2). Se il livello del liquido non si trova tra i due contrassegni, rilasciare il volume dell'SB completamente nell'SBT e ripetere questa fase.
12. Rilasciare completamente il volume dell'SB contenuto nel DTT nella camera di caricamento del campione della PIE (Figura 1). Assicurarsi di non toccare i bordi esterni o la parte inferiore della camera di caricamento del campione con il DTT.
13. Chiudere saldamente il tappo della PIE. Collegare la PIE nel supporto per campioni, se utilizzato. Non refrigerare la PIE caricata.
14. Preparare tutti i campioni aggiuntivi per il test ripetendo le fasi da 9 a 13, quindi passare alla fase 1 della sezione FUNZIONAMENTO DEL SISTEMA REVOGENE.

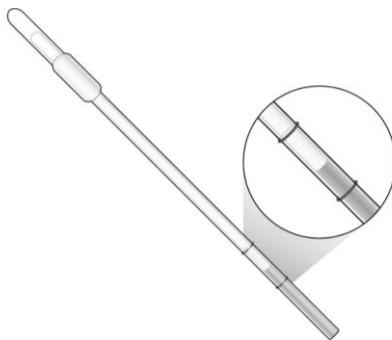


Figura 2.
Rappresentazione di un livello di Sample Buffer (SB) appropriato con il Disposable Transfer Tool (DTT).

FUNZIONAMENTO DEL SISTEMA REVOGENE

NOTA 1: ogni analisi deve essere eseguita con otto (8) PIE nel Revogene. Quando vengono trattati meno di otto (8) campioni, riempire i posti vuoti con MOCK PIE*

NOTA 2: consultare il Manuale dell'operatore¹² del Revogene per ulteriori informazioni riguardanti l'impostazione e il funzionamento del Revogene.

1. Accendere il Revogene (se non è già stato fatto). Il software verrà lanciato automaticamente.
2. Accedere immettendo il <nome utente> e <password> e toccare <Accesso>. Il menu principale comparirà automaticamente.
3. Toccare <Configura ciclo>.
4. Immettere il numero di identificazione del campione utilizzando lo scanner dei codici a barre o immettendolo manualmente. L'immissione manuale può essere eseguita toccando l'icona lapis della riga <Esegui scansione o immetti ID campione>.
5. Immettere i codici a barre dell'SBT e della PIE con lo scanner dei codici a barre posizionando con cautela la PIE quasi verticalmente davanti allo scanner. Oppure, i codici a barre dell'SBT e della PIE possono essere immessi manualmente (toccare l'Icona lapis delle loro rispettive righe). Maneggiare la PIE con cura, senza agitarla e senza farla cadere.
6. (Opzionale) Toccare l'Icona lapis della riga <Aggiungi commenti> e digitare un commento.
7. Inserire la PIE nel Revogene, in una posizione qualsiasi del carosello. Il software associa automaticamente il campione e l'SBT alla PIE corretta.
8. Confermare che la PIE sia inserita toccando <OK> sulla riga <Inserisci la PIE nello strumento> e ripetere le fasi da 4 a 8 per tutti i campioni. Se vengono testate meno di otto (8) PIE, caricare MOCK PIE* nelle posizioni restanti del carosello. Non è richiesta alcuna scansione durante l'inserimento di MOCK PIE nel Revogene.
9. Quando tutte le PIE sono state inserite nel carosello toccare <Avanti>.
10. Se sono state inserite MOCK PIE nel carosello, seguire le istruzioni sullo schermo.
11. Eseguire la scansione dell'anello di ritenuta e collocarlo sul carosello. Chiudere il coperchio dello strumento.
12. Iniziare l'esecuzione del test toccando <Avvio>.
13. Conservare l'SBT inoculata in condizioni appropriate (consultare la sezione CONSERVAZIONE E STABILITÀ) per ripetere il test ulteriormente, se necessario.

*Se MOCK PIE non sono disponibili, utilizzare nuove PIE per la procedura analitica riempite con SB (VUOTO).

VISUALIZZAZIONE ED ESPORTAZIONE DEI RISULTATI

- Una volta completata l'analisi, il coperchio si apre automaticamente.
- Se il Revogene si è disconnesso, immettere nuovamente il <nome utente> e la <password> e toccare <Accesso>. Il menu principale comparirà automaticamente.
- Toccare l'icona Risultati per accedere ai risultati del test. La finestra Risultati indica i risultati riportati per ogni campione (**Figura 3**).



Figura 3.
La finestra Risultati indica i risultati riportati per ogni campione.

- Toccare <Ultimo ciclo> per vedere i risultati del test più recente.
- Toccare <Resoconti> per vedere il risultato target specifico per ogni campione. Consultare la sezione INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI per confermare se deve essere intrapresa un'azione aggiuntiva secondo i risultati target ottenuti.
NOTA: in caso di un test ripetuto di un campione, tutti i risultati positivi dei test sia iniziale che ripetuto devono essere segnalati, persino se vi è una discrepanza tra i risultati per lo stesso target.
- Da <Ultimo ciclo> selezionare i campioni per i quali si devono esportare i resoconti dei risultati. Tutti i campioni possono essere selezionati contemporaneamente contrassegnando la casella sull'angolo superiore sinistro dello schermo.
- Toccare <Esporta> e salvare ove appropriato (per es., su chiavetta USB).
- (Ozionale) Toccare <Cerca> per trovare un campione specifico e i relativi risultati.
- Rimuovere l'anello di ritenuta e le PIE dal Revogene. Le PIE utilizzate devono essere smaltite nei contenitori per rifiuti appropriati, conformemente alle prassi standard del proprio istituto.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Le procedure del controllo di qualità monitorano l'accuratezza e la precisione del processo analitico. Ogni laboratorio deve stabilire la quantità, il tipo e la frequenza dei materiali di controllo per i test in base alle normative applicabili o alle direttive degli enti di accreditamento. La procedura descritta di seguito può essere utilizzata, se pertinente, in base alle politiche e alle procedure locali.

CONTROLLO DI PROCESSO

Ogni PIE contiene un Controllo di processo (PrC) che verifica l'omogeneizzazione e la diluizione dei campioni, nonché la lisi delle cellule, l'inibizione dell'amplificazione del DNA e l'insuccesso dei reagenti della procedura analitica.

CONTROLLI ESTERNI

NOTA: per ogni controllo esterno devono essere utilizzati DTT, SBT e PIE separati.

- La buona pratica di laboratorio consiglia l'utilizzo di materiali di controllo. L'utente deve attenersi alle linee guida appropriate che riguardano l'esecuzione di controlli esterni. Si consiglia l'esecuzione di un (1) controllo esterno positivo e di un (1) controllo esterno negativo almeno quotidianamente, finché non viene raggiunta un'adeguata convallida del processo con la procedura analitica Carba C Revogene in ogni ambiente di laboratorio.
- I materiali di controllo esterno non sono forniti da Meridian Bioscience, Inc. I controlli esterni non vengono utilizzati dal software del Revogene per l'interpretazione dei risultati dei test dei campioni. I controlli esterni vengono trattati come fossero campioni.

Cinque (5) diversi controlli esterni positivi e un (1) controllo esterno negativo sono consigliati ed elencati di seguito.

Controlli esterni positivi

Una sospensione McFarland 0,5 standardizzata di colonie isolate da ceppi disponibili in commercio non suscettibili ai carbapenemi caratterizzati, diluiti in soluzione fisiologica, è consigliata come controllo esterno positivo. I ceppi consigliati sono:

- *K. pneumoniae bla_{KPC-2}* (CCUG 59348)
- *K. pneumoniae bla_{NDM-1}* (ATCC® BAA-2146™)
- *K. pneumoniae bla_{VIM-1}* (NCTC 13440)
- *E. coli bla_{OXA-48}* (ATCC® BAA-2523™)
- *E. coli bla_{IMP-1}* (NCTC 13476)

Ognuno dei cinque (5) controlli esterni positivi consigliati può essere testato alternatamente.

Controllo esterno negativo

Una sospensione McFarland 0,5 standardizzata in soluzione fisiologica di colonie isolate da un ceppo non suscettibile ai carbapenemi rappresentativo di *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* o *P. aeruginosa* che non trasporta alcuno dei geni di resistenza presi di mira dalla procedura analitica Carba C Revogene è consigliata come controllo esterno negativo.

PREPARAZIONE DEI CONTROLLI ESTERNI

- Inoculare l'organismo su una piastra di agar sangue o agar MacConkey, striare per l'isolamento e posizionare un disco di meropenem da 10 µg nel primo quadrante per garantire che l'isolato mantenga la sua mancanza di suscettibilità ai carbapenemi.
- Incubare la piastra a 35 °C per 18-24 ore in condizioni aerobiche.
- Preparare una sospensione McFarland 0,5 standardizzata in soluzione fisiologica raccogliendo colonie isolate selezionate dalla piastra di agar incubata vicino al dispositivo di meropenem utilizzando un tamponcino sterile.
- Regolare la sospensione per ottenerne una turbidità equivalente a uno standard McFarland 0,5. Utilizzare un dispositivo fotometrico o, se eseguito visivamente, una luce adeguata per confrontare la sospensione e lo standard McFarland 0,5 contro una scheda con sfondo bianco e righe nere contrastanti. Ciò risulta in una sospensione contenente circa da 1 a 2 x 10⁶ unità formanti colonie (CFU)/mL.

Trattare e testare le sospensioni di controllo esterno secondo le sezioni PREPARAZIONE DELL'SBT/PREPARAZIONE DELLA PIE, quindi attenersi alla sezione FUNZIONAMENTO DEL SISTEMA REVOGENE.

PROCEDURA DI RIPETIZIONE DEL TEST

RISULTATO INDETERMINATO O IRRISOLTO

Quando viene ottenuto un risultato target irrisolto (UNR) o indeterminato (IND) per un campione, deve essere ripetuto il test con l'SBT inoculata corrispondente entro il periodo di tempo specificato descritto nella sezione CONSERVAZIONE E STABILITÀ.

Utilizzare l'SBT inoculata corrispondente originale per caricare una nuova PIE dello stesso lotto di kit e smaltire l'SBT non utilizzata. Attenersi alle fasi da 9 a 13 della sezione PREPARAZIONE DELLA PIE per ogni campione e poi alla sezione FUNZIONAMENTO DEL SISTEMA REVOGENE. Se necessario, può essere inoculata una nuova SBT da una nuova sospensione McFarland 0,5 standardizzata.

Risultati indeterminati o irrisolti per un controllo esterno

Quando un risultato target irrisolto (UNR) o indeterminato (IND) viene ottenuto per un controllo esterno, l'analisi deve essere considerata non valida. È necessario ripetere dall'SBT inoculata corrispondente il test di controlli esterni negativi e positivi, nonché dei campioni inclusi nella stessa analisi. Tutta l'SBT inoculata deve essere testata entro il periodo di tempo specificato descritto nella sezione CONSERVAZIONE E STABILITÀ.

Utilizzare l'SBT inoculata corrispondente per caricare una nuova PIE dello stesso lotto di kit. Attenersi alla sezione PREPARAZIONE DELLA PIE a partire dalla fase 9, quindi seguire la sezione FUNZIONAMENTO DEL SISTEMA REVOGENE.

Risultato imprevisto negativo o imprevisto positivo per un controllo esterno

Quando viene ottenuto un risultato target imprevisto negativo o imprevisto positivo per un controllo esterno, l'analisi deve essere considerata non valida. È necessario ripetere il test di controlli esterni negativi e positivi con un nuovo set di controlli esterni, come descritto nella sezione CONTROLLO DI QUALITÀ. Rivedere le tecniche di manipolazione e preparazione.

Inoltre, è necessario ripetere il test per tutti i campioni inclusi nell'analisi utilizzando l'SBT inoculata corrispondente originale entro il periodo di tempo definito nella sezione CONSERVAZIONE E STABILITÀ con un nuovo set di controlli esterni. Consultare la sezione CONTROLLO DI QUALITÀ per la preparazione di un nuovo set di controlli esterni.

Utilizzare l'SBT inoculata corrispondente per caricare una nuova PIE dello stesso lotto di kit. Attenersi alla sezione PREPARAZIONE DELLA PIE a partire dalla fase 9, quindi seguire la sezione FUNZIONAMENTO DEL SISTEMA REVOGENE.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati vengono calcolati dal Revogene in base ai segnali fluorescenti misurati e agli algoritmi di calcolo incorporati e sono disponibili nella finestra "Risultati". I possibili risultati ottenuti sono elencati di seguito.

Type di campione	Simboli visualizzati sulla schermata utente	Risultati ottenuti	Interpretazione	Fase aggiuntiva
Colonia isolata		Positivi	DNA target KPC, NDM, VIM, simile a OXA-48 e IMP identificato.	Nessuna fase aggiuntiva necessaria.
		Negativi	DNA target KPC, NDM, VIM, simile a OXA-48 e IMP non identificato.	Nessuna fase aggiuntiva necessaria.
		Positivi/Negativi	DNA target KPC e/o NDM e/o VIM e/o simile a OXA-48 e/o IMP identificato Se DNA target KPC e/o NDM e/o VIM e/o simile a OXA-48 e/o IMP non identificato.	Nessuna fase aggiuntiva necessaria.
		Irrisolti	Guasto nell'amplificazione/identificazione per il controllo di processo. Ciò potrebbe essere causato da campioni inibitori o guasto dei reagenti o degli elementi microfluidici.	Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione PROCEDURA DI RIPETIZIONE DEL TEST).
		Positivi/Irrisolti	DNA target KPC e/o NDM e/o VIM e/o simile a OXA-48 e/o IMP identificato Guasto nell'amplificazione/identificazione per il controllo di processo. Ciò potrebbe essere causato da campioni inibitori o guasto dei reagenti o degli elementi microfluidici.	Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione PROCEDURA DI RIPETIZIONE DEL TEST). Tutti i risultati Positivi iniziali devono essere considerati come Positivi anche se il test ripetuto segnala un risultato diverso per tali target.
		Indeterminati	Nessun risultato da segnalare a causa di un possibile errore di identificazione del Revogene durante la procedura analitica o l'analisi dei dati o se il ciclo viene interrotto.	Il test deve essere ripetuto (consultare la sezione PROCEDURA DI RIPETIZIONE DEL TEST).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- La procedura analitica Carba C Revogene identifica le sequenze di geni *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{simile a OXA-48} e *bla*_{IMP} e non riguarda l'identificazione batterica.
- Le prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene con batteri diversi da *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* non sono state valutate. Gli organismi devono essere identificati e lo stato di non suscettibilità ai carbapenemi deve essere determinato prima di eseguire il test con la procedura analitica Carba C Revogene.
- Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* mostrano una resistenza intrinseca all'ertapenem. La determinazione della suscettibilità ai carbapenemi di queste specie e l'applicabilità della procedura analitica Carba C Revogene devono essere basate su test con meropenem, imipenem e/o doripenem.
- La procedura analitica Carba C Revogene non è uno strumento per sottotipi e non segnala varianti dei geni *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{simile a OXA-48} e *bla*_{IMP}.
- La procedura analitica Carba C Revogene deve essere utilizzata solo con il Revogene da personale addestrato.
- Solo le PIE Carba C Revogene possono essere utilizzate in un singolo ciclo. Le PIE di altre procedure analitiche Revogene non sono compatibili con la procedura analitica Carba C Revogene e non devono essere utilizzate.
- I risultati con la procedura analitica Carba C Revogene devono essere utilizzati in aggiunta alle osservazioni cliniche e ad altre informazioni disponibili per il medico.
- Risultati di test errati possono verificarsi a causa della preparazione, manipolazione o conservazione sbagliata di una coltura, di un errore tecnico o di uno scambio di campioni. Per evitare risultati errati è necessario osservare attentamente le istruzioni in questo inserto, il Manuale dell'operator del Revogene e le linee guida stabilite.
- La contaminazione o risultati imprevisti positivi possono verificarsi se il tappo di una PIE viene chiuso in modo sbagliato o se una gocciosina viene fatta cadere sui bordi della camera di caricamento del campione.
- Una conservazione più lunga del periodo di tempo indicato nella sezione CONSERVAZIONE E STABILITÀ per i campioni dell'SBT può dare risultati imprevisti o non validi.
- Mutazioni o polimorfismi in sequenze di geni attuali, nuove o sconosciute *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{simile a OXA-48} e *bla*_{IMP} possono ripercuotersi sull'identificazione, dando risultati falsi negativi.
- Le previsioni *in silico* dell'inclusività dei primer e delle sonde Carba C Revogene sono state eseguite utilizzando dati di sequenza disponibili in GenBank nel 2018. L'analisi di nuove sequenze di varianti dei geni di carbapenemasi presi di mira e depositati in GenBank dopo il 2018 non è stata eseguita.
- Le prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene con geni di carbapenemasi non target, diversi da *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SM}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SPM}, non sono note.

VALORI PREVISTI

Un totale di 512 isolati batterici non suscettibili ai carbapenemasi è stato valutato durante lo studio clinico Carba C presso tre (3) centri negli Stati Uniti e in Canada. I risultati della procedura analitica Carba C Revogene per ogni target di geni in confronto al metodo di riferimento (un Test di amplificazione degli acidi nucleici [NAAT] commercializzato) sono riportati nelle Tabelle da 1 a 4.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene sono state stabilite in uno studio clinico condotto presso tre (3) centri negli Stati Uniti e in Canada.

Gli isolati batterici caratterizzati come *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* sono stati cresciuti su piastre sia di agar sangue che di agar MacConkey. Gli isolati *Enterobacteriaceae* erano intermedi o resistenti a doripenem, ertapenem, imipenem e/o meropenem secondo gli Standard CLSI M02¹³. Gli isolati *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* erano intermedi o resistenti a doripenem, imipenem e/o meropenem poiché sono intrinsecamente resistenti all'ertapenem. Le colonie isolate su agar sangue e agar MacConkey sono state diluite in soluzione fisiologica per ottenerne una sospensione equivalente allo standard McFarland 0,5 e testate con la procedura analitica Carba C Revogene. Il metodo di riferimento consisteva in un NAAT ad alte prestazioni approvato dall'FDA per l'identificazione dei geni di carbapenemasi presi di mira provenienti da colonie isolate di organismi noti non suscettibili ai carbapenemasi, le cui prestazioni sono state stabilite in confronto al sequenziamento PCR/bidirezionale e che è stato usato secondo le istruzioni del produttore.

La sensibilità e la specificità sono state calcolate confrontando i risultati della procedura analitica Carba C Revogene con il metodo di riferimento. È stata eseguita un'analisi incongruente su campioni con risultati discordanti tra la procedura analitica Carba C Revogene e il NAAT di riferimento utilizzando un metodo PCR alternativo per l'amplificazione e l'identificazione di geni *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{simile a OXA-48} e *bla*_{IMP} seguito dal sequenziamento bidirezionale del prodotto amplificato.

RISULTATI

Un totale di 532 isolati batterici (475 isolati di ceppi clinici e 57 isolati freschi raccolti prospettivamente) è stato testato durante lo studio clinico. Venti isolati sono stati esclusi dall'analisi di prestazioni perché appartenevano a specie non target, la loro identità non poteva essere confermata, mostravano una suscettibilità ai carbapenemasi, era presente un errore di laboratorio o non erano stati ottenuti risultati PCR validi. Quindi, un totale di 512 isolati batterici è stato utilizzato per stabilire le prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene in confronto al metodo di riferimento.

La sensibilità e la specificità della procedura analitica Carba C Revogene per l'identificazione di cinque (5) geni di carbapenemasi presi di mira provenienti da colonie cresciute su agar sangue e agar MacConkey sono mostrate rispettivamente nelle Tabelle 1 e 2.

Un totale di 24 isolati conteneva più di un gene di carbapenemasi, come determinato dalla procedura analitica Carba C Revogene. Il contenuto segnalato dei geni di carbapenemasi di 21 di questi isolati è stato confermato dal metodo di riferimento. Tuttavia, il metodo di riferimento ha identificato solo un gene di carbapenemasi negli altri tre (3) isolati.

I tassi iniziali non riferibili (una combinazione di tassi Irrisolti e Indeterminati), al livello dei mezzi, sono stati 1,7% (9/516) da agar sangue e 1,4% (7/516) da agar MacConkey. Al livello target, da agar sangue i tassi sono stati 1,7% (9/516) per i target dei geni *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{simile a OXA-48} e 1,6% (8/516) per il target del gene *bla*_{VIM}, con un tasso complessivo di 1,7% (9/516). Da agar MacConkey i tassi non riferibili sono stati 1,4% (7/516) per tutti i mezzi e target dei geni.

Le prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene per ogni gruppo di organismi per agar sangue e agar MacConkey sono indicate nelle Tabelle 3 e 4.

Tabella 1. Prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene su colonie isolate cresciute su agar sangue.

Target	N	VP	FP	VN	FN	Sensibilità (IC del 95%)	Specificità (IC del 95%)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98,9% (96,2 – 99,7)	99,4% (97,8 – 99,8)
KPC	512	113	3 ^b	395	1	99,1% (95,2 – 99,8)	99,2% (97,8 – 99,7)
Simile a OXA-48	512	65	3 ^c	444	0	100,0% (94,4 – 100,0)	99,3% (98,0 – 99,8)
IMP	512	27	19 ^d	466	0	100,0% (87,5 – 100,0)	96,1% (94,0 – 97,5)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100,0% (93,1 – 100,0)	99,8% (98,8 – 100,0)

N: Numero; VP: Vero Positivo; FP: Falso Positivo; VN: Vero Negativo; FN: Falso Negativo; IC: Intervallo di Confidenza

Nota: il test discordante consisteva in cinque (5) PCR alternative seguite da sequenziamento bidirezionale ed è stato eseguito per ogni risultato target discordante. I risultati del test discordante di 21/31 campioni concordavano con quelli della procedura analitica Carba C Revogene.

^a Uno (1) su due (2) era positivo all'NDM-1.

^b Due (2) su tre (3) erano positivi a KPC-3/KPC-38.

^c Uno (1) su tre (3) era positivo all'OXA-48. Le indagini suggerivano una contaminazione crociata con OXA-48 alla fase di preparazione dei campioni in uno (1) su tre (3) isolati. Il test discordante non ha prodotto una corrispondenza di sequenze con il target simile a OXA-48.

^d Diciassette (17) su 19 sono risultati positivi all'IMP, inclusa una (1) variante dell'IMP-4 (dall'Australia [2010]), 11 varianti IMP-13/IMP-37 (una (1) dall'Argentina [2006], una (1) dall'America del Nord [2014], nove (9) dall'Europa [2005-2015]), una (1) variante di IMP-27/IMP-64 (dal Canada [2017]), una (1) variante dell'IMP-15 (dall'Argentina [2004]), una (1) variante dell'IMP-16 (dal Brasile [2004]) e due (2) varianti dell'IMP-62 (dall'Argentina [2006]). L'analisi discordante ha indicato potenziali differenze di copertura delle varianti IMP tra la procedura analitica Carba C Revogene e il metodo di riferimento. Le indagini suggerivano una contaminazione crociata con IMP alla fase di preparazione dei campioni in due (2) su 19 isolati per cui il test discordante non ha prodotto una corrispondenza di sequenze con il target IMP.

^e Le indagini suggerivano una contaminazione crociata con VIM alla fase di preparazione dei campioni. Il test discordante non ha prodotto una corrispondenza di sequenze con il target VIM, ma ha prodotto una corrispondenza di sequenze per il target NDM.

^f Il test discordante ha prodotto una corrispondenza di sequenze con il target NDM-1 in uno (1) su due (2) isolati e ha prodotto una corrispondenza di sequenze per il target simile a OXA-48 in uno (1) su due (2) isolati. L'isolato positivo all'OXA-48 è stato classificato come FP.

Tabella 2. Prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene su colonie isolate cresciute su agar MacConkey.

Target	N	VP	FP	VN	FN	Sensibilità (IC del 95%)	Specificità (IC del 95%)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^b	98,9% (96,2 – 99,7)	99,4% (97,8 – 99,8)
KPC	512	114	3 ^b	395	0	100,0% (96,7 – 100,0)	99,2% (97,8 – 99,7)
Simile a OXA-48	512	65	2 ^c	445	0	100,0% (94,4 – 100,0)	99,6% (98,4 – 99,9)
IMP	512	27	21 ^d	464	0	100,0% (87,5 – 100,0)	95,7% (93,5 – 97,2)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100,0% (93,1 – 100,0)	99,8% (98,8 – 100,0)

N: Numero; VP: Vero Positivo; FP: Falso Positivo; VN: Vero Negativo; FN: Falso Negativo; IC: Intervallo di Confidenza

Nota: il test discordante consisteva in cinque (5) PCR alternative seguite da sequenziamento bidirezionale ed è stato eseguito per ogni risultato target discordante. I risultati del test discordante di 21/31 campioni concordavano con quelli della procedura analitica Carba C Revogene.

^a Uno (1) su due (2) era positivo all'NDM-1.^b Due (2) su tre (3) erano positivi a KPC-3/KPC-38.^c Uno (1) su due (2) era positivo all'OXA-48. Le indagini suggerivano una contaminazione crociata con OXA-48 alla fase di preparazione dei campioni in uno (1) su due (2) isolati. Il test discordante non ha prodotto una corrispondenza di sequenze con il target simile a OXA-48.^d Diciassette (17) su 21 sono risultati positivi all'IMP, inclusa una (1) variante dell'IMP-4 (dall'Australia [2010]), 11 varianti IMP-13/IMP-37 (una (1) dall'Argentina [2006], una (1) dall'America del Nord [2014], nove (9) dall'Europa [2005-2015]), una (1) variante di IMP-27/IMP-64 (dal Canada [2017]), una (1) variante dell'IMP-15 (dall'Argentina [2004]), una (1) variante dell'IMP-16 (dal Brasile [2004]) e due (2) varianti dell'IMP-62 (dall'Argentina [2006]). L'analisi discordante ha indicato potenziali differenze di copertura delle varianti IMP tra la procedura analitica Carba C Revogene e il metodo di riferimento. Le indagini suggerivano una contaminazione crociata con IMP alla fase di preparazione dei campioni in quattro (4) su 21 isolati per cui il test discordante non ha prodotto una corrispondenza di sequenze con il target IMP.^e Le indagini suggerivano una contaminazione crociata con VIM alla fase di preparazione dei campioni. Il test discordante non ha prodotto una corrispondenza di sequenze con il target VIM, ma ha prodotto una corrispondenza di sequenze per il target simile a OXA-48 in uno (1) su due (2) isolati. L'isolato positivo all'OXA-48 è stato classificato come FP.

Il test discordante ha prodotto una corrispondenza di sequenze con il target NDM-1 in uno (1) su due (2) isolati e ha prodotto una corrispondenza di sequenze per il target simile a OXA-48 in uno (1) su due (2) isolati. L'isolato positivo all'OXA-48 è stato classificato come FP.

Tabella 3. Prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene da parte della categoria di organismi e da parte del gene target per colonie isolate cresciute su agar sangue.

Mezzo	Organismi	Target	N	VP	FP	VN	FN	Sensibilità (IC del 95%)	Specificità (IC del 95%)
Agar sangue	Enterobacteriaceae	NDM	306	85	1	219	1	98,8% (93,7 – 99,8)	99,5% (97,5 – 99,9)
		KPC	306	112	3	190	1	99,1% (95,2 – 99,8)	98,4% (95,5 – 99,5)
		Simile a OXA-48	306	64	3	239	0	100,0% (94,3 – 100,0)	98,8% (96,4 – 99,6)
		IMP	306	14	5	287	0	100,0% (78,5 – 100,0)	98,3% (96,1 – 99,3)
		VIM	306	12	0	294	0	100,0% (75,8 – 100,0)	100,0% (98,7 – 100,0)
	Pseudomonas aeruginosa	NDM	107	26	1	80	0	100,0% (87,1 – 100,0)	98,8% (93,3 – 99,8)
		KPC	107	0	0	107	0	n.d.	100,0% (96,5 – 100,0)
		Simile a OXA-48	107	1	0	106	0	100,0% (20,7 – 100,0)	100,0% (96,5 – 100,0)
		IMP	107	5	14	88	0	100,0% (56,6 – 100,0)	86,3% (78,3 – 91,6)
		VIM	107	39	0	68	0	100,0% (91,0 – 100,0)	100,0% (94,7 – 100,0)
	Acinetobacter baumannii	NDM	99	75	0	23	1	98,7% (92,9 – 99,8)	100,0% (85,7 – 100,0)
		KPC	99	1	0	98	0	100,0% (20,7 – 100,0)	100,0% (96,2 – 100,0)
		Simile a OXA-48	99	0	0	99	0	n.d.	100,0% (96,3 – 100,0)
		IMP	99	8	0	91	0	100,0% (67,6 – 100,0)	100,0% (96,0 – 100,0)
		VIM	99	1	1	97	0	100,0% (20,7 – 100,0)	99,0% (94,4 – 99,8)

N: Numero; VP: Vero Positivo; FP: Falso Positivo; VN: Vero Negativo; FN: Falso Negativo; IC: Intervallo di Confidenza

Più di un (1) gene preso di mira è stato identificato per alcuni isolati.

Tabella 4. Prestazioni della procedura analitica Carba C Revogene da parte della categoria di organismi e da parte del gene target per colonie isolate cresciute su agar MacConkey.

Mezzo	Organismi	Target	N	VP	FP	VN	FN	Sensibilità (IC del 95%)	Specificità (IC del 95%)
Agar MacConkey	Enterobacteriaceae	NDM	306	85	1	219	1	98,8% (93,7 – 99,8)	99,5% (97,5 – 99,9)
		KPC	306	113	3	190	0	100,0% (96,7 – 100,0)	98,4% (95,5 – 99,5)
		Simile a OXA-48	306	64	2	240	0	100,0% (94,3 – 100,0)	99,2% (97,0 – 99,8)
		IMP	306	14	5	287	0	100,0% (78,5 – 100,0)	98,3% (96,1 – 99,3)
		VIM	306	12	1	293	0	100,0% (75,8 – 100,0)	99,7% (98,1 – 99,9)
	Pseudomonas aeruginosa	NDM	107	26	1	80	0	100,0% (87,1 – 100,0)	98,8% (93,3 – 99,8)
		KPC	107	0	0	107	0	n.d.	100,0% (96,5 – 100,0)
		Simile a OXA-48	107	1	0	106	0	100,0% (20,7 – 100,0)	100,0% (96,5 – 100,0)
		IMP	107	5	14	88	0	100,0% (56,6 – 100,0)	86,3% (78,3 – 91,6)
		VIM	107	39	0	68	0	100,0% (91,0 – 100,0)	100,0% (94,7 – 100,0)
	Acinetobacter baumannii	NDM	99	75	0	23	1	98,7% (92,9 – 99,8)	100,0% (85,7 – 100,0)
		KPC	99	1	0	98	0	100,0% (20,7 – 100,0)	100,0% (96,2 – 100,0)
		Simile a OXA-48	99	0	0	99	0	n.d.	100,0% (96,3 – 100,0)
		IMP	99	8	2	89	0	100,0% (67,6 – 100,0)	97,8% [92,3 – 99,4]
		VIM	99	1	0	98	0	100,0% (20,7 – 100,0)	100,0% (96,2 – 100,0)

N: Numero; VP: Vero Positivo; FP: Falso Positivo; VN: Vero Negativo; FN: Falso Negativo; IC: Intervallo di Confidenza

Più di un (1) gene preso di mira è stato identificato per alcuni isolati.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI ANALITICHE

INCLUSIVITÀ

L'inclusività della procedura analitica Carba C Revogene è stata determinata per 58 isolati non suscettibili ai carbapenemi di *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* di varie origini geografiche e temporali fra cui:

- due (2) ceppi con due (2) geni di resistenza;
- undici (11) ceppi, incluse cinque (5) varianti con il gene di resistenza *bla*_{IMP};
- undici (11) ceppi, incluse almeno tre (3) varianti con il gene di resistenza *bla*_{KPC};
- quattordici (14) ceppi, incluse cinque (5) varianti con il gene di resistenza *bla*_{NDM};
- undici (11) ceppi, incluse tre (3) varianti con il gene di resistenza *bla*_{simile a OXA-48};
- nove (9) ceppi, incluse quattro (4) varianti con il gene di resistenza *bla*_{VIM}.

Ogni ceppo è stato testato con una sospensione batterica McFarland 0.5 standardizzata corrispondente a 1,5-3x10⁶ CFU/mL di SB. Tre (3) replicati per ceppo sono stati testati utilizzando tre (3) diversi lotti di kit di Carba C Revogene (1 replicato per lotto di kit). I 58 ceppi sono stati identificati dalla procedura analitica Carba C Revogene e sono descritti nella **Tabella 5**.

Tabella 5. Ceppi non suscettibili ai carbapenemi testati per inclusività con la procedura analitica Carba C Revogene.

Specie	Numero di raccolta	Gene di resistenza e variante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® BAA-2793™	KPC-2, VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23061	OXA-232, NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-1705™	KPC-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21587	KPC-2
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21578	KPC-4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CCRI-21581	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19587	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19570	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59413	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59348	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 56233	KPC-2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2340™	KPC ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13443	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2146™	NDM-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22255	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-21711	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22199	NDM-1
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22257	NDM-1
<i>Providencia stuartii</i>	CCRI-22256	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22254	NDM-4
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23064	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23464	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23065	NDM-6
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23066	NDM-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC® BAA-2468™	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 60138	NDM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19585	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22258	VIM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21588	VIM-2
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22261	VIM-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-22720	VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22259	VIM-19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13442	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22263	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22265	OXA-48
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22266	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22264	OXA-181
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22267	OXA-181
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23060	OXA-204
<i>Citrobacter freundii</i>	CCRI-23374	OXA-204
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2523™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2524™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 64452	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP-1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-19488	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19569	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19582	IMP-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21589	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19583	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19588	IMP-4
<i>Citrobacter youngae</i>	CCRI-21591	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19584	IMP-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21590	IMP-9
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22262	IMP-11

^a L'identificazione della variante del gene di resistenza non è disponibile.

Inoltre, è stata eseguita un'analisi *in silico* il 7 novembre 2018 per valutare l'inclusività dei primer e delle sonde dei target della procedura analitica Carba C Revogene. Per ogni target sono state analizzate tutte le sequenze dei geni di resistenza *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{simile a OXA-48} e *bla*_{IMP} elencate nel database del Centro Nazionale per Informazioni di Biotecnologia (NCBI). È stata allineata una (1) sequenza rappresentativa di ogni variante nota. Il numero di varianti analizzate e previste da identificare è riepilogato per ogni target nella **Tabella 6**.

Tabella 6. Riepilogo dell'identificazione delle varianti dei geni di resistenza prese di mira in base alla previsione *in silico*.

Target	Testato con Carba C Revogene®			Previsione <i>in silico</i>		
	N. di campioni	Varianti identificate	Varianti non identificate	Identificabile ^a	Potenzialmente identificabile ^b	Non identificabile
KPC	12	2, 3, 4	Nessuna	Da 2 a 38	Nessuna	n.d.
NDM	15	1, 4, 5, 6, 7	Nessuna	Da 1 a 24	Nessuna	n.d.
IMP	11	1, 4, 8, 9, 11	Nessuna	1, 2, 4-6, 8-10, 13-20, 23-26, 28-30, 32, 33, 37, 38, 40, 42, 45, 47-49, 53-56, 59, 60, 62, 66, 69-72, 74-79	3, 7 ^c , 11 ^d , 21, 22, 27, 34, 41, 43, 44, 51, 52, 58, 61, 64, 67, 68, 73	12, 31, 35, 63
Simile a OXA-48	12	48, 181, 204, 232	Nessuna	48, 162, 181, 199, 204, 232, 244, 245, 252 ^e , 370, 484, 505, 514 ^e , 515 ^e , 519, 546 ^e , 547 ^e , 566	Nessuna	54 ^e , 163 ^e , 247 ^e , 405 ^e , 416 ^e , 436, 438 ^e , 439 ^e , 517, 535 ^e , 538 ^e , 567
VIM	10	1, 2, 10, 19	Nessuna	1-6, 8-12, 14-20, 23-46, 48-50, 52-55, 57, 59, 60	51, 56, 58	7, 13, 47

^a Basato su allineamenti con identità e copertura query ≥ 95% e valori E < 0,01.^b Basato su allineamenti che presentano non più di due (2) mancate corrispondenze di nucleotidi.^c Un ceppo ricombinante che trasportava un gene IMP-7 è stato testato con la procedura analitica Carba C Revogene, come complemento dello studio *in silico*, e la sua identificazione è stata confermata.^d Un ceppo clinico che trasportava un gene IMP-11 è stato testato con la procedura analitica Carba C Revogene nello studio di inclusività analitica e la sua identificazione è stata confermata.^e Sono state identificate solo varianti nei patogeni umani opportunisti rari del genere *Shewanella*.^f Varianti con una delezione nella loro sequenza risultante in nessuna attività di carbapenemasi.**REATTIVITÀ CROCIATA**

La reattività crociata della procedura analitica Carba C Revogene è stata valutata con elevati carichi di ceppi non suscettibili ai carbapenemi che trasportavano diversi geni di resistenza β-lattamasi non presi di mira dalla procedura analitica.

Lo studio includeva 50 ceppi di *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* che trasportavano diversi geni di resistenza β-lattamasi (ovvero, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SME}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SPM}) (Tabella 7). I ceppi sono stati testati a un carico minimo di 8,18x10⁶ CFU/mL di SB. Tre (3) replicati per ceppo sono stati testati utilizzando tre (3) diversi lotti di kit di Carba C Revogene (1 replicato per lotto di kit).Alle condizioni dello studio 49 ceppi sono risultati non reattivi con la procedura analitica Carba C Revogene. Il ceppo *bla*_{TEM-52} CCUG 59359 *Klebsiella pneumoniae* è risultato reattivo a una concentrazione finale di 1,13x10⁷ CFU/mL di SB, ma è risultato non reattivo se diluito 10 volte a una concentrazione finale di 1,13x10⁶ CFU/mL di SB.La reattività crociata con primer e sonde della procedura analitica Carba C Revogene è stata valutata da un'analisi *in silico* eseguita su sequenze contenute nel database del Centro Nazionale per Informazioni di Biotecnologia (NCBI) il 6 settembre 2018. Nessun altro gene di resistenza eccetto i target della procedura analitica (ovvero i geni di resistenza *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{simile a OXA-48} e *bla*_{IMP}) è risultato avere un'omologia con i primer e le sonde della procedura analitica Carba C Revogene, inclusi *bla*_{VIM} e *bla*_{VEB}, che sono altri due (2) geni di resistenza β-lattamasi non presi di mira dalla procedura analitica.

Tabella 7. Elenco di ceppi testati per la reattività crociata con la procedura analitica Carba C Revogene.

Specie	Numero di raccolta	Geni di resistenza non presi di mira ¹
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22353	ACT-15
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23473	Nessun gene β-lattamasi identificato
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21540	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22075	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22097	ACT-16
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23318	TEM-206, CTX-M-15, CMH-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21970	AmpC1, AmpC2, MrdA, AmpH, CMY-44
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CCRI-19495	SHV-5, AmpC
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-21537	SRT-1
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-23334	SME-4, SRT-1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21536	ACT-5
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21603	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21692	ACT-14
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1016	TEM-90, Mbl, BlaA2, OXA-65 ^e , idrolasi dipendente da Zn
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-1015	TEM-171, SCO-1, PER-2, OXA-9 ^e , SHV-39, AmpH
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1017	TEM-206, SCO-1, Mbl, BlaA2, OXA-67 ^e , idrolasi dipendente da Zn
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-831	TEM-206, CTX-M-2, OXA-2 ^e
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-825	TEM-33, CTX-M-2, OXA-2 ^e
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-873	OXA-50 ^e
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-1228	OXA-50 ^e
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8892	TEM-166, CTX-M-5, OXA-1 ^e
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8893	TEM-95, CTX-M-5, OXA-1 ^e
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-785	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-779	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-778	AmpC2, MrdA
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3854	ACT-4 ^e
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3879	AmpC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3853	AmpC
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3852	ACT-7
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	CCRI-806	OKP-B-11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-784	SHV-27, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-878	AmpC2, MrdA, AmpH
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-826	TEM-215
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 54718	TEM-33, CTX-M-15, OXA-1 ^e , AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59358	SHV-14, OXA-1 ^e , LAP-2
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13441	CTX-M-15, TEM-198, MrdA, OXA-1 ^e , AmpC2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 58546	SHV-44, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59349	CTX-M-15, OXA-1 ^e , TEM-105, SHV-11, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59359	SHV-70, TEM-15, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59360	TEM-168, SHV-12, OXA-9 ^e , AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55970	CTX-M-9, AmpC2, TEM-206, MrdA, AmpC1, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55971	TEM-143, CTX-M-15, AmpC2
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55972	AmpC1, CTX-M-2, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58540	AmpC2, TEM-206, CTX-M-15, OXA-1 ^e , MrdA, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58541	CTX-M-14, TEM-104, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58542	CTX-M-15, AmpC2, OXA-1 ^e , MrdA
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-21789	Nessun gene β-lattamasi identificato
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13465	SHV-85, TEM-206, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21710	AmpC2, MrdA, CTX-M-15, AmpH, OXA-1 ^e
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C72	SPM

¹ Analizzato tramite Sequenziamento del genoma completo, eccetto per il ceppo C72 *P. aeruginosa*.² Gene di resistenza identificato con omologia del 99,9%.³ Queste varianti *bla*_{OXA} non fanno parte della famiglia *bla*_{simile a OXA-48}, ma fanno parte della classificazione di Ambler D.**SOSTANZE INTERFERENTI**

L'effetto potenzialmente inhibitorio di 12 combinazioni di piastre di agar e soluzioni fisiologiche sterili che possono essere utilizzate per l'isolamento e la preparazione della sospensione McFarland (McF) 0,5 è stato valutato utilizzando cinque (5) ceppi batterici positivi, ognuno ospitante uno (1) dei geni di resistenza identificati dalla procedura analitica Carba C Revogene, e un (1) ceppo non suscettibile ai carbapenemi negativo che non trasporta alcun gene di resistenza preso di mira dalla procedura analitica. Ogni ceppo è stato prima coltivato su piastre di agar sangue (BAP) e piastre di agar MacConkey (MAP) in presenza di un dischetto di meropenem da 10 µg e poi sottocoltivato su BAP o MAP fresche. Colonne isolate ottenute da BAP o MAP fresche sono state testate utilizzando un tamponcino asciutto sterile e diluite in una soluzione fisiologica sterile a una concentrazione equivalente a una sospensione McFarland 0,5 standardizzata. È stato testato un totale di 12 combinazioni (Tabella 8). Per ogni combinazione, un (1) replicato di ogni ceppo è stato testato con tre (3) lotti di kit di Carba C Revogene. Nessuna delle 12 combinazioni ha mostrato interferenze riferibili con la procedura analitica Carba C Revogene.

Tabella 8. Elenco di combinazioni di piastre di agar e soluzioni fisiologiche testate con la procedura analitica Carba C Revogene.

Piastre di agar/Soluzione fisiologica (Produttore)
Agar sangue Columbia al 5% (Hardy Diagnostics)/Soluzione fisiologica preparata BBL™ (BD)
Agar sangue Columbia al 5% (Hardy Diagnostics)/Soluzione fisiologica allo 0,85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Mezzi preparati di Agar Columbia BBL™ BD con 5% di sangue ovino (BD)/Soluzione fisiologica preparata BBL™ (BD)
Mezzi preparati di Agar Columbia BBL™ BD con 5% di sangue ovino (BD)/Soluzione fisiologica allo 0,85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Agar Columbia con 5% di sangue ovino (bioMérieux)/Soluzione fisiologica preparata BBL™ (BD)
Agar Columbia con 5% sangue ovino (bioMérieux)/Soluzione fisiologica allo 0,85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Agar MacConkey (Hardy Diagnostics)/Soluzione fisiologica preparata BBL™ (BD)
Agar MacConkey (Hardy Diagnostics)/Soluzione fisiologica allo 0,85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Mezzo di Agar MacConkey (Thermo Scientific™ Remel™)/Soluzione fisiologica preparata BBL™ (BD)
Mezzo di Agar MacConkey (Thermo Scientific™ Remel™)/Soluzione fisiologica allo 0,85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Agar MacConkey (Thermo Scientific™ Oxoid™)/Soluzione fisiologica preparata BBL™ (BD)
Agar MacConkey (Thermo Scientific™ Oxoid™)/Soluzione fisiologica allo 0,85% (Thermo Scientific™ Oxoid™)

TRASFERIMENTO E CONTAMINAZIONE CROCIATA

Il trasferimento (fra un ciclo e l'altro) e la contaminazione crociata (intracorsa) sono stati valutati utilizzando campioni negativi e positivi elevati. La concentrazione di ogni sospensione batterica è stata standardizzata a 4 McFarland (≥ 1,14x10⁷ CFU/mL di Sample Buffer), più elevata della concentrazione nominale di McFarland 0,5 specificata per l'uso nella procedura analitica. Sono stati preparati campioni positivi con il ceppo CCUG 59348 *Klebsiella pneumoniae* che ospita il gene *bla_{KPC}*. Sono stati preparati campioni negativi con il ceppo CCRI-22760 *Enterobacter cloacae* non suscettibile ai carbapenemi che non trasporta alcuno dei geni di resistenza delle carbapenemasi presi di mira dalla procedura analitica.

Per lo studio del trasferimento, un'analisi di otto (8) replicati di campioni positivi elevati seguita da un'analisi di otto (8) replicati di campioni negativi è stata eseguita da due (2) operatori con la procedura analitica Carba C Revogene, per un totale di dieci (10) analisi su un (1) Revogene.

Per lo studio della contaminazione crociata, quattro (4) campioni positivi elevati e quattro (4) campioni negativi sono stati testati alternando la preparazione dei campioni tra campioni positivi e negativi per ogni analisi. È stato eseguito un totale di dieci (10) analisi con la procedura analitica Carba C Revogene da due (2) operatori su un (1) Revogene.

Non sono stati rilevati trasferimenti o contaminazioni crociate di *bla_{KPC}*.

RIPRODUCIBILITÀ E PRECISIONE

È stato condotto uno studio per valutare la riproducibilità e la precisione della procedura analitica Carba C Revogene inclusa la riproducibilità fra laboratori, la riproducibilità fra lotti e lo studio di precisione intralaboratorio.

Lo studio di riproducibilità fra laboratori è stato eseguito in tre (3) centri, da due (2) operatori per centro, durante cinque (5) giorni diversi utilizzando un (1) lotto di kit di Carba C Revogene. È stato testato un totale di 120 replicati per ognuno dei dieci (10) ceppi non suscettibili ai carbapenemi batterici positivi, ognuno ospitante un (1) gene di resistenza preso di mira dalla procedura analitica Carba C Revogene (n=2 ceppi per gene di resistenza). È stato testato un totale di 240 replicati del ceppo non suscettibile ai carbapenemi batterico negativo che non trasporta alcuno dei geni di resistenza presi di mira dalla procedura analitica.

Lo studio di riproducibilità fra lotti è stato eseguito in un (1) centro, da due (2) operatori, durante 15 giorni utilizzando tre (3) lotti di kit di Carba C Revogene (5 giorni per lotto di kit). È stato testato un totale di 120 replicati per ognuno dei dieci (10) ceppi non suscettibili ai carbapenemi batterici positivi, ognuno ospitante un (1) gene di resistenza preso di mira dalla procedura analitica Carba C Revogene (n=2 ceppi per gene di resistenza). È stato testato un totale di 240 replicati del ceppo non suscettibile ai carbapenemi batterico negativo che non trasporta alcuno dei geni di resistenza presi di mira dalla procedura analitica.

La precisione intralaboratorio è stata stabilita con dati ottenuti con il lotto di kit n. 1 testato da due (2) operatori esclusivamente nel centro n. 1 durante un totale di cinque (5) giorni. È stato preso in considerazione un totale di 40 replicati per ognuno dei dieci (10) ceppi non suscettibili ai carbapenemi batterici positivi, ognuno ospitante un (1) gene di resistenza preso di mira dalla procedura analitica Carba C Revogene (n=2 ceppi per gene di resistenza). È stato preso in considerazione anche un totale di 80 replicati del ceppo non suscettibile ai carbapenemi batterico negativo che non trasporta alcuno dei geni di resistenza presi di mira dalla procedura analitica.

Tutti i ceppi sono stati testati con sospensioni McFarland (McF) 0,5 standardizzate.

Per la riproducibilità fra laboratori, la percentuale di concordanza complessiva è stata del 100% (120/120) per ogni ceppo positivo e del 98,8% (237/240) per il ceppo negativo (**Tabella 9**). Per la riproducibilità fra lotti, la percentuale di concordanza complessiva è stata del 100% (120/120) per ogni ceppo positivo e del 99,6% (239/240) per il ceppo negativo (**Tabella 10**). Anche i valori della soglia del ciclo (Ct) medi con componenti di variazione di deviazione standard (DS) e coefficiente di variazione (CV) sono indicati nelle **Tabelle 9 e 10**.

Per la precisione intralaboratorio, la percentuale di concordanza è stata del 100% (40/40) per ogni ceppo positivo e del 100% (80/80) per il ceppo negativo (**Tabella 11**).

Tabella 9. Risultati dello studio di riproducibilità fra laboratori con un (1) lotto di kit per procedura analitica Carba C Revogene.

Specie	Gene di resistenza e variante	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Risultati complessivi/ Totale	Percentuale di concordanza complessiva ¹	95% IC complessivo	Valori Ct ²		
		Risultati/Totale	Percentuale di concordanza	Risultati/Totale	Percentuale di concordanza	Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza				Media complessiva	DS	% CV
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	29,7	1,6	5,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	29,6	1,3	4,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	30,5	2,1	7,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	30,4	2,2	7,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	30,3	1,0	3,1
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	30,2	1,5	4,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	28,5	1,4	4,8
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	30,5	1,9	6,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	27,6	1,0	3,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	28,5	1,2	4,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	80/80	100%	79/80	98,8%	80/80	100%	237/240	98,8%	96,4%-99,6%	34,9	1,9	5,5

¹ Per il ceppo negativo, la percentuale di concordanza è stata calcolata dai risultati negativi.

² Per i geni di resistenza e le varianti, i valori Ct indicati sono per il gene specificato. Per il ceppo negativo, i valori Ct indicati sono per il PrC.

Tabella 10. Risultati dello studio di riproducibilità fra lotti in un (1) centro con tre (3) lotti di kit per procedura analitica Carba C Revogene.

Specie	Gene di resistenza e variante	Lotto 1		Lotto 2		Lotto 3		Risultati complessivi/ Totale	Percentuale di concordanza complessiva ¹	95% IC complessivo	Valori Ct ²		
		Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza	Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza	Risultati/ Totale	Percentuale di concordanza				Media complessiva	DS	% CV
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	29,0	1,1	3,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	29,2	1,4	4,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	29,6	2,2	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	30,8	2,3	7,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	29,5	1,4	4,8
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	28,9	1,5	5,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	28,2	1,5	5,2
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	28,6	1,6	5,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	27,5	1,0	3,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100%	40/40	100%	40/40	100%	120/120	100%	96,9%-100,0%	28,1	1,4	4,8
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	80/80	100%	79/80	98,8%	80/80	100%	239/240	99,6%	97,7%-99,9%	33,0	2,9	8,8

¹ Per il ceppo negativo, la percentuale di concordanza è stata calcolata dai risultati negativi.

² Per i geni di resistenza e le varianti, i valori Ct indicati sono per il gene specificato. Per il ceppo negativo, i valori Ct indicati sono per il PrC.

Tabella 11. Risultati dello studio di precisione intralaboratorio in un (1) centro con un (1) lotto di kit per procedura analitica Carba C Revogene.

Specie	Gene di resistenza e variante	Percentuale di concordanza complessiva ¹	95% IC complessivo
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100% (40/40)	91,2%-100,0%
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	100% (80/80)	95,4%-100,0%

¹ Per il ceppo negativo, la percentuale di concordanza è stata calcolata dai risultati negativi.

ETICHETTATURA ELETTRONICA

È possibile accedere online alla documentazione correlate a questo prodotto al sito Web www.meridianbioscience.com/pi. Inoltre, sono disponibili copie cartacee su richiesta contattando il distributore locale o tramite i numeri di telefono elencati sulla scatola del kit.



Carba C

Pour utilisation avec le Revogene®

REF 410500

IVD Utilisation diagnostique *in vitro*



Rx Only

UTILISATION PRÉVUE

Le test Revogene® Carba C, réalisé sur l'instrument Revogene, est un test diagnostique *in vitro* qualitatif conçu pour la détection et la différenciation des séquences génétiques *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla* de type *OXA-48* et *bla_{IMP}* associées aux colonies pures d'*Enterobacteriaceae*, d'*Acinetobacter baumannii* ou de *Pseudomonas aeruginosa* caractérisées non sensibles aux carbapénèmes cultivées sur gélose au sang ou gélose MacConkey. Ce test utilise la réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel automatisée.

Le test Revogene Carba C devrait être utilisé en association avec d'autres tests de laboratoire, y compris des épreuves de sensibilité antimicrobienne phénotypiques. Un test Revogene Carba C négatif n'exclut pas la présence d'autres mécanismes de résistance.

Le test Revogene Carba C vise à aider au contrôle des infections par la détection de bactéries non sensibles aux carbapénèmes qui colonisent les patients dans le contexte des soins de santé. L'identification d'un gène métallo-lactamase *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* ou *bla_{VIM}* (c'est-à-dire un des gènes qui encodent respectivement les métallo-lactamases IMP, NDM et VIM) peut aider les cliniciens à déterminer les stratégies thérapeutiques appropriées pour les patients atteints d'infections non sensibles aux carbapénèmes connues ou soupçonnées.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La résistance aux carbapénèmes peut être attribuable à différents mécanismes, dont la production de carbapénèmes. Les carbapénèmes sont des enzymes hétérogènes capables d'hydrolyser les antibiotiques de la classe des carbapénèmes¹. Les gènes jouant un rôle dans l'encodage des carbapénèmes sont présents principalement sur les éléments mobiles tels que les plasmides, ce qui facilite leur propagation entre les différentes espèces bactériennes. Les plasmides qui transportent les gènes jouant un rôle dans l'encodage des carbapénèmes des classes A (KPC), B (IMP, NDM, VIM) et D (de type OXA-48) se sont propagés à l'extérieur des établissements de soins de santé et entraînent des infections extrahospitalières très graves². Les bactéries qui hébergent ces gènes plasmidiques sont souvent appelées organismes producteurs de carbapénèmes (OPC) ou organismes résistant aux carbapénèmes (ORC).

Les *Enterobacteriaceae*, bacilles à Gram négatif, sont présentes dans la flore intestinale normale et sont considérées comme des hôtes des gènes encodant les carbapénèmes. Les *Enterobacteriaceae* qui ne sont pas sensibles aux antibiotiques de la classe des carbapénèmes en raison de la production de carbapénèmes sont appelées *Enterobacteriaceae* productrices de carbapénèmes (EPC). Les EPC peuvent causer des infections dans pratiquement toutes les parties de l'organisme, notamment des infections sanguines et des voies urinaires, des pneumonies acquises sous ventilation mécanique et des abcès intra-abdominaux³. Le traitement des infections causées par ces organismes est extrêmement difficile en raison de leur résistance à de multiples médicaments. Par conséquent, ces infections sont associées à des taux de mortalité plus élevés⁴.

Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* sont deux (2) pathogènes opportunistes importants de la famille des bacilles à Gram négatif non fermentatifs. Puisque la résistance intrinsèque à de multiples classes d'antibiotiques est couramment associée à ces organismes, les carbapénèmes sont souvent utilisés dans leur traitement⁵. Les bacilles à Gram négatif non fermentatifs sont de plus en plus résistants aux antibiotiques de la classe des carbapénèmes, ce qui limite le nombre d'options thérapeutiques. Les bactéries à Gram négatif non fermentatifs qui ne sont pas sensibles aux carbapénèmes en raison de la production de carbapénèmes sont appelées bactéries non fermentatives productrices de carbapénèmes (NF-PC). Bien que les NF-PC puissent être détectées dans toutes les parties de l'organisme, elles sont plus souvent associées à des pneumonies nosocomiales⁶.

Le dépistage et l'isolement précoce des patients colonisés ou infectés sont des mesures clés du contrôle des infections pour limiter la propagation de ces organismes dans les milieux de soins de santé et orienter plus efficacement le traitement.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Le test Revogene Carba C peut fournir les résultats pour un (1) à huit (8) échantillons en environ 70 minutes à partir de colonies isolées d'*Enterobacteriaceae*, d'*Acinetobacter baumannii* ou de *Pseudomonas aeruginosa* caractérisées non sensibles aux carbapénèmes. L'analyse réduit au minimum l'intervention de l'opérateur entre le moment où l'échantillon est chargé dans la cartouche microfluidique jetable à usage unique (PIE) et celui où le résultat final est obtenu.

Le test est réalisé au moyen de l'instrument Revogene, qui automatise l'homogénéisation et la dilution de l'échantillon, la lyse cellulaire ainsi que l'amplification de l'ADN de l'échantillon et la détection des copies issues de l'amplification par PCR. L'utilisateur n'a à intervenir que pour la préparation d'une suspension bactérienne standard à partir de colonies isolées caractérisées non sensibles aux carbapénèmes, l'inoculation de l'échantillon dans le tube échantillon (TTE), le transfert de l'échantillon du TTE dans le PIE et l'insertion des PIEs dans le carrousel Revogene.

Chaque PIE est un dispositif fermé complètement intégré dans lequel un échantillon est distribué et traité via différentes chambres et différents canaux microfluidiques (homogénéisation, dilution d'échantillon, lyse cellulaire et extraction d'ADN). Les étapes de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel sont ensuite exécutées (Figure 1). Le liquide d'un échantillon est transféré par centrifugation d'une chambre à une autre, dans l'ordre, et l'ensemble des réactifs propres à la réaction PCR sont incorporés et séchés dans les puits PCR. Un contrôle de procédé est incorporé dans chaque PIE pour vérifier les étapes de traitement et d'amplification de l'échantillon, y compris les éventuelles substances inhibitrices, ainsi que les défaillances du test au niveau microfluidique, de l'instrument ou des réactifs. Les produits de l'amplification sont détectés en temps réel à l'aide de sondes basées sur la chimie Taqman® spécifiques de la cible.

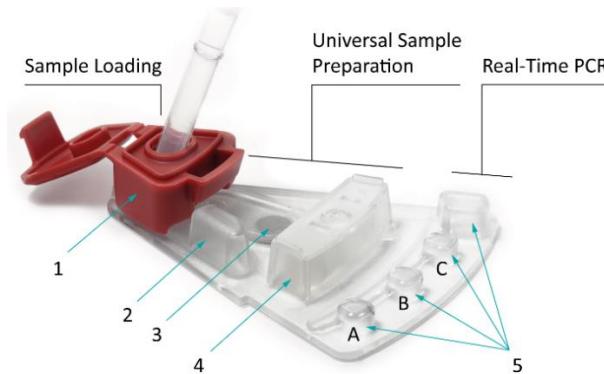


Figure 1. Vue du dessus d'un PIE.
 1: Chambre de chargement des échantillons, 2: Chambre de débordement,
 3: Chambre d'homogénéisation contenant le contrôle de procédé, 4: Chambre de dilution et de lyse,
 5: Trois (3) puits de PCR (de A à C, de gauche à droite) et une (1) chambre réservée aux déchets (à droite).

L'instrument Revogene peut traiter simultanément entre un (1) et huit (8) échantillons d'une même série. Le carrousel doit toutefois contenir huit (8) PIEs afin de maintenir l'équilibre thermodynamique de la série. À la fin de l'analyse, les résultats sont calculés par le système à partir des signaux fluorescents mesurés et des algorithmes de calcul intégrés. L'utilisateur peut imprimer, transférer ou enregistrer les résultats affichés sur l'écran tactile à l'aide du port USB ou de l'option de connectivité.

RÉACTIFS ET MATERIEL FOURNIS

Le kit Revogene Carba C contient suffisamment de réactifs et de matériel pour traiter 24 échantillons. Le kit contient les éléments suivants :

1. 24 pipettes de transfert jetable (PTJ): L'PTJ est une pipette de plastique dotée de marques de volume minimal et maximal servant au transfert de l'échantillon du tube échantillon au PIE.
2. 24 tubes de tampon pour échantillon (TTE): Le tube échantillon contient la solution tampon TE 1X (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na₂) qui agit comme tampon de dilution et de conservation de l'échantillon.
3. 24 pochettes individuelles contenant une (1) cartouche microfluidique (PIE) Carba C: Dispositif intégré qui comprend des réactifs séchés permettant de traiter les échantillons et d'effectuer les étapes de PCR en temps réel pour la détection et l'amplification des séquences génétiques *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, de type *bla_{OXA-48}* et *bla_{IMP}*. Chaque PIE comprend un contrôle de procédé, une sonde et des amorces spécifiques du contrôle de procédé, une sonde et des amorces spécifiques des gènes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, de type *bla_{OXA-48}* et *bla_{IMP}*, des GBS, un tampon et de l'ADN polymérase.

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

1. Revogene® (réf. cat. 610210)
2. Gants non poudrés jetables
3. Écouvillons stériles jetables
4. Solution saline (solution de NaCl de 0,45 % à 0,9 % recommandée)
5. Boîtes de gélose au sang ou de gélose MacConkey
6. Disque de méropénème à 10 µg (disques pour épreuve de sensibilité antimicrobienne BD BBL™ Sensi-Disc™, cat. 231704 ou équivalent)
7. Agitateur-mélangeur vortex ayant une vitesse maximale d'eau moins 3 200 tr/min (VWR, cat. 58816-121 ou équivalent)
8. Densitomètre (VWR cat. 89402-910 ou équivalent) ou carte présentant un fond blanc et des lignes contrastantes noires (carte Wickerham pour la lecture de la turbidité, 2 po X 3 po, lignes noires recommandées; cat. Z08 ou équivalent)
9. Micropipette étalonnée (P20 recommandée, VWR réf. cat. 89079-964 ou équivalent)
10. Cônes de micropipette résistant aux aérosols et exempts de DNase et de RNase (taille agrandie recommandée; Sarstedt cat. 70.1189.215 ou équivalent)
11. Poste d'échantillonnage en rack (réf. cat. 132539, facultatif)
12. MOCK PIE (réf. cat. 610208, facultatif)

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. L'analyse Revogene Carba C ne peut être utilisée que sur l'instrument Revogene.
2. N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle l'emballage externe n'est pas intacte à l'arrivée.
3. N'utilisez pas les PIEs si les sachets de protection sont ouverts ou brisés à l'arrivée.
4. N'alternez pas les PTJ, les tubes échantillon et les PIEs entre les lots de kits.
5. Les PIEs et les PTJ à usage unique servent à traiter un (1) échantillon à la fois. Ne réutilisez pas les PIEs ni les PTJ.
6. Veillez à toujours manipuler les échantillons avec une extrême prudence, comme s'ils étaient infectieux et conformément aux bonnes pratiques de laboratoire telles que décrites dans le document Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁹ et le document Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document M29-A4¹⁰.
7. Portez des gants non poudrés jetables lorsque vous manipulez les échantillons et lavez-vous bien les mains ensuite.
8. Le PIE comporte des réactifs séchés. Vous ne devez pas ouvrir le sachet de protection tant que vous n'êtes pas prêt à effectuer le test.
9. Mettez au rebut les réactifs inutilisés et les déchets conformément à la réglementation de votre pays, de votre État, de votre province ou de votre municipalité.
10. N'ouvrez ou ne détruisez PAS le PIE après utilisation. Le bouchon et les joints d'étanchéité du PIE empêchent toute contamination par les produits de l'amplification et/ou les particules infectieuses.
11. N'utilisez pas un PIE ayant subi une chute ou ayant été secoué ou retourné une fois l'échantillon chargé sous peine de fausser les résultats.
12. N'utilisez pas des kits dont la date de péremption est dépassée.
13. Ne mettez pas le PIE chargé au réfrigérateur.
14. Il doit y avoir huit (8) PIEs dans le carrousel Revogene pour chaque analyse, afin de maintenir l'équilibre thermodynamique et mécanique durant le test. Remplissez les chambres vides de MOCK PIEs ou PIEs contenant du tampon d'échantillon s'il y a moins de huit (8) échantillons à tester.
15. La réglementation du pays, de la province ou de l'État, ou de la municipalité sur les maladies à déclaration obligatoire, qui est mise à jour continuellement, fournit une liste d'organismes importants dans le cadre de la surveillance et de l'investigation des épidémies^{9,10}. Les laboratoires ont la responsabilité de se conformer à la réglementation locale concernant les pathogènes à déclaration obligatoire et doivent consulter les laboratoires de santé publique locaux, ou provinciaux ou établis, pour obtenir des lignes directrices sur la soumission des isolats ou des échantillons cliniques.

DANGER ET MISES EN GARDE

A notre connaissance, il n'y pas de risqué connu associé à ce produit.

CONSERVATION ET STABILITÉ

1. Conservez le kit Revogene Carba C à une température comprise entre 2 et 25 °C. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit.
2. N'ouvrez pas un sachet tant que vous n'êtes pas prêt à effectuer les tests. Utilisez le PIE dans les 60 minutes suivant l'ouverture du sachet.
3. Les tubes échantillon inoculés peuvent être conservés à 25 °C pendant quatre (4) jours maximum ou entre 2 et 8 °C pendant sept (7) jours maximum.

MODE D'EMPLOI

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1. Les organismes doivent être identifiés comme des *Enterobacteriaceae* ou des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii*, et vous devez déterminer le statut de non-sensibilité aux carbapénèmes conformément au document d'accompagnement des disques antibiotiques ou à la dernière version des normes CLSI M100¹¹ avant d'utiliser le test Revogene Carba C.
2. Inoculez l'organisme sur une boîte de gélose au sang ou de gélose MacConkey, striez afin de créer l'isolement et placez un disque de méropénème à 10 µg dans le premier quadrant pour s'assurer que l'isolat conserve sa non-sensibilité aux carbapénèmes.
3. Incubez la boîte à une température de 35 °C pendant 18 à 24 heures dans des conditions aérobies.
4. Préparez une suspension McFarland 0,5 normalisée dans la solution saline en prélevant des colonies isolées non sensibles aux carbapénèmes à partir des boîtes de gélose incubées près du disque de méropénème à l'aide d'un écouvillon stérile.
5. Ajustez la suspension pour atteindre une turbidité équivalente à la norme McFarland 0,5. Utilisez un dispositif photométrique ou, si l'examen est fait visuellement, une source de lumière appropriée pour comparer la suspension à la norme McFarland 0,5 à l'aide d'une carte dotée d'un fond blanc et de lignes contrastantes noires. Il en résultera une suspension contenant environ 1 à 2 x 10⁸ unités formatrices de colonies (UFC)/mL.

PRÉPARATION DU TUBE ÉCHANTILLON

1. Pour chaque échantillon à tester, prendre un (1) TTE dans la boîte du kit.
2. Apposez sur le tube échantillon à code barres une étiquette portant l'identification appropriée sans masquer ni écrire sur les codes barres ou identifiez le tube. Placez le TTE sur le poste de travail d'échantillonnage en rack, le cas échéant.
3. Mélangez la suspension McFarland 0,5 dans l'agitateur-mélangeur vortex à vitesse maximale pendant 15 secondes.
4. À l'aide d'une micropipette, aspirez 15 µL de la suspension McFarland 0,5.
5. Retirez le capuchon du TTE et distribuez l'aliquote de suspension McFarland dans le TTE, en prenant soin de ne pas nébuliser l'échantillon. Agitez le liquide dans la pipette du haut vers le bas afin de vous assurer du transfert de l'aliquote. Veillez à ce qu'un (1) seul TTE soit ouvert à la fois.
6. Fermez bien le bouchon du TTE et placez ce dernier sur le poste d'échantillonnage en rack (le cas échéant).
7. Préparez les échantillons supplémentaires à tester en répétant les étapes 1 à 6.
8. Une fois que tous les échantillons ont été traités, passez à l'étape 9 (préparation du PIE).

PRÉPARATION DU PIE

REMARQUE : Traitez un (1) échantillon à la fois.

9. Dans l'agitateur-mélangeur vortex, mélangez le tube échantillon pendant 15 secondes à vitesse maximale ($\geq 3\,200$ tr/min).
10. Ouvrir la pochette de la cartouche PIE et en extraire la cartouche PIE. Le PIE doit être utilisé dans les 60 minutes suivant l'ouverture du sachet.
11. Prendre un PTJ dans la boîte du kit et aspirer le tampon pour échantillon (TE) inoculé en pressant l'ensemble de la poire. Le niveau de liquide dans le PTJ doit se situer entre les deux marques (Figure 2). Si le niveau de liquide ne se situe pas entre les deux marques, distribuez tout le volume du TE dans le TTE en pressant la poire, puis répétez cette étape.
12. Placez tout le contenu du TE qui se trouve dans le PTJ dans la chambre d'injection de l'échantillon du PIE (Figure 1). Assurez-vous que les rebords externes ou la partie inférieure de la chambre d'injection de l'échantillon n'entrent pas en contact avec le PTJ.
13. Fermez bien le bouchon du PIE. Placez le PIE sur le poste de travail d'échantillonnage en rack, le cas échéant. Ne mettez pas le PIE chargé au réfrigérateur.
14. Préparez tous les échantillons supplémentaires à tester en répétant les étapes 9 à 13, puis passez à l'étape 1 de la section « Fonctionnement du système Revogene ».

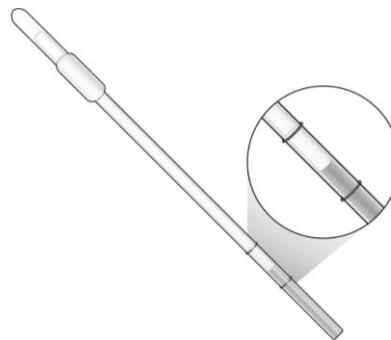


Figure 2.
Représentation du niveau approprié du TE avec l'outil de transfert jetable (PTJ).

FONCTIONNEMENT DU SYSTÈME REVOCENE

REMARQUE 1 : Chaque analyse doit être effectuée avec huit (8) PIEs dans le Revogene. En présence de moins de huit (8) échantillons, remplissez les espaces vides avec des MOCK PIEs*.

REMARQUE 2 : Pour de plus amples renseignements sur la configuration et le fonctionnement de l'instrument Revogene, reportez-vous au manuel de l'opérateur¹² du système Revogene.

1. Mettez le Revogene sous tension (s'il ne l'est pas déjà). Le logiciel se lance automatiquement.
2. Ouvrez une session en entrant le <nom d'utilisateur> et le <mot de passe> et en appuyant sur <Connexion>. Le menu principal s'affiche automatiquement.
3. Appuyez sur <Configuration de l'exécution>.
4. Indiquez le numéro d'identification de l'échantillon soit à l'aide du lecteur de codes barres, soit en le saisissant manuellement. Pour le saisir manuellement, touchez l'icône du crayon de la ligne <Balayer ou saisir l'identifiant de l'échantillon>.
5. Saisissez les codes barres du TTE et du PIE manuellement ou à l'aide du lecteur de codes barres en plaçant doucement le PIE pratiquement à la verticale devant le lecteur. Les codes barres du TTE et du PIE peuvent également être entrés manuellement (appuyez sur l'icône du crayon sur les lignes respectives). Manipulez le PIE avec précaution sans le secouer, ni le faire tomber.
6. (Facultatif) Appuyez sur l'icône du crayon de la ligne <Ajouter des commentaires> et entrez un commentaire.
7. Insérez le PIE dans l'instrument Revogene, dans n'importe quelle position du carrousel. Le logiciel associera automatiquement l'échantillon et le tube échantillon au bon PIE.
8. Confirmez que le PIE est inséré dans l'instrument en appuyant sur la ligne <Insérer le PIE dans l'instrument> et répétez les étapes 4 à 8 pour tous les échantillons. S'il y a moins de huit (8) échantillons testés, remplissez les chambres vides du carrousel de MOCK PIEs*. Le balayage n'est pas nécessaire pour l'insertion des MOCK PIEs dans le Revogene.
9. Lorsque tous les échantillons ont été insérés dans le carrousel, appuyez sur <Suivant>.
10. Si des MOCK PIEs ont été ajoutées dans le carrousel, suivez les instructions affichées à l'écran.
11. Balayez l'anneau de rétention et installez-le dans le carrousel. Fermez le couvercle de l'instrument.
12. Lancez le test en appuyant sur <Démarrer>.
13. Conservez les tubes échantillons inoculés dans des conditions appropriées (consultez la section « Conservation et stabilité ») pour répéter les tests, au besoin.

* En l'absence de MOCK PIE, utilisez des PIEs d'essai remplis d'un SB (BLANC).

AFFICHAGE ET EXPORTATION DES RÉSULTATS

1. Une fois l'analyse effectuée, le couvercle s'ouvre automatiquement.
2. Si la session Revogene s'est fermée, saisissez à nouveau votre <nom d'utilisateur> et votre <mot de passe>, et appuyez sur <Connexion>. Le menu principal s'affiche automatiquement.
3. Appuyez sur l'icône Résultat pour accéder aux résultats du test. La fenêtre « Résultats » montre les rapports de résultats pour chaque échantillon (Figure 3).



Figure 3.
Fenêtre « Résultats » montrant les rapports de résultats pour chaque échantillon.

4. Appuyez sur <Dernière analyse> pour afficher les résultats des derniers tests.
5. Appuyez sur <Rapport> pour afficher le résultat cible précis pour chaque échantillon. Consultez la section « Interprétation des résultats » pour confirmer si d'autres mesures doivent être prises en fonction des résultats cibles obtenus.
- REMARQUE :** Si un test est répété pour un échantillon, tous les résultats positifs du test initial et du test répété doivent être signalés, même s'il y a un écart entre les résultats pour la même cible.
6. Dans le menu <Dernière analyse>, sélectionnez les échantillons dont les rapports de résultats doivent être exportés. Vous pouvez sélectionner tous les échantillons en même temps en cliquant sur la case dans le coin supérieur gauche de l'écran.
7. Appuyez sur <Exporter> et enregistrez-les à l'endroit approprié (par exemple, sur une clé USB).
- (Facultatif) Appuyez sur <Rechercher> pour rechercher un échantillon particulier et ses résultats.
9. Retirez l'anneau de rétention et les PIEs de l'instrument Revogene. Les PIEs utilisés doivent être jetés dans les poubelles appropriées, conformément aux pratiques standards de l'établissement.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les procédures de contrôle de la qualité contrôlent l'exactitude et la précision du processus analytique. Chaque laboratoire doit établir le nombre, le type et la fréquence relatifs au matériel de contrôle des tests conformément aux réglementations applicables ou aux organismes d'accréditation compétents. La procédure ci-dessous peut être employée, si nécessaire, en fonction des procédures et des politiques locales.

CONTRÔLE DE PROCÉDÉ

Chaque PIE contient un contrôle de procédé qui vérifie l'homogénéisation et la dilution de l'échantillon, la lyse cellulaire, l'inhibition de l'amplification de l'ADN et la défaillance de l'analyse au niveau des réactifs.

CONTRÔLES EXTERNES

REMARQUE : Il convient d'utiliser des PTJ, des TTE et des PIEs distincts pour chaque contrôle externe.

1. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de matériel de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives appropriées concernant l'exécution de contrôles de qualité externes. D'après les recommandations, il convient d'exécuter un (1) contrôle externe positif et un (1) contrôle externe négatif au moins une fois par jour jusqu'à ce qu'il y ait validation adéquate du processus du test Revogene Carba C sur le Revogene dans chaque environnement de laboratoire.
2. Le matériel de contrôle externe n'est pas fourni par Meridian Bioscience, Inc. Les contrôles externes ne sont pas utilisés par le logiciel du Revogene pour l'interprétation des résultats de l'analyse de l'échantillon. Les contrôles externes sont traités comme s'il s'agissait d'échantillons.

D'après les recommandations, il convient d'exécuter cinq (5) contrôles externes positifs et un (1) contrôle externe négatif, selon la liste fournie ci-dessous.

Contrôle externe positif

Une suspension McFarland 0,5 normalisée de colonies isolées à partir de souches caractérisées non sensibles aux carbapénèmes offertes sur le marché, diluée dans une solution saline, est recommandée comme contrôle externe positif. Les souches recommandées sont les suivantes:

- *K. pneumoniae* bla_{KPC-2} (CCUG 59348),
- *K. pneumoniae* bla_{NDM-1} (ATCC® BAA-2146™),
- *K. pneumoniae* bla_{VIM-1} (NCTC 13440),
- *E. coli* bla_{OXA-48} (ATCC® BAA-2523™),
- *E. coli* bla_{IMP-1} (NCTC 13476).

Chacun des cinq (5) contrôles externes positifs recommandés peut être utilisé en alternance.

Contrôle externe négatif

Une suspension McFarland 0,5 normalisée, diluée dans une solution saline, composée de colonies isolées de souches caractérisées non sensibles aux carbapénèmes représentatives d'*Enterobacteriaceae*, *d'A. baumannii* ou de *P. aeruginosa* et non porteuses des gènes de résistance ciblés par le test Revogene Carba C est recommandée comme contrôle externe négatif.

PRÉPARATION DES CONTRÔLES EXTERNES

1. Inoculez l'organisme sur une boîte de gélose au sang ou de gélose MacConkey, striez afin de créer l'isolement et placez un disque de méropénème à 10 µg dans le premier quadrant pour s'assurer que l'isolat conserve sa non-sensibilité aux carbapénèmes.
2. Incubez la boîte à une température de 35 °C pendant 18 à 24 heures dans des conditions aérobiques.
3. Préparez une suspension McFarland 0,5 normalisée dans la solution saline en prélevant des colonies isolées à partir des boîtes de gélose incubées près du disque de méropénème à l'aide d'un écouvillon stérile.
4. Ajustez la suspension pour atteindre une turbidité équivalente à la norme McFarland 0,5. Utilisez un dispositif photométrique ou, si l'examen est fait visuellement, une source de lumière appropriée pour comparer la suspension à la norme McFarland 0,5 à l'aide d'une carte dotée d'un fond blanc et de lignes contrastantes noires. Il en résultera une suspension contenant environ 1 à 2 x 10⁶ unités formatives de colonies (UFC)/mL.

Procédez au traitement et aux tests des préparations de contrôle externe en suivant les étapes décrites à la section « Préparation du TTE/Préparation du PIE », puis exécutez la procédure décrite à la section « Fonctionnement du système Revogene ».

RÉPÉTER LE TEST

RÉSULTAT INDÉTERMINÉ OU NON RÉSOLU

Lorsqu'un résultat cible indéterminé (IND) ou non résolu (UNR) est obtenu, vous devez répéter le test en utilisant le TTE inoculé correspondant dans les délais indiqués à la section « Conservation et stabilité ».

Utilisez le TTE inoculé correspondant d'origine pour charger un nouveau PIE du même lot de kit et éliminez le TTE inutilisé. Exécutez les étapes 9 à 13 de la section « Préparation du PIE » pour chaque échantillon, puis passez à la section « Fonctionnement du système Revogene ». Au besoin, un nouveau TTE peut être inoculé à partir d'une nouvelle suspension McFarland 0,5 normalisée.

Résultat indéterminé ou non résolu à un contrôle externe

Lorsqu'un résultat cible indéterminé (IND) ou non résolu (UNR) est obtenu à un contrôle externe, l'analyse doit être considérée comme invalide. Il faut répéter le test des contrôles externes positifs et négatifs, ainsi que des échantillons inclus dans la même analyse, à partir du même TTE inoculé correspondant. Toutes les analyses des TTE inoculés doivent être effectuées dans les délais indiqués à la section « Conservation et stabilité ».

Utilisez le TTE inoculé correspondant pour charger un nouveau PIE du même lot de kit. Exécutez la procédure à la section « Préparation du PIE », à partir de l'étape 9, puis passez à la section « Fonctionnement du système Revogene ».

Résultat négatif ou positif inattendu à un contrôle externe

Lorsqu'un résultat négatif ou positif inattendu est obtenu à un contrôle externe, l'analyse doit être considérée comme invalide. Il faut répéter le test des contrôles externes positifs et négatifs avec une nouvelle série de contrôles externes, comme indiqué à la section « Contrôle de la qualité ». Il convient de revoir la technique de manipulation ou de préparation des échantillons.

En outre, les nouveaux tests doivent être effectués pour tous les échantillons compris dans l'analyse, à l'aide du TTE inoculé correspondant d'origine, dans les délais indiqués à la section « Conservation et stabilité » et avec un nouvel ensemble de contrôles externes. Consultez la section « Contrôle de la qualité » pour savoir comment préparer un nouvel ensemble de contrôles externes.

Utilisez le TTE inoculé correspondant pour charger un nouveau PIE du même lot de kit. Exécutez la procédure à la section « Préparation du PIE », à partir de l'étape 9, puis passez à la section « Fonctionnement du système Revogene ».

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats sont calculés par l'instrument Revogene à partir de signaux fluorescents mesurés et d'algorithme de calcul intégrés et s'affichent dans la fenêtre « Résultats ». Les résultats possibles sont énumérés ci-dessous.

Échantillon Type	Symboles affichés à l'écran utilisateur	Résultats affichés	Interprétation	Étape supplémentaire
Colonne isolée		Positif	ADN cible de KPC, NDM, VIM, de type OXA-48 et IMP détecté.	Aucune étape supplémentaire nécessaire.
		Négatif	ADN cible de KPC, NDM, VIM, de type OXA-48 et IMP non détecté.	Aucune étape supplémentaire nécessaire.
		Positif/négatif	ADN cible de KPC et/ou NDM et/ou VIM et/ou de type OXA-48 et/ou IMP détecté. ET ADN cible de KPC et/ou NDM et/ou VIM et/ou de type OXA-48 et/ou IMP est non détecté.	Aucune étape supplémentaire nécessaire.
		Non résolu	Erreur d'amplification/de détection pour le contrôle de procédé. Peut être causée par des échantillons inhibiteurs, ou une défaillance au niveau microfluidique ou des réactifs.	Un nouveau test doit être effectué (reportez-vous à la section « Répéter le test »).
		Positif/ Non résolu	ADN cible de KPC et/ou NDM et/ou VIM et/ou de type OXA-48 et/ou IMP détecté. ET Erreur d'amplification/de détection pour le contrôle de procédé. Peut être causée par des échantillons inhibiteurs, ou une défaillance au niveau microfluidique ou des réactifs.	Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section « Répéter le test »). Tous les résultats positifs initiaux doivent être considérés comme positifs même si les résultats des tests répétés sont différents des cibles.
		Indéterminé	Aucun résultat à signaler en raison d'éventuelles erreurs de détection de l'instrument Revogene durant le traitement du dosage ou l'analyse des données, ou à cause de l'interruption de l'analyse.	Il convient de répéter les tests (reportez-vous à la section « Répéter le test »).

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Le test Revogene Carba C détecte les séquences génétiques *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, de type *bla_{OXA-48}* et *bla_{IMP}* et ne doit pas servir à l'identification bactérienne.
- La performance du test Revogene Carba C avec des bactéries autres que les *Enterobacteriaceae* et les bactéries *Acinetobacter baumannii* ou *Pseudomonas aeruginosa* n'a pas été évaluée. Les organismes doivent être identifiés et la non-sensibilité aux carbapénèmes doit être établie avant l'utilisation du test Revogene Carba C.
- Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* présentent une résistance intrinsèque à l'ertapénème. La détermination de la sensibilité aux carbapénèmes de ces espèces et l'applicabilité du test Revogene Carba C devraient être fondées sur les tests réalisés avec le meropénème, l'imipénème et le doripénème.
- Le test Revogene Carba C n'est pas un outil de sous-typeage et ne détecte pas les variantes des gènes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, de type *bla_{OXA-48}* et *bla_{IMP}*.
- Le test Revogene Carba C ne doit être utilisé sur l'instrument Revogene que par du personnel qualifié.
- Seules les PIEs Revogene Carba C peuvent être utilisées au cours d'une même analyse. Les PIEs utilisés pour les autres tests Revogene ne sont pas compatibles avec le test Revogene Carba C et ne doivent pas être utilisés.
- Les résultats de l'analyse Revogene Carba C doivent être utilisés comme complément des observations cliniques et des autres renseignements à la disposition du médecin.
- Les résultats des tests peuvent être faussés par une préparation incorrecte des cultures, une manipulation ou une conservation inadéquate, une erreur technique ou le mélange de l'échantillon. Pour éviter ces erreurs, il est indispensable de respecter scrupuleusement les instructions du présent document, le manuel de l'opérateur de l'instrument Revogene ou les directives établies.
- Une contamination de l'échantillon ou des résultats positifs inattendus peuvent se produire si le bouchon du PIE est mal fermé ou si une gouttelette entre en contact avec le rebord de la chambre d'injection de l'échantillon.
- Une conservation des tubes d'échantillon pendant une période plus longue que celle indiquée à la section « Conservation et stabilité » peut produire des résultats inattendus ou invalides.
- Les mutations ou polymorphismes des séquences génétiques actuelles, nouvelles ou inconnues de *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, de type *bla_{OXA-48}* et *bla_{IMP}* peuvent influer sur la détection, donnant lieu à un faux négatif.
- Les prédictions *in silico* de l'inclusivité des sondes et des amores du test Revogene Carba C ont été effectuées à l'aide de données sur les séquences disponibles dans la banque de données GenBank en 2018. Aucune analyse n'a été réalisée pour les nouvelles variantes de séquences des gènes cibles encodant les carbapénémases déposées dans la banque de données GenBank après 2018.
- La performance du test Revogene Carba C avec des gènes encodant les carbapénémases autres que ceux cibles (*bla_{TX-M}*, *bla_{AMP}*, *bla_{SHV}*, *bla_{SME}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SPM}*) est inconnue.

VALEURS ATTENDUES

Au total, 512 isolats bactériens non sensibles aux carbapénèmes ont été évalués au cours de l'étude clinique Revogene Carba C à trois (3) centres aux États-Unis et au Canada. Les résultats du test Revogene Carba C pour chaque gène cible comparativement à la méthode de référence (un test d'amplification des acides nucléiques [TAAN]) sont présentés aux Tableaux 1 à 4.

CARACTÉRISTIQUES DE LA PERFORMANCE CLINIQUE

La performance du test Revogene Carba C a été établie dans le cadre d'une étude clinique menée à trois (3) centres aux États-Unis et au Canada.

Les isolats bactériens caractérisés comme des *Enterobacteriaceae* ou des bactéries *Acinetobacter baumannii* ou *Pseudomonas aeruginosa* ont été cultivés sur des géloses au sang et des géloses MacConkey. Les isolats d'*Enterobacteriaceae* étaient modérément sensibles ou résistants au doripénème, à l'ertapénème et au meropénème selon les normes CLSI M02¹³. Les isolats d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* étaient modérément sensibles ou résistants au doripénème, à l'imipénème et au meropénème, puisqu'ils sont intrinsèquement résistants à l'ertapénème. Les isolats de colonies sur gélose au sang et sur gélose MacConkey ont été dilués dans une solution saline pour obtenir une suspension équivalente à la norme McFarland 0,5 et ont été analysés au moyen du test Revogene Carba C. La méthode de référence consistait en un TAAN haute performance approuvé par la FDA pour la détection des gènes cibles encodant les carbapénémases à partir de colonies isolées d'organismes reconnus comme non sensibles aux carbapénèmes, dont la performance a été établie par rapport au PCR/ séquençage bidirectionnel et qui a été utilisée selon les directives du fabricant.

La sensibilité et la spécificité ont été calculées en comparant les résultats du test Revogene Carba C avec la méthode de référence. Une analyse des résultats discordants a été effectuée pour les échantillons ayant produit des résultats discordants entre le test Revogene Carba C et le TAAN de référence au moyen d'une autre méthode PCR permettant l'amplification et la détection des gènes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, de type *bla_{OXA-48}* et *bla_{IMP}*, suivie par un séquençage bidirectionnel du produit amplifié.

RÉSULTATS

Au total, 532 isolats bactériens (475 isolats de stocks cliniques et 57 isolats frais prélevés de façon prospective) ont été analysés au cours de l'étude clinique. Vingt isolats ont été exclus de l'analyse de la performance pour l'une des raisons suivantes : ils apparteniaient à des espèces non ciblées, leur identité ne pouvait être confirmée, ils étaient sensibles aux carbapénèmes, une erreur de laboratoire a été décelée ou des résultats de PCR valides n'étaient pas disponibles. Par conséquent, au total, 512 isolats bactériens ont été utilisés pour établir la performance du test Revogene Carba C par rapport à la méthode de référence.

La sensibilité et la spécificité du test Revogene Carba C pour la détection de cinq (5) gènes cibles encodant les carbapénémases prélevés de colonies cultivées sur gélose au sang et gélose MacConkey sont illustrées respectivement aux Tableaux 1 et 2.

Au total, 24 isolats contenaient plus d'un gène encodant les carbapénémases, comme l'a déterminé le test Revogene Carba C. Le contenu en gènes encodant les carbapénémases signalé pour 21 de ces isolats a été confirmé par la méthode de référence. Toutefois, la méthode de référence n'a détecté qu'un seul gène encodant les carbapénémases dans les trois (3) autres isolats.

Les taux initiaux de résultats non-rapportables (combinant les taux de résultats non résolus et indéterminés) au niveau du milieu étaient de 1,7 % (9/516) pour la gélose au sang et de 1,4 % (7/516) pour la gélose MacConkey. Au niveau cible, pour la gélose au sang, les taux étaient de 1,7 % (9/516) pour les gènes cibles *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* et de type *bla_{OXA-48}* et de 1,6 % (8/516) pour le gène cible *bla_{VIM}*, ce qui donne un taux global de 1,7 % (9/516). Pour la gélose MacConkey, le taux de résultats non-rapportables était de 1,4 % (7/516) pour toutes les cibles. Après la répétition du test, le taux de résultats non-rapportables était de 0,8 % (4/516) pour l'ensemble des milieux et des gènes cibles.

La performance du test Revogene Carba C pour chaque groupe d'organismes sur gélose au sang ou sur gélose MacConkey est décrite aux Tableaux 3 et 4.

Tableau 1. Performance du test Revogene Carba C sur des colonies isolées cultivées sur gélose au sang

Cible	N	VP	FP	VN	FN	Sensibilité (IC à 95 %)	Spécificité (IC à 95 %)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98,9 % (96,2 – 99,7)	99,4 % (97,8 – 99,8)
KPC	512	113	3 ^b	395	1	99,1 % (95,2 – 99,8)	99,2 % (97,8 – 99,7)
De type OXA-48	512	65	3 ^c	444	0	100,0 % (94,4 – 100,0)	99,3 % (98,0 – 99,8)
IMP	512	27	19 ^d	466	0	100,0 % (87,5 – 100,0)	96,1 % (94,0 – 97,5)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100,0 % (93,1 – 100,0)	99,8 % (98,8 – 100,0)

N : nombre; VP : vrai positif; FP : faux positif; VN : vrai négatif; FN : faux négatif; IC : intervalle de confiance

Remarque : Les tests discordants consistaient en cinq (5) tests par méthode PCR de remplacement suivis d'un séquençage bidirectionnel; ils ont été effectués pour chaque résultat cible discordant. Les résultats des tests discordants de 21 des 31 échantillons concordent avec ceux du test Revogene Carba C.

^a Un (1) des deux (2) isolats était positif pour NDM-1.^b Deux (2) des trois (3) isolats étaient positifs pour KPC-3/KPC-38.^c Un (1) des trois (3) isolats était positif pour OXA-48. L'examen indique une contamination croisée par OXA-48 à l'étape de préparation des échantillons pour un (1) des trois (3) isolats. Les tests discordants n'ont pas produit de séquences concordantes avec la cible de type OXA-48.^d Dix-sept (17) des 19 isolats étaient positifs pour IMP, y compris une (1) variante d'IMP-4 (d'Australie [2010]), 11 variantes d'IMP-13/IMP-37, une (1) d'Argentine [2006], une (1) d'Amérique du Nord [2014], neuf (9) d'Europe [2005–2015], une (1) variante d'IMP-27/IMP-64 (du Canada [2017]), une (1) variante d'IMP-15 (d'Argentine [2004]), une (1) variante d'IMP-16 (du Brésil [2004]) et deux (2) variantes d'IMP-62 (d'Argentine [2006]). L'analyse des résultats discordants a fait ressortir des différences dans la couverture des variantes d'IMP entre le test Revogene Carba C et la méthode de référence. L'examen indique une contamination croisée par IMP à l'étape de préparation dans deux (2) des 19 isolats pour lesquels les tests n'ont pas produit de séquence correspondante avec la cible IMP.^e L'examen indique une contamination croisée par VIM à l'étape de préparation de l'échantillon. Les tests discordants n'ont pas produit de séquences concordantes avec la cible VIM, mais ont produit des séquences concordantes avec la cible NDM.^f Les tests discordants n'ont pas produit de séquences concordantes pour la cible NDM-1 pour un (1) des deux (2) isolats et ont produit une séquence concordante pour la cible de type OXA-48 pour un (1) des deux (2) isolats. L'isolat positif pour OXA-48 a été classé comme un FP.

Tableau 2. Performance du test Revogene Carba C sur des colonies isolées cultivées sur gélose MacConkey

Cible	N	VP	FP	VN	FN	Sensibilité (IC à 95 %)	Spécificité (IC à 95 %)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98,9 % (96,2 – 99,7)	99,4 % (97,8 – 99,8)
KPC	512	114	3 ^b	395	0	100,0 % (96,7 – 100,0)	99,2 % (97,8 – 99,7)
De type OXA-48	512	65	2 ^c	445	0	100,0 % (94,4 – 100,0)	99,6 % (98,4 – 99,9)
IMP	512	27	21 ^d	464	0	100,0 % (87,5 – 100,0)	95,7 % (93,5 – 97,2)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100,0 % (93,1 – 100,0)	99,8 % (98,8 – 100,0)

N : nombre; VP : vrai positif; FP : faux positif; VN : vrai négatif; FN : faux négatif; IC : intervalle de confiance

Remarque : Les tests discordants consistaient en cinq (5) tests par méthode PCR de remplacement suivis d'un séquençage bidirectionnel; ils ont été effectués pour chaque résultat cible discordant. Les résultats des tests discordants de 21 des 31 échantillons concordent avec ceux du test Revogene Carba C.

^a Un (1) des deux (2) isolats était positif pour NDM-1.^b Deux (2) des trois (3) isolats étaient positifs pour KPC-3/KPC-38.^c Un (1) des deux (2) isolats était positif pour OXA-48. L'examen indique une contamination croisée par OXA-48 à l'étape de préparation des échantillons pour un (1) des deux (2) isolats. Les tests discordants n'ont pas produit de séquences concordantes avec la cible de type OXA-48.^d Dix-sept (17) des 21 isolats étaient positifs pour IMP, y compris une (1) variante d'IMP-4 (d'Australie [2010]), 11 variantes IMP-13/IMP-37, une (1) d'Argentine [2006], une (1) d'Amérique du Nord [2014], neuf (9) d'Europe [2005–2015], une (1) variante d'IMP-27/IMP-64 (du Canada [2017]), une (1) variante d'IMP-15 (d'Argentine [2004]), une (1) variante d'IMP-16 (du Brésil [2004]) et deux (2) variantes d'IMP-62 (d'Argentine [2006]). L'analyse des résultats discordants a fait ressortir des différences dans la couverture des variantes d'IMP entre le test Revogene Carba C et la méthode de référence. L'examen indique une contamination croisée par IMP à l'étape de préparation dans quatre (4) des 21 isolats pour lesquels les tests n'ont pas produit de séquence correspondante avec la cible IMP.^e L'examen indique une contamination croisée par VIM à l'étape de préparation de l'échantillon. Les tests discordants n'ont pas produit de séquences concordantes avec la cible VIM, mais ont produit des séquences concordantes avec la cible KPC.^f Les tests discordants n'ont pas produit de séquences concordantes pour la cible NDM-1 pour un (1) des deux (2) isolats et ont produit une séquence concordante pour la cible de type OXA-48 pour un (1) des deux (2) isolats. L'isolat positif pour OXA-48 a été classé comme un FP.

Tableau 3. Performance du test Revogene Carba C par catégorie d'organisme et par gène cible, pour des colonies isolées cultivées sur gélose au sang

Milieu	Organismes	Cible	N	VP	FP	VN	FN	Sensibilité (IC à 95 %)	Spécificité (IC à 95 %)
Gélose au sang	Enterobacteriaceae	NDM	306	85	1	219	1	98,8 % (93,7 – 99,8)	99,5 % (97,5 – 99,9)
		KPC	306	112	3	190	1	99,1 % (95,2 – 99,8)	98,4 % (95,5 – 99,5)
		De type OXA-48	306	64	3	239	0	100,0 % (94,3 – 100,0)	98,8 % (96,4 – 99,6)
		IMP	306	14	5	287	0	100,0 % (78,5 – 100,0)	98,3 % (96,1 – 99,3)
		VIM	306	12	0	294	0	100,0 % (75,8 – 100,0)	100,0 % (98,7 – 100,0)
	Pseudomonas aeruginosa	NDM	107	26	1	80	0	100,0 % (87,1 – 100,0)	98,8 % (93,3 – 99,8)
		KPC	107	0	0	107	0	N/A	100,0 % (96,5 – 100,0)
		De type OXA-48	107	1	0	106	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	100,0 % (96,5 – 100,0)
		IMP	107	5	14	88	0	100,0 % (56,6 – 100,0)	86,3 % (78,3 – 91,6)
		VIM	107	39	0	68	0	100,0 % (91,0 – 100,0)	100,0 % (94,7 – 100,0)
	Acinetobacter baumannii	NDM	99	75	0	23	1	98,7 % (92,9 – 99,8)	100,0 % (85,7 – 100,0)
		KPC	99	1	0	98	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	100,0 % (96,2 – 100,0)
		De type OXA-48	99	0	0	99	0	N/A	100,0 % (96,3 – 100,0)
		IMP	99	8	0	91	0	100,0 % (67,6 – 100,0)	100,0 % (96,0 – 100,0)
		VIM	99	1	1	97	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	99,0 % (94,4 – 99,8)

N : nombre; VP : vrai positif; FP : faux positif; VN : vrai négatif; FN : faux négatif; IC : intervalle de confiance

Plusieurs gènes cibles ont été détectés dans certains isolats.

Tableau 4. Performance du test Revogene Carba C par catégorie d'organisme et par gène cible, pour des colonies isolées cultivées sur gélose MacConkey

Milieu	Organismes	Cible	N	VP	FP	VN	FN	Sensibilité (IC à 95 %)	Spécificité (IC à 95 %)
Gélose MacConkey	<i>Enterobacteriaceae</i>	NDM	306	85	1	219	1	98,8 % (93,7 – 99,8)	99,5 % (97,0 – 99,9)
		KPC	306	113	3	190	0	100,0 % (96,7 – 100,0)	98,4 % (95,5 – 99,5)
		De type OXA-48	306	64	2	240	0	100,0 % (94,3 – 100,0)	99,2 % (97,0 – 99,8)
		IMP	306	14	5	287	0	100,0 % (78,5 – 100,0)	98,3 % (96,1 – 99,3)
		VIM	306	12	1	293	0	100,0 % (75,8 – 100,0)	99,7 % (98,1 – 99,9)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NDM	107	26	1	80	0	100,0 % (87,1 – 100,0)	98,8 % (93,3 – 99,8)
		KPC	107	0	0	107	0	N/A	100,0 % (96,5 – 100,0)
		De type OXA-48	107	1	0	106	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	100,0 % (96,5 – 100,0)
		IMP	107	5	14	88	0	100,0 % (56,6 – 100,0)	86,3 % (78,3 – 91,6)
		VIM	107	39	0	68	0	100,0 % (91,0 – 100,0)	100,0 % (94,7 – 100,0)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM	99	75	0	23	1	98,7 % (92,9 – 99,8)	100,0 % (85,7 – 100,0)
		KPC	99	1	0	98	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	100,0 % (96,2 – 100,0)
		De type OXA-48	99	0	0	99	0	N/A	100,0 % (96,3 – 100,0)
		IMP	99	8	2	89	0	100,0 % (67,6 – 100,0)	97,8 % (92,3 – 99,4)
		VIM	99	1	0	98	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	100,0 % (96,2 – 100,0)

N : nombre; VP : vrai positif; FP : faux positif; VN : vrai négatif; FN : faux négatif; IC : intervalle de confiance

Plusieurs gènes cibles ont été détectés dans certains isolats.

CARACTÉRISTIQUES DE LA PERFORMANCE ANALYTIQUE

INCLUSIVITÉ

L'inclusivité du test Revogene Carba C a été déterminée pour 58 isolats non sensibles aux carbapénèmes d'*Enterobacteriaceae* et de bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* de diverses origines géographiques et temporelles, dont les suivantes :

- Deux (2) souches possédant deux (2) gènes de résistance;
- Onze (11) souches, dont cinq (5) variantes possédant le gène de résistance *bla_{IMP}*;
- Onze (11) souches, dont au moins trois (3) variantes possédant le gène de résistance *bla_{KPC}*;
- Quatorze (14) souches, dont cinq (5) variantes possédant le gène de résistance *bla_{NDM}*;
- Onze (11) souches, dont trois (3) variantes possédant le gène de résistance de type *bla_{OXA-48}*;
- Neuf (9) souches, dont quatre (4) variantes possédant le gène de résistance *bla_{VIM}*.

Chaque souche a été analysée à partir d'une suspension bactérienne McFarland 0,5 normalisée correspondant à une concentration entre 1,5 et 3x10⁶UFC/mL de tampon d'échantillon. Trois (3) répliques par souche ont été analysés à l'aide de trois (3) lots de kits Revogene Carba C différents (1 réplique par lot de kit). Les 58 souches ont été détectées par le test Revogene Carba C et sont décrites au Tableau 5.

Tableau 5. Souches non sensibles aux carbapénèmes analysées pour déterminer l'inclusivité du test Revogene Carba C.

Espèces	Numéro de prélèvement	Gène de résistance et variante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® BAA-2793™	KPC-2, VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23061	OXA-232, NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-1705™	KPC-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCUG 21587	KPC-2
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21578	KPC-4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CCRI-21581	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19587	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19570	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59413	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59348	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 56233	KPC-2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2340™	KPC ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13443	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2146™	NDM-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22255	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-21711	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22199	NDM-1
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22257	NDM-1
<i>Providencia stuartii</i>	CCRI-22256	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22254	NDM-4
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23064	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23464	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23065	NDM-6
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23066	NDM-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC® BAA-2468™	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 60138	NDM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19585	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22258	VIM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21588	VIM-2
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22261	VIM-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-22720	VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22259	VIM-19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13442	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22263	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22265	OXA-48
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22266	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22264	OXA-181
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22267	OXA-181
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23060	OXA-204
<i>Citrobacter freundii</i>	CCRI-23374	OXA-204
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2523™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2524™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 64452	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP-1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-19488	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19569	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19582	IMP-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21589	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19583	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19588	IMP-4
<i>Citrobacter youngae</i>	CCRI-21591	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19584	IMP-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21590	IMP-9
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22262	IMP-11

^a L'identification de la variante du gène de résistance n'est pas disponible.

En outre, une analyse *in silico* a été exécutée le 7 novembre 2018 pour déterminer l'inclusivité des amorces et des sondes des cibles du test Revogene Carba C. Pour chaque cible, l'ensemble des séquences des gènes de résistance *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, de type *bla*_{OXA-48} et *bla*_{IMP} figurant dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) a été analysé. Une (1) séquence représentative de chaque variante connue était alignée. Le nombre de variantes analysées et dont la détection a été prévue est décrit pour chaque cible au Tableau 6.

Tableau 6. Résumé de la détection des variantes des gènes de résistance cibles en fonction de la prédition *in silico*.

Cible	Analyse à l'aide du test Revogene® Carba C			Prédiction <i>in silico</i>		
	N° d'échantillons	Variantes déetectées	Variantes non déetectées	Détectable ^a	Potentiellement détectable ^b	Non détectable
KPC	12	2, 3, 4	Aucune	de 2 à 38	Aucune	S.O.
NDM	15	1, 4, 5, 6, 7	Aucune	de 1 à 24	Aucune	S.O.
IMP	11	1, 4, 8, 9, 11	Aucune	1, 2, de 4 à 6, de 8 à 10, de 13 à 20, de 23 à 26, de 28 à 30, 32, 33, 37, 38, 40, 42, 45, de 47 à 49, de 53 à 56, 59, 60, 62, 66, de 69 à 72, de 74 à 79	3, 7 ^c , 11 ^d , 21, 22, 27, 34, 41, 43, 44, 51, 52, 58, 61, 64, 67, 68, 73	12, 31, 35, 63
De type OXA-48	12	48, 181, 204, 232	Aucune	48, 162, 181, 199, 204, 232, 244, 245, 252 ^e , 370, 484, 505, 514 ^f , 515 ^f , 519, 546 ^f , 547 ^f , 566	Aucune	54 ^g , 163 ^g , 247 ^g , 405 ^g , 416 ^g , 436, 438 ^g , 439, 517, 535 ^g , 538 ^g , 567
VIM	10	1, 2, 10, 19	Aucune	de 1 à 6, de 8 à 12, de 14 à 20, de 23 à 46, de 48 à 50, de 52 à 55, 57, 59, 60	51, 56, 58	7, 13, 47

^a Selon les alignements avec l'identité ainsi que la longueur ≥ 95 % et les valeurs E < 0,01.

^b Selon les alignements ne présentant pas plus de deux (2) déséquivalences de nucléotides.

^c Une souche recombinante porteuse d'un gène IMP-7 a été analysée à l'aide du test Revogene Carba C, en complément de l'étude *in silico*, et sa détection a été confirmée.

^d Une souche clinique porteuse d'un gène IMP-11 a été analysée à l'aide du test Revogene Carba C dans l'étude sur l'inclusivité analytique, et sa détection a été confirmée.

^e Des variantes ont été identifiées uniquement dans les rares pathogènes humains opportunistes du genre *Shewanella*.

^f Variantes présentant dans leur séquence une délétion qui entraîne l'absence d'activité des carbapénémases.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

La réactivité croisée du test Revogene Carba C a été évaluée au moyen de charges élevées de souches non sensibles aux carbapénèmes porteuses de différents gènes de résistance aux β -lactamases qui ne sont pas ciblées par le test.

Cette étude portait sur 50 souches d'*Enterobacteriaceae* et de bactéries *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* porteuses de différents gènes de résistance aux β -lactamases (c.-à-d. *bla_{CTX-M}*, *bla_{AmpC}*, *bla_{SHV}*, *bla_{SME}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SPM}*) (**Tableau 7**). Les souches ont été testées à une charge d'au moins $8,18 \times 10^6$ UFC/mL de tampon d'échantillon. Trois (3) réplicats par souche ont été analysés à l'aide de trois (3) lots de kits Revogene Carba C différents (1 réplicat par lot de kit).

Dans les conditions de l'étude, 49 souches se sont avérées non réactives avec le test Revogene Carba C. La souche *Klebsiella pneumoniae* CCUG 59359 *bla_{TEM-52}* était réactive à une concentration finale de $1,13 \times 10^7$ UFC/mL de tampon d'échantillon, mais s'est avérée non réactive diluée 10 fois pour atteindre une concentration finale de $1,13 \times 10^6$ UFC/mL de tampon d'échantillon.

La réactivité croisée avec les amores et des sondes du test Revogene Carba C a été vérifiée dans le cadre d'une analyse *in silico* de séquences figurant dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) le 6 septembre 2018. Aucun gène de résistance autre que les cibles de l'essai (c.-à-d. les gènes de résistance *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, de type *bla_{OXA-48}* et *bla_{IMP}*) n'a révélé d'homologie avec les amores et les sondes du test Revogene Carba C, dont *bla_{IMI}* et *bla_{VEB}*, deux (2) autres gènes de résistance aux β -lactamases qui ne sont pas ciblés par ce test.

Tableau 7. Liste des souches dont la réaction croisée a été analysée avec le test Revogene Carba C

Spécies	Numéro de prélèvement	Gènes de résistance non ciblés ¹
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22353	ACT-15
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23473	Aucun gène de résistance aux β -lactamases identifié
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21540	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22075	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22097	ACT-16
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23318	TEM-206, CTX-M-15, CMH-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21970	AmpC1, AmpC2, MrdA, AmpH, CMY-44
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CCRI-19495	SHV-5, AmpC
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-21537	SRT-1
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-23334	SME-4, SRT-1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21536	ACT-5
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21603	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21692	ACT-14
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1016	TEM-90, Mbl, BlaA2, OXA-65 ² , hydrolase dépendante du zinc
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-1015	TEM-171, SCO-1, PER-2, OXA-9 ³ , SHV-39, AmpH
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1017	TEM-206, SCO-1, Mbl, BlaA2, OXA-67 ² , hydrolase dépendante du zinc
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-831	TEM-206, CTX-M-2, OXA-2 ³
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-825	TEM-33, CTX-M-2, OXA-2 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-873	OXA-50 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-1228	OXA-50 ³
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8892	TEM-166, CTX-M-5, OXA-1 ³
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8893	TEM-95, CTX-M-5, OXA-1 ³
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-785	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-779	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-778	AmpC2, MrdA
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3854	ACT-4 ⁴
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3879	AmpC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3853	AmpC
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3852	ACT-7
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	CCRI-806	OKP-B-11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-784	SHV-27, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-878	AmpC2, MrdA, AmpH
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-826	TEM-215
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 54718	TEM-33, CTX-M-15, OXA-1 ³ , AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59358	SHV-14, OXA-1 ³ , LAP-2
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13441	CTX-M-15, TEM-198, MrdA, OXA-1 ³ , AmpC2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 58546	SHV-44, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59349	CTX-M-15, OXA-1 ³ , TEM-105, SHV-11, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59359	SHV-70, TEM-15, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59360	TEM-168, SHV-12, OXA-9 ³ , AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55970	CTX-M-9, AmpC2, TEM-206, MrdA, AmpC1, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55971	TEM-143, CTX-M-15, AmpC2
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55972	AmpC1, CTX-M-2, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58540	AmpC2, TEM-206, CTX-M-15, OXA-1 ³ , MrdA, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58541	CTX-M-14, TEM-104, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58542	CTX-M-15, AmpC2, OXA-1 ³ , MrdA
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-21789	Aucun gène de résistance aux β -lactamases identifié
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13465	SHV-85, TEM-206, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21710	AmpC2, MrdA, CTX-M-15, AmpH, OXA-1 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C72	SPM

¹ Analysé par séquençage du génome entier, sauf la souche C72 de *P. aeruginosa*.

² Gène de résistance identifié avec une homologie de 99,9 %.

³ Ces variantes de la souche *bla_{OXA}* ne font pas partie de la famille des souches de type *bla_{OXA-48}*, mais de la classe D selon la classification d'Ambler.

SUBSTANCES CAUSANT UNE INTERFÉRENCE

L'effet potentiellement inhibiteur de 12 combinaisons de boîtes de gélose et de solutions salines pouvant être utilisées pour l'isolement et d'une préparation de suspension McFarland (McF) 0,5 a été évalué à l'aide de cinq (5) souches bactériennes positives, chacune hébergeant un (1) des gènes de résistance détectés par le test Revogene Carba C, et une (1) souche négative non sensible aux carbapénèmes et non porteuse des gènes de résistance ciblés par le test. Chaque souche a d'abord été cultivée dans des boîtes de gélose au sang et des boîtes de gélose MacConkey en présence d'une boîte de méropenème à 10 μ g, puis a été repiquée dans une boîte de gélose au sang ou une boîte de gélose MacConkey fraîche. Les colonies isolées obtenues de la boîte de gélose au sang ou de la boîte de gélose MacConkey ont été prélevées à l'aide d'un écouvillon stérile sec et diluées dans une solution saline stérile à une concentration équivalente à une suspension McFarland 0,5 normalisée. Au total, 12 combinaisons ont été analysées (**Tableau 8**). Pour chaque combinaison, un (1) réplicat de chaque source a été analysé avec trois (3) lots de kit Revogene Carba C. Ces 12 combinaisons n'ont montré aucune interférence mesurable.

Tableau 8. Liste de combinaisons de boîtes de gélose et de solutions salines analysées avec le test Revogene Carba C.

Boîte de gélose/Solution saline (Fabricant)
Gélose au sang Colombia 5 % (Hardy Diagnostics)/Solution saline préparée BBL™ (BD)
Gélose au sang Colombia 5 % (Hardy Diagnostics)/Solution saline 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Milieu préparé de gélose Columbia BD BBL™ avec 5 % de sang de mouton (bioMérieux)/Solution saline préparée BBL™ (BD)
Milieu préparé de gélose Columbia BD BBL™ avec 5 % de sang de mouton (bioMérieux)/Solution saline 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Gélose Columbia avec 5 % de sang de mouton (bioMérieux)/Solution saline préparée BBL™ (BD)
Milieu préparé de gélose Columbia BD BBL™ avec 5 % de sang de mouton (bioMérieux)/Solution saline 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Gélose MacConkey (Hardy Diagnostics)/Solution saline préparée BBL™ (BD)
Gélose MacConkey (Hardy Diagnostics)/Solution saline 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Milieu de gélose MacConkey (Thermo Scientific™ Remel™)/Solution saline préparée BBL™ (BD)
Milieu de gélose MacConkey (Thermo Scientific™ Remel™)/Solution saline 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Gélose MacConkey (Thermo Scientific™ Oxoid™)/Solution saline préparée BBL™ (BD)
Gélose MacConkey (Thermo Scientific™ Oxoid™)/Solution saline 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)

CONTAMINATION PAR RECIRCULATION ET CONTAMINATION CROISÉE

La contamination par recirculation (entre les séries) et la contamination croisée (au cours des séries) ont été évaluées au moyen d'échantillons positifs et négatifs. La concentration de chaque suspension bactérienne a été normalisée selon la norme McFarland 4 ($\geq 1,14 \times 10^7$ UFC/mL de tampon d'échantillon), ce qui est plus élevé que la concentration nominale McFarland 0,5 dont l'usage est recommandé avec le test. Les échantillons positifs ont été préparés à partir de la souche CCUG 59348 de *Klebsiella pneumoniae*, qui héberge le gène *bla_{KPC}*. Les échantillons négatifs ont été préparés à partir de la souche CCR1-22760 d'*Enterobacter cloacae* non sensible aux carbapénèmes, qui n'est pas porteuse des gènes de résistance aux carbapénèmes ciblés par le test.

Pour l'étude sur la contamination par recirculation, une série de huit (8) répliques d'échantillons fortement positifs, suivie par une série de huit (8) répliques d'échantillons négatifs, a été exécutée par deux (2) opérateurs, ce qui donne au total dix (10) séries de tests Revogene Carba C sur un (1) instrument Revogene.

Pour l'étude sur la contamination croisée, quatre (4) échantillons fortement positifs et quatre (4) échantillons négatifs ont été testés dans chacune des séries par alternance entre échantillons positifs et négatifs. Au total, dix (10) séries ont été exécutées à l'aide du test Revogene Carba C par deux (2) opérateurs sur un (1) instrument Revogene.

Aucune contamination croisée ou par recirculation de *bla_{KPC}* n'a été observée.

REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

Une étude a été menée pour évaluer la reproductibilité et la précision du test Revogene Carba C, notamment entre les laboratoires, entre les lots et dans un même laboratoire.

Une étude sur la reproductibilité entre les laboratoires a été menée à trois (3) centres par deux (2) opérateurs dans chaque centre sur une période de cinq (5) jours et à l'aide d'un (1) lot de kits de dosage Revogene Carba C. Au total, 120 répliques de chacune des dix (10) souches bactériennes positives non sensibles aux carbapénèmes, chacune hébergeant un (1) gène de résistance ciblé par le test Revogene Carba C (n = 2 souches par gène de résistance), ont été analysés. Au total, 240 répliques de la souche bactérienne négative non sensible aux carbapénèmes et non porteuse d'un des gènes de résistance ciblés par le test ont été analysés.

L'étude sur la reproductibilité entre les lots a été menée à un (1) centre par deux (2) opérateurs sur une période de 15 jours et à l'aide de trois (3) lots de kits de dosage Revogene Carba C (5 jours par lot de kits). Au total, 120 répliques de chacune des dix (10) souches bactériennes positives non sensibles aux carbapénèmes, chacune hébergeant un (1) gène de résistance ciblé par le test Revogene Carba C (n = 2 souches par gène de résistance), ont été analysés. Au total, 240 répliques de la souche bactérienne négative non sensible aux carbapénèmes et non porteuse d'un des gènes de résistance ciblés par le test ont été analysés.

La précision dans un même laboratoire a été établie à l'aide des données obtenues du lot de kit n° 1 analysé par deux (2) opérateurs au centre n° 1 sur une période totale de cinq (5) jours. Au total, 40 répliques de chacune des dix (10) souches bactériennes positives non sensibles aux carbapénèmes, chacune hébergeant un (1) gène de résistance ciblé par le test Revogene Carba C (n = 2 souches par gène de résistance), ont été pris en compte dans l'analyse. Au total, 80 répliques de la souche bactérienne négative non sensible aux carbapénèmes et non porteuse d'un des gènes de résistance ciblés par le test ont également été pris en compte.

Toutes les souches ont été analysées à partir de suspensions McFarland (McF) 0,5 normalisées.

En ce qui a trait à la reproductibilité entre laboratoires, le pourcentage de concordance globale a été de 100 % (120/120) pour chaque souche positive et de 98,8 % (237/240) pour la souche négative (Tableau 9). En ce qui a trait à la reproductibilité entre les lots, le pourcentage de concordance globale a été de 100 % (120/120) pour chaque souche positive et de 99,6 % (239/240) pour la souche négative (Tableau 10). Les valeurs Ct (nombre limite de cycles) moyennes, ainsi que les composants de variance de l'écart-type (ET) et du coefficient de variation (CV), sont présentées aux Tableaux 9 et 10.

En ce qui a trait à la précision dans un même laboratoire, le pourcentage de concordance a été de 100 % (40/40) pour chaque souche positive et de 100 % (80/80) pour la souche négative (Tableau 11).

Tableau 9. Résultats des études sur la reproductibilité entre laboratoires réalisées au moyen d'un (1) lot de kits de dosage Revogene Carba C

Espèces	Gène de résistance et variante	Centre 1		Centre 2		Centre 3		Résultats globaux/total	Pourcentage de concordance global ¹	IC globale à 95 %	Valeurs Ct ²		
		Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance				Moyenne globale	ÉT	% CV
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,7	1,6	5,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,6	1,3	4,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,5	2,1	7,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,4	2,2	7,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,3	1,0	3,1
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,2	1,5	4,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,5	1,4	4,8
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,5	1,9	6,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	27,6	1,0	3,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,5	1,2	4,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	Négatif	80/80	100 %	79/80	98,8 %	78/80	97,5 %	237/240	98,8 %	96,4 %-99,6 %	34,9	1,9	5,5

¹ Pour la souche négative, le pourcentage de concordance a été calculé à partir des résultats négatifs.

² Pour les gènes de résistance et les variantes, les valeurs Ct indiquées correspondent au gène précisé. Pour la souche négative, les valeurs Ct indiquées correspondent au contrôle de procédé.

Tableau 10. Résultats de l'étude sur la reproductibilité entre les lots menée à un (1) centre au moyen de trois (3) lots de kits de dosage Revogene Carba C

Espèces	Gène de résistance et variante	Lot 1		Lot 2		Lot 3		Résultats globaux/total	Pourcentage de concordance global ¹	IC globale à 95 %	Valeurs Ct ²		
		Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance	Résultats/total	Pourcentage de concordance				Moyenne globale	ÉT	% CV
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,0	1,1	3,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,2	1,4	4,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,6	2,2	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,8	2,3	7,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,5	1,4	4,8
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,9	1,5	5,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,2	1,5	5,2
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,6	1,6	5,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	27,5	1,0	3,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,1	1,4	4,8
<i>Enterobacter cloacae</i>	Négatif	80/80	100 %	79/80	98,8 %	80/80	100 %	239/240	99,6 %	97,7 %-99,9 %	33,0	2,9	8,8

¹ Pour la souche négative, le pourcentage de concordance a été calculé à partir des résultats négatifs.² Pour les gènes de résistance et les variantes, les valeurs Ct indiquées correspondent au gène précisé. Pour la souche négative, les valeurs Ct indiquées correspondent au contrôle de procédé.

Tableau 11. Résultats de l'étude sur la précision dans un même laboratoire menée à un (1) centre au moyen d'un (1) lot de kits de dosage Revogene Carba C

Espèces	Gène de résistance et variante	Pourcentage de concordance global ¹	IC globale à 95 %
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100 % (40/40)	91,2 %-100,0 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	Négatif	100 % (80/80)	95,4 %-100,0 %

¹ Pour la souche négative, le pourcentage de concordance a été calculé à partir des résultats négatifs.**ÉTIQUETAGE ÉLECTRONIQUE**Les documents liés à ce produit sont accessibles en ligne à l'adresse suivante: www.meridianbioscience.com/pi. De plus, vous pouvez obtenir des exemplaires papier de ces documents en communiquant avec votre distributeur local ou en composant le numéro de téléphone inscrit sur la boîte du kit.



Carba C

Para uso con Revogene®

REF 410500

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*



Rx Only

USO PREVISTO

El ensayo Revogene® Carba C, que se realiza con el equipo Revogene, es una prueba diagnóstica cualitativa *in vitro*, diseñada para la detección y diferenciación de secuencias de genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{Ipo} OXA-48*, y *bla_{IMP}* relacionadas con colonias puras de *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* no susceptibles a carbapenems, cuando se cultivan en agar sangre o en agar MacConkey. La prueba utiliza reacción en cadena de la polimerasa (PCR) automatizada, en tiempo real.

El ensayo Revogene Carba C se debe utilizar junto con otras pruebas de laboratorio, como las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fenotípica. Un resultado negativo del ensayo Revogene Carba C no excluye la presencia de otros mecanismos de resistencia.

El ensayo Revogene Carba C está previsto como una ayuda para el control de la infección en la detección de bacterias no susceptibles a carbapenems, que colonizan en pacientes que se encuentran en ámbitos sanitarios. La identificación de un gen metalo-β-lactamasa *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* o *bla_{VIM}* (es decir, los genes que codifican las metalo-β-lactamas IMP, NDM y VIM respectivamente) puede ser de utilidad para los médicos a la hora de determinar las estrategias terapéuticas adecuadas para pacientes con infecciones conocidas o sospechadas no susceptibles a carbapenems.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La resistencia a los carbapenems puede deberse a diversos mecanismos, uno de los cuales es la producción de carbapenemas. Las carbapenemas son enzimas heterogéneas que pueden hidrolizar antibióticos carbapenems¹. Los genes que codifican carbapenemas se ubican, principalmente, en elementos móviles tales como plásmidos, lo que facilita su diseminación entre diferentes especies de bacterias. Los plásmidos que portan genes que codifican carbapenemas de clases A (KPC), B (IMP, NDM, VIM) y D (tipo OXA-48) se han propagado por fuerza de las instituciones sanitarias y causan infecciones críticas que se adquieren en la comunidad². Las bacterias que albergan genes plásmidicos suelen conocerse como organismos productores de carbapenemas (CPO) u organismos resistentes a carbapenems (CRO).

Los bacilos gramnegativos de *Enterobacteriaceae* forman parte de la flora intestinal normal y se reportan como anfitriones de genes de carbapenemas. Las *Enterobacteriaceae* no susceptibles a antibióticos carbapenems gracias a la producción de carbapenemas se conocen como *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemas (EPC). Las EPC pueden causar infecciones en casi cualquier parte del cuerpo. Por ejemplo, infecciones en el torrente sanguíneo y en el tracto urinario, neumonía asociada al respirador y abscesos intraabdominales³. El tratamiento de las infecciones causadas por estos organismos es sumamente difícil, debido a que son resistentes a diversos fármacos y, por ende, generan altas tasas de mortalidad⁴.

Las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* son dos (2) patógenos oportunistas principales del grupo de bacilos gramnegativos no fermentadores. Dado que, entre estos organismos es habitual la resistencia antibiótica intrínseca a múltiples clases de antibióticos, a menudo se utilizan carbapenems para el tratamiento⁵. Los bacilos gramnegativos no fermentadores están desarrollando, también, una resistencia cada vez mayor a los antibióticos carbapenems, lo que reduce las opciones terapéuticas. Las bacterias gramnegativas no fermentadoras, no susceptibles a carbapenems gracias a la producción de carbapenemas, se conocen como no fermentadoras productoras de carbapenemas (CP-NF). Las CP-NF se pueden recuperar de cualquier parte del cuerpo, pero se asocian, más frecuentemente, con neumonías adquiridas en la asistencia médica⁶.

La identificación temprana y el aislamiento de pacientes colonizados o infectados son medidas de control de infección clave que limitan la propagación de estos organismos en ámbitos sanitarios y contribuyen a orientar mejor el tratamiento.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo Revogene Carba C puede brindar resultados a partir de una (1) a ocho (8) muestras en, aproximadamente, 70 minutos, utilizando colonias aisladas de *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa*, no susceptibles a carbapenems. El ensayo minimiza la intervención del operador, desde la carga de la muestra en el cartucho de microfluidos de un solo uso (PIE) hasta el resultado final.

La prueba se realiza utilizando el equipo Revogene, que automatiza la homogeneización de muestras y la dilución, la lisis celular, la amplificación de ADN, así como la detección de los productos de PCR amplificados. Solo se necesita la intervención del usuario para preparar una suspensión bacteriana estandarizada a partir de colonias aisladas caracterizadas no susceptibles a carbapenems, inocular la muestra dentro del tubo de tampon para muestras (TTM), descargar las muestras del paciente en el tubo de tampon para muestras (TTM), transferir la muestra desde el TTM al PIE y colocar los PIE en la cinta de Revogene.

Cada PIE es un dispositivo cerrado totalmente integrado, en el que una muestra se dispensa y se procesa mediante distintas cámaras y canales microfluídicos que permiten procesar las muestras (esto es, homogeneización y dilución de muestras, lisis celular y extracción de ADN) y realizar los pasos siguientes de la PCR en tiempo real (**Figura 1**). El líquido de una sola muestra se transfiere mediante centrifugado de una (1) cámara a la siguiente de la secuencia y todos los reactivos específicos para la PCR se incorporan y secan en los pocillos de PCR. Hay un Control de proceso (CdP) integrado en cada PIE para verificar el procesamiento de muestras y los pasos de amplificación, como la verificación de sustancias potencialmente inhibidoras o de fallos en los microfluidos, los reactivos o el equipo. Los productos amplificados se detectan en tiempo real, utilizando sondas químicas TaqMan® específicas de la diana.

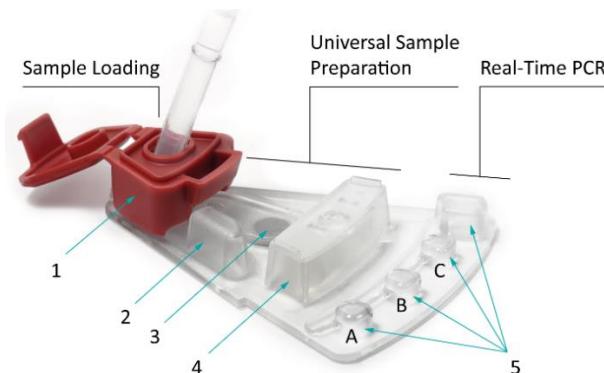


Figura 1. Vista superior de un PIE.
1: Cámara de carga de la muestra, **2:** Cámara de rebote,
3 Cámara de homogeneización que contiene un CdP, **4:** Cámara de dilución/lisis,
5: Tres (3) pocillos de PCR (de A a C de izquierda a derecha) y una (1) cámara de residuos (a la derecha).

El Revogene puede procesar entre una (1) y ocho (8) muestras simultáneamente en una sola serie analítica. La cinta debe contener ocho (8) PIE para mantener el equilibrio termodinámico durante la serie analítica. Al completarse una serie analítica, el sistema computa los resultados a partir de señales de fluorescencia medidas y algoritmos de cálculo integrados. El usuario puede usar el puerto USB o la opción de conectividad para imprimir, transferir o almacenar los resultados que se muestran en la pantalla táctil.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit Revogene Carba C contiene suficientes reactivos y materiales para procesar 24 muestras. El kit contiene los siguientes materiales:

1. 24 dispositivos de transferencia desechables (DTD): pipeta plástica con marcas de volumen mínimo y máximo, para transferir la muestra del TTM al PIE.
2. 24 tubos de tampon de muestra (TTM): tubo que contiene una solución tampon de TE 1X (Tris-HCl pH 8.0/EDTA.Na₂) como tampon de dilución y conservación para la muestra.
3. 24 bolsas individuales, cada una de ellas con un (1) cartucho microfluídico Carba C (PIE): dispositivo integrado que contiene reactivos secos para permitir el procesamiento de muestras y pasos de PCR en tiempo real, para la amplificación y detección de secuencia de genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{Ipo} OXA-48*, y *bla_{IMP}*. Cada PIE incluye un CdP, sondas y cebadores específicos del gen *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-Ipo} 48* y *bla_{IMP}*, dNTPs, tampon y ADN polimerasa.

MATERIALES NECESARIOS, PERO NO SUMINISTRADOS

1. Revogene® (n.º de cat. 610210).
2. Guantes desechables sin polvo.
3. Torundas estériles desechables.
4. Solución salina (se recomienda 0,45 % a 0,9 % de NaCl).
5. Placa de agar sangre o agar MacConkey.
6. Disco de meropenem de 10 µg (discos para prueba de sensibilidad antimicrobiana BD BBL™ Sensi-Disc™, n.º de cat. 231704 o equivalente).
7. Agitadora vortical con una velocidad máxima de, al menos, 3200 rpm (VWR n.º de cat. 58816-121 o equivalente).
8. Densímetro (VWR n.º de cat. 89402-910 o equivalente) o tarjeta con fondo blanco y líneas negras contrastantes (tarjeta de Wickerham para lectura de turbiedad, 2 x 3 pulgadas, en lo posible con franjas negras; n.º de cat. Z08 o equivalente).
9. Micropipeta calibrada (P20 recomendada, VWR n.º de cat. 89079-964 o equivalente).
10. Puntas para micropipetas resistentes a los aerosoles libres de ARNasa y ADNasa, (se recomiendan puntas de longitud extendida; Sarstedt n.º de cat. 70.1189.215 o equivalente).
11. Gradilla de muestras (núm. cat. 132539; opcional).
12. PIE MOCK (n.º de cat. 610208; opcional).

AVISO Y PRECAUCIONES

1. El ensayo Revogene Carba C solamente se puede utilizar con Revogene.
2. No use el kit si la etiqueta que sella la caja externa está rota al recibir el producto.
3. No utilice los PIE si las bolsitas protectoras están abiertas o rotas al recibir el producto.
4. No intercambie DTD, tubo de tampón para muestras ni PIE entre lotes de kits.
5. Cada PIE y DTD de un solo uso se utilizan para procesar una (1) sola muestra. No reutilice el PIE ni la DTD.
6. Manipule todas las muestras como si fueran infecciosas, de acuerdo con las prácticas recomendadas de laboratorio que se describen en Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁷ y en el documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁸.
7. Use guantes desechables sin polvo al manipular las muestras y lávese las manos minuciosamente después de hacerlo.
8. El PIE contiene reactivos secos. No se debe abrir la bolsita protectora hasta que todo esté listo para realizar la prueba.
9. Deseche los reactivos no utilizados y los desechos de acuerdo con la legislación local, estatal, provincial, federal o nacional aplicable.
10. No abra ni rompa el PIE después de su uso. La tapa y los precintos del PIE evitan la contaminación por productos de amplificación o partículas infecciosas.
11. No utilice un PIE que se haya caído, que haya recibido sacudidas o que se haya invertido después de cargar la muestra, ya que esto puede provocar resultados no válidos.
12. No utilice kits que hayan superado la fecha de caducidad indicada.
13. No refrigerar los PIE cargados.
14. Cada serie analítica se debe realizar con ocho (8) PIE en la cinta del Revogene, de manera de mantener un equilibrio termodinámico y mecánico durante la ejecución de la serie. Coloque los MOCK PIE o los PIE de ensayo, cargados con el tampón para muestras, en posiciones vacías, si se analizan menos de ocho (8) muestras.
15. Las normas y regulaciones locales, estatales y federales para la notificación de enfermedades declarables se actualizan constantemente y especifican una cantidad de organismos que son importantes para la vigilancia y la investigación de brotes^{9,10}. Los laboratorios tienen la responsabilidad de respetar las normas estatales o locales relacionadas con los patógenos declarables. Asimismo, deben consultar a los laboratorios de salud pública locales o estatales para obtener indicaciones sobre aislamiento y presentación de muestras clínicas.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Guarde el kit Revogene Carba C a una temperatura comprendida entre 2 C y 25 C. La data di scadenza è riportante sull'etichetta del kit.
2. No abra las bolsitas hasta que no esté todo listo para realizar las pruebas. Una vez abierta la bolsita, los PIE se deben utilizar en menos de una (1) hora.
3. El TTM inoculado se puede almacenar a 25 C durante un máximo de cuatro (4) días o a una temperatura comprendida entre 2 C y 8 C durante un máximo de siete (7) días.

INSTRUCCIONES DE USO

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. Los organismos se deben identificar como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* y el estado de no susceptibilidad a carbapenems se debe determinar de acuerdo con el folleto del paquete de discos de antibióticos o con la última versión de los estándares CLSI M100⁹ antes de realizar la prueba con el ensayo Revogene Carba C.
2. Inocule el organismo en una placa de agar sangre o agar MacConkey, estriada para aislamiento, y coloque un disco de meropenem de 10 µg en el primer cuadrante, para garantizar que el aislado conserve su no susceptibilidad a carbapenems.
3. Incube la placa a 35 C durante 18 a 24 horas, en condiciones aeróbicas.
4. Prepare una suspensión de 0,5 de McFarland estándar en solución salina, recogiendo colonias aisladas no susceptibles a carbapenems, seleccionadas en las placas de agar incubadas, cerca del disco de meropenem, con una torunda estéril.
5. Adapte la suspensión para lograr una turbiedad equivalente al estándar de 0,5 de McFarland. Utilice un dispositivo fotométrico o, si el procedimiento se realiza de forma visual, una iluminación adecuada para comparar la suspensión y el estándar de 0,5 de McFarland con una tarjeta con fondo blanco y líneas negras contrastantes. Esto da como resultado una suspensión que contiene, aproximadamente, 1 a 2 x 10⁸ unidades formadoras de colonias (CFU)/mL.

PREPARACIÓN DEL TTM

1. Saque un (1) TTM de la caja del kit por cada muestra que se vaya a analizar.
2. Identifique (o etiquete) el TTM con la identificación adecuada de la muestra sin tapar ni escribir sobre el código de barras. Ponga el TTM en la gradilla de muestras de Revogene, en su caso.
3. Agite la suspensión de 0,5 de McFarland a velocidad máxima durante 15 segundos.
4. Con ayuda de una micropipeta, aspire 15 µL de la suspensión de 0,5 de McFarland estándar.
5. Quite la tapa del TTM y dispensese la porción de McFarland en el TTM, teniendo cuidado de no producir aerosoles. Pipete el líquido hacia arriba y hacia abajo, para garantizar la transferencia completa de la porción. Solo puede haber abierto un (1) tubo de tampón (TTM) para muestras en cada momento.
6. Vuelva a colocar la tapa en el TTM, ciérrela firmemente y colóquelo en la gradilla de muestras (si se ha utilizado una).
7. Si hay más muestras para pruebas, repita el paso 1 al 6.
8. Cuando se hayan procesado todas las muestras, continúe con el paso 9 (preparación del PIE).

PREPARACIÓN DEL PIE

NOTA: Procése de a una (1) muestra a la vez.

9. Agite el TTM durante al menos 15 segundos a velocidad máxima (\geq 3200 rpm), con una agitadora vortical.
10. Abra el precinto de la bolsa del PIE y saque el PIE. Después de abrirlo, el PIE se debe utilizar en un plazo de una (1) hora.
11. Saque un DTD de la caja del kit y aspire el tampón de muestra (TM) inoculado apretando del todo el bulbo. El nivel de líquido en la DTD debe estar entre las dos marcas (Figura 2). Si el nivel de líquido no está entre las dos marcas, apriete la perilla hasta el final para descargar el volumen del tampón de la muestra por completo en el TTM y repita este paso.
12. Descargue por completo el tampón de la muestra contenido en la DTD, en la cámara de carga de la muestra del PIE (Figura 1). Asegúrese de no tocar los bordes externos ni el fondo de la cámara de carga de la muestra con la DTD.
13. Cierre la tapa del PIE firmemente. Ponga el PIE en la gradilla de muestras, en su caso. No refrigerar los PIE cargados.
14. Si hay más muestras para pruebas, prepárelas repitiendo los pasos del 9 al 13. Luego, vaya al paso 1 del apartado FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA REVOGENE.

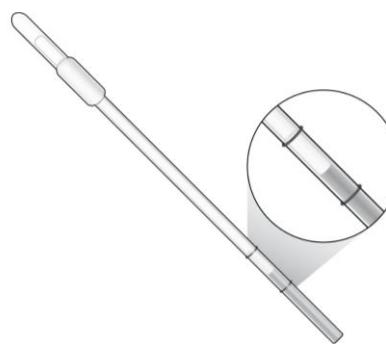


Figura 2.

Representación de un nivel adecuado de tampón de muestra (TM) usando la herramienta de transferencia desecharable (DTD).

FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA REVOCENE

NOTA 1: Cada serie analítica se debe realizar con ocho (8) PIE en Revogene. Si se van a procesar menos de ocho (8) muestras, llene los espacios vacíos con PIE MOCK*.

NOTA 2: Consulte el Manual del operador de Revogene¹² para obtener más información sobre la preparación y el uso del Revogene.

1. Encienda el Revogene (si todavía no lo hizo). El software se iniciará automáticamente.
2. Para iniciar sesión, introduzca el <nombre de usuario> y la <contraseña> y toque <Iniciar sesión>. El menú principal aparece automáticamente.
3. Toque <Config. serie analítica>.
4. Introduzca el número de identificación de la muestra con el escáner de códigos de barras o a mano. Para la introducción manual, toque el icono del lápiz de la línea <Escanear o especificar ID de la muestra>.
5. Introduzca los códigos de barras de los PIE y de los tubos de tampón para muestras con el escáner de códigos de barra, colocando los PIE con cuidado casi en vertical delante del escáner. De manera alternativa, puede introducir manualmente los códigos de barras del TTM y los PIE. Para ello, toque el icono del lápiz en las líneas correspondientes. Maneje los PIE con cuidado, sin sacudirlos ni dejarlos caer.
6. (Opcional) Toque el icono del lápiz de la línea <Añadir comentarios> y escriba un comentario.
7. Inserte el PIE en el Revogene en cualquiera de las posiciones de la cinta. El software asociará automáticamente la muestra y el tubo de tampón para muestras con el PIE correcto.
8. Confirme que el PIE esté insertado en el equipo. Para hacerlo, toque <Aceptar> en la línea <Introducir el PIE en el equipo> y repita del paso 4 al 8 para todas las muestras. Si se están probando menos de ocho (8) PIE, cargar PIE MOCK* en las posiciones restantes de la cinta. No hace falta escanearlo al insertar el PIE MOCK en el Revogene.
9. Después de haber insertado todos los PIE en la cinta, pulse <Siguiente>.
10. Si ha introducido PIE MOCK en la cinta, siga las instrucciones de la pantalla.
11. Escanee la anilla de sujeción y colóquela en la cinta. Cierre la tapa del equipo.
12. Toque <Iniciar> para comenzar la serie analítica.
13. Almacene el TTM inoculado en condiciones adecuadas (consulte el apartado ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD) para obtener información sobre repetición de pruebas, en caso de ser necesario.

*Si no hay ningún PIE MOCK disponible, utilice otros PIE de ensayo sin usar, rellenos con tampón para muestras (neutro).

VISUALIZAR Y EXPORTAR RESULTADOS

1. Una vez finalizada la serie analítica, la tapa se abre automáticamente.
2. Si se ha cerrado la sesión en Revogene, introduzca de nuevo el <nombre de usuario> y la <contraseña> y toque <Iniciar sesión>. El menú principal aparece automáticamente.
3. Toque el icono **Resultados** para acceder a los resultados de la prueba. La ventana **Resultados** muestra los resultados notificados para cada muestra (**Figura 3**).



Figura 3.
Ventana Resultados, que muestra los resultados notificados para cada muestra.

4. Toque <Última serie> para ver los resultados de la última prueba.
5. Toque <Informe> para ver el resultado diana específico de cada muestra. Consulte la sección INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS, para confirmar si se requiere adoptar alguna medida adicional, según los resultados diana obtenidos.
- NOTA: En caso de repetir la prueba de una muestra, se deben notificar todos los resultados positivos, tanto de la prueba inicial como de la repetida, incluso en caso de discrepancia entre los resultados de la misma diana.
6. En <Última serie>, seleccione las muestras para las que se deben exportar informes de resultados. Para seleccionar todas las muestras a la vez, haga clic en la casilla ubicada en la esquina superior izquierda de la pantalla.
7. Toque <Exportar> y guarde donde corresponda (por ej. en una llave USB).
8. (Opcional) Pulse <Buscar> para buscar una muestra determinada y sus resultados.
9. Retire la anilla de sujeción y los PIE de Revogene. Los PIE utilizados se deben eliminar en los contenedores de desechos de muestras adecuados, según las prácticas estándar de su institución.

CONTROL DE CALIDAD

Los procedimientos de control de calidad supervisan la exactitud y la precisión del proceso de análisis. Cada laboratorio debe establecer el número, el tipo y la frecuencia de uso de los materiales de control de los ensayos según las normas aplicables o las agencias acreditadoras. En su caso, se puede aplicar el procedimiento descrito a continuación, en función de los procedimientos y políticas locales.

CONTROL DE PROCESO

Cada PIE contiene un control de proceso (CdP) que permite verificar la homogeneización de muestras, la dilución de muestras, la lisis celular, la inhibición de la amplificación de ADN y los fallos de reactivos de ensayo.

CONTROLES EXTERNOS

NOTA: Para cada preparación de control externo, se debe utilizar DTD, tubo de tampón para muestras y PIE independientes.

1. Las prácticas recomendadas de laboratorio incluyen el uso de materiales de control. El usuario debe seguir las directrices adecuadas en relación con la realización de controles externos. Es recomendable realizar un (1) control externo positivo y un (1) control externo negativo al menos una vez al día, hasta conseguir la validación de procesos adecuada con el ensayo Revogene Carba con todas las configuraciones de laboratorio.
2. Meridian Bioscience, Inc. no suministra materiales de control externo. El software de Revogene no utiliza los controles externos para la interpretación de resultados de pruebas de muestras. Los controles externos se manejan como si fueran muestras.

A continuación, se recomiendan y enumeran cinco (5) controles externos positivos diferentes y un (1) control externo negativo.

Controles externos positivos

Como control externo positivo, se recomienda una suspensión de 0,5 de McFarland estándar de colonias aisladas de cepas caracterizadas no susceptibles a carbapenems, disponibles comercialmente, diluidas en solución salina. Las cepas recomendadas son las siguientes:

- *K. pneumoniae bla_{KPC-2}* (CCUG 59348),
- *K. pneumoniae bla_{NDM-1}* (ATCC® BAA-2146™),
- *K. pneumoniae bla_{VIM-1}* (NCTC 13440),
- *E. coli bla_{OXA-48}* (ATCC® BAA-2523™),
- *E. coli bla_{IMP-1}* (NCTC 13476).

Cada uno de los cinco (5) controles externos positivos recomendados debe analizar de forma alternada.

Control externo negativo

Como control externo negativo, se recomienda una suspensión de 0,5 de McFarland estándar, en solución salina de colonias aisladas a partir de una cepa representativa, no susceptible a carbapenems, de *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* o *P. aeruginosa* que no porte ninguno de los genes diana del ensayo Revogene Carba C.

PREPARACIÓN DE CONTROLES EXTERNOS

1. Inocule el organismo en una placa de agar sangre o agar MacConkey, estriada para aislamiento, y coloque un disco de meropenem de 10 µg en el primer cuadrante, para garantizar que el aislado conserve su no susceptibilidad a carbapenems.
2. Incube la placa a 35 °C durante 18 a 24 horas, en condiciones aeróbicas.
3. Prepare una suspensión de 0,5 de McFarland estándar en solución salina, recogiendo colonias aisladas seleccionadas en la placa de agar incubada cercana al disco de meropenem, con una torunda estéril.
4. Adapte la suspensión para lograr una turbiedad equivalente al estándar de 0,5 de McFarland. Utilice un dispositivo fotométrico o, si el procedimiento se realiza de forma visual, una iluminación adecuada para comparar la suspensión y el estándar de 0,5 de McFarland con una tarjeta con fondo blanco y líneas negras contrastantes. Esto da como resultado una suspensión que contiene, aproximadamente, 1 a 2 x 10⁸ unidades formadoras de colonias (CFU)/mL.

Procese y analice las suspensiones de control externo, de conformidad con los apartados PREPARACIÓN DEL TTM/PREPARACIÓN DEL PIE. A continuación, siga las instrucciones del apartado FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA REVOGENE.

REPETIR PROCEDIMIENTO DE PRUEBAS

RESULTADO INDETERMINADO O NO RESUELTO

Cuando se obtiene un resultado diana Indeterminado (IND) o No resuelto (UNR) para una muestra, se debe repetir la prueba con el TTM inoculado correspondiente, dentro del tiempo especificado que se describe en el apartado ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD.

Utilice el TTM inoculado correspondiente, para cargar un nuevo PIE desde el mismo lote de kit y deseche el TTM sin utilizar. Siga los pasos 9 a 13 del apartado PREPARACIÓN DEL PIE para cada muestra y, a continuación, los del apartado FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA REVOGENE. Si es necesario, se puede inocular un nuevo TTM a partir de una nueva suspensión de 0,5 de McFarland estándar.

Resultado indeterminado o no resuelto para un control externo

Cuando se obtiene un resultado diana Indeterminado (IND) o No resuelto (UNR) para un control externo, la serie analítica no es válida. Se debe repetir la prueba de controles externos positivos y negativos, así como de las muestras incluidas en la misma serie, a partir del TTM inoculado correspondiente. Todos los TTM inoculados se deben probar dentro del tiempo especificado que se describe en el apartado ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD.

Utilice el TTM inoculado correspondiente para cargar un nuevo PIE desde el mismo lote de kit. Siga las instrucciones del apartado PREPARACIÓN DEL PIE desde el paso 9. A continuación, siga las instrucciones del apartado FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA REVOGENE.

Resultado negativo inesperado o positivo inesperado para un control externo

Cuando se obtiene un resultado diana negativo inesperado o positivo inesperado para un control externo, la serie analítica no es válida. Se debe repetir la prueba de controles externos positivos y negativos, con un nuevo juego de controles externos, como se describe en el apartado CONTROL DE CALIDAD. Se deben revisar las técnicas de manipulación y preparación.

Además, se deben repetir las pruebas de todas las muestras incluidas en la serie analítica, con el TTM inoculado original correspondiente, dentro del plazo definido en el apartado ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD, con un nuevo juego de controles externos. Consulte las instrucciones del apartado CONTROL DE CALIDAD, para preparar controles externos nuevos.

Utilice el TTM inoculado correspondiente para cargar un nuevo PIE desde el mismo lote de kit. Siga las instrucciones del apartado PREPARACIÓN DEL PIE desde el paso 9. A continuación, siga las instrucciones del apartado FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA REVOGENE.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El equipo Revogene computa los resultados a partir de las señales de fluorescencia medidas mediante algoritmos de cálculo integrados. Los resultados están disponibles en la ventana "Resultados". A continuación, se enumeran los posibles resultados notificados.

Muestra Tipo	Símbolos que se muestran en la pantalla del usuario	Resultados notificados	Interpretación	Paso adicional
Colonia aislada		Positivo	Se ha detectado ADN de KPC, NDM, VIM, tipo OXA-48 e IMP diana.	No se requiere ningún paso adicional.
		Negativo	No se ha detectado ADN de KPC, NDM, VIM, tipo OXA-48 e IMP diana.	No se requiere ningún paso adicional.
		Positivo/Negativo	Se ha detectado ADN de KPC o NDM o VIM o tipo OXA-48 o IMP diana. Y Si no se ha detectado ADN de KPC o NDM o VIM o tipo OXA-48 o IMP diana.	No se requiere ningún paso adicional.
		No resuelto	Error de amplificación/detección en el control de proceso. Se puede deber a la presencia de muestras inhibidoras o a fallos de microfluidos o reactivos.	Se debe repetir la prueba (consulte el apartado REPETIR PROCEDIMIENTO DE PRUEBAS).
		Positivo/ No resuelto	Se ha detectado ADN de KPC o NDM o VIM o tipo OXA-48 o IMP diana. Y Error de amplificación/detección en el control de proceso. Se puede deber a la presencia de muestras inhibidoras o a fallos de microfluidos o reactivos.	Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado REPETIR PROCEDIMIENTO DE PRUEBAS). Todos los resultados positivos iniciales se deben considerar como positivos, incluso si la prueba repetida indica un resultado diferente para estas dianas.
		Indeterminado	No se puede informar un resultado, probablemente debido a un error detectado en Revogene durante el procesamiento del ensayo, el análisis de los datos o si se interrumpe la serie analítica.	Se debe repetir la prueba (consulte las instrucciones en el apartado REPETIR PROCEDIMIENTO DE PRUEBAS).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El ensayo Revogene Carba C detecta secuencias de genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{Iipo} OXA-48*, y *bla_{IMP}* y no está destinado a la identificación de bacterias.
2. No se evaluó el rendimiento del ensayo Revogene Carba con bacterias diferentes a *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa*. Antes de realizar la prueba con el ensayo Revogene Carba C, es necesario identificar los organismos y determinar el estado de no susceptibilidad a carbapenems.
3. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* presentan una resistencia intrínseca a ertapenem. La determinación de la susceptibilidad a carbapenem de estas especies y la aplicabilidad del ensayo Revogene Carba C se deben basar en pruebas con meropenem, imipenem o doripenem.
4. El ensayo Revogene Carba C no es una herramienta de subtipado y no informa variantes de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{Iipo} OXA-48* y *bla_{IMP}*.
5. El ensayo Revogene Carba C solo debe utilizarse con el equipo Revogene y solo debe realizarlo personal con la formación adecuada.
6. Solo los PIE Revogene Carba C se pueden usar en una sola serie analítica. Los PIE de otros ensayos Revogene no son compatibles con el ensayo Revogene Carba C y no se deben utilizar.
7. Los resultados del ensayo Revogene Carba C se deben utilizar como complemento a las observaciones clínicas y a otra información disponible para el médico.
8. Pueden obtenerse resultados de prueba erróneos a causa de procedimientos incorrectos para preparar cultivos, manipular o almacenar las muestras, algún error técnico o mezcla de muestras. Para evitar errores en los resultados, es necesario seguir cuidadosamente las instrucciones de este folleto y las directrices establecidas en el Manual del operador de Revogene.
9. Si un PIE no está cerrado correctamente o si se ha caído una gota en los bordes de la cámara de carga de la muestra, se puede generar contaminación o resultados positivos inesperados.
10. El almacenamiento por un plazo superior al indicado en el apartado ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD para las muestras de TTM puede provocar resultados inesperados o inválidos.
11. Las mutaciones o los polimorfismos en secuencias de genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{Iipo} OXA-48* y *bla_{IMP}* actuales, nuevas o desconocidas pueden afectar la detección, dando como resultado falsos negativos.
12. Las predicciones *in silico* de la inclusividad de los cebadores y sondas Revogene Carba C se llevaron a cabo utilizando datos de secuencia disponibles en GenBank en 2018. No se ha realizado el análisis de nuevas secuencias de variantes de los genes de carbapenemas diana depositados en GenBank después de 2018.
13. Se desconoce el rendimiento del ensayo Revogene Carba C con genes de carbapenemas diana diferentes a *bla_{CTX-M}*, *bla_{AMP-C}*, *bla_{SHV}*, *bla_{SME}*, *bla_{TEM}* y *bla_{SPM}*.

VALORES ESPERADOS

Se evaluó un total de 512 aislados bacterianos no susceptibles a carbapenems durante el estudio clínico Carba C en tres (3) centros de Estados Unidos y Canadá. Los resultados del ensayo Revogene Carba C para cada gen diana en comparación con el método de referencia (una prueba de amplificación de ácido nucleico [NAAT] comercializada) se presentan en las Tablas 1 a 4.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CLÍNICO

El rendimiento del ensayo Revogene Carba C se estableció en un estudio clínico que se llevó a cabo en tres (3) centros de Estados Unidos y Canadá.

Se cultivaron aislados bacterianos caracterizados como *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* o *Pseudomonas aeruginosa* en placas de agar sangre y de agar MacConkey. Los aislados de *Enterobacteriaceae* fueron intermedios o resistentes a doripenem, ertapenem, imipenem o meropenem, según los estándares CLSI M02¹³. Los aislados de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron intermedios o resistentes a doripenem, imipenem o meropenem, puesto que son intrínsecamente resistentes a ertapenem. Las colonias aisladas en agar sangre y agar MacConkey se diluyeron en solución salina, para obtener una suspensión equivalente al estándar de 0,5 de McFarland, y se analizaron con el ensayo Revogene Carba C. El método de referencia consistió en una NAAT de alto rendimiento, aprobada por la FDA, para la detección de los genes de carbapenemas diana de colonias aisladas de organismos no susceptibles a carbapenems conocidos, cuyo rendimiento se estableció en comparación con la secuenciación de la PCR bidireccional y que se utilizaron según las instrucciones del fabricante.

La sensibilidad y especificidad se calcularon comparando los resultados del ensayo Revogene Carba C con el método de referencia. Se realizó un análisis de discrepancias en muestras con resultados discordantes entre el ensayo Revogene Carba C y la NAAT de referencia, utilizando un método de PCR alternativo, para la amplificación y detección de genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{Iipo} OXA-48* y *bla_{IMP}* seguidos por la secuenciación bidireccional del producto amplificado.

RESULTADOS

Durante el estudio clínico, se analizó un total de 532 aislados bacterianos (475 aislados de existencias clínicas y 57 aislados nuevos recogidos de manera prospectiva). Se excluyeron veinte aislados del análisis de rendimiento por alguno de los siguientes motivos: pertenecían a una especie no diana, su identidad no se había podido confirmar, mostraban susceptibilidad a carbapenem, había un error de laboratorio o no se habían obtenido resultados de PCR válidos. Por lo tanto, se utilizó un total de 512 aislados bacterianos, para establecer el rendimiento del ensayo Revogene Carba C, en comparación con el método de referencia.

La sensibilidad y especificidad del ensayo Revogene Carba C para la detección de cinco (5) genes de carbapenemas diana a partir de colonias cultivadas en agar sangre y agar MacConkey se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Un total de 24 aislados contenían más de un gen de carbapenemas, como se determinó mediante el ensayo Revogene Carba C. El contenido del gen de carbapenem informado de 21 de estos aislados se confirmó mediante el método de referencia. No obstante, el método de referencia solo detectó un gen de carbapenem en los otros tres (3) aislados.

Las tasas no informables iniciales (que combinan tasas de resultados indeterminados y no resueltos), a nivel del medio, fueron del 1,7 % (9/516) en agar sangre y del 1,4 % (7/516) en agar MacConkey. A nivel de la diana, desde el agar sangre, las tasas fueron del 1,7 % (9/516) para los genes diana *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{Iipo} OXA-48* y del 1,6 % (8/516) para el gen diana *bla_{VIM}*, con una tasa general del 1,7 % (9/516). En el agar MacConkey, las tasas no informables fueron del 1,4 % (7/516) en todas las dianas. Después de repetir la prueba, las tasas no informables fueron del 0,8 % (4/516) en todos los medios y genes diana.

El rendimiento del ensayo Revogene Carba C para cada grupo de organismos para agar sangre y agar MacConkey se muestran en las Tablas 3 y 4.

Tabla 1. Rendimiento del ensayo Revogene Carba C en colonias aisladas cultivadas en agar sangre

Diana	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilidad (95 % CI)	Especificidad (95 % CI)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98,9 % (96,2 - 99,7)	99,4 % (97,8 - 99,8)
KPC	512	113	3 ^b	395	1	99,1 % (95,2 - 99,8)	99,2 % (97,8 - 99,7)
Tipo OXA-48	512	65	3 ^c	444	0	100,0 % (94,4 - 100,0)	99,3 % (98,0 - 99,8)
IMP	512	27	19 ^d	466	0	100,0 % (87,5 - 100,0)	96,1 % (94,0 - 97,5)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100,0 % (93,1 - 100,0)	99,8 % (98,8 - 100,0)

N: número; TP: verdadero positivo; FP: falso positivo; TN: verdadero negativo; FN: falso negativo; CI: intervalo de confianza

Nota: El análisis de discrepancias consistió en cinco (5) PCR alternativas, seguidas por secuenciación bidireccional, y se realizó para todos los resultados diana discrepantes. Los resultados del análisis de discrepancias de 21/31 muestras coincidieron con los del ensayo Revogene Carba C.

^a Uno (1) de dos (2) fue NDM-1 positivo.^b Dos (2) de tres (3) fueron KPC-3/KPC-38 positivos.^c Uno (1) de tres (3) fue OXA-48 positivo. La investigación sugirió una contaminación cruzada con OXA-48 en el paso de la preparación de muestras en uno (1) de tres (3) aislados. El análisis de discrepancias no produjo una coincidencia de secuencia con la diana tipo OXA-48.^d Diecisiete (17) de 19 fueron positivos para IMP, incluida 1 (una) variante de IMP-4 (de Australia [2010]), 11 variantes IMP-13/IMP-37, una (1) de Argentina [2006], una (1) de América del Norte [2014], nueve (9) de Europa [2005-2015], una (1) variante de IMP-27/IMP-64 (de Canadá [2017]), una (1) variante de IMP-15 (de Argentina [2004]), una (1) variante de IMP-16 (de Brasil [2004]) y dos (2) variantes de IMP-62 (de Argentina [2006]). El análisis de discrepancias indicó diferencias potenciales en la cobertura de la variante IMP entre el ensayo Revogene Carba C y el método de referencia. La investigación sugirió una contaminación cruzada de IMP en el paso de la preparación de muestras en dos (2) de los 19 aislados, para los cuales el análisis de discrepancias no produjo una coincidencia de secuencias con el IMP diana.^e La investigación sugirió una contaminación cruzada con VIM en el paso de la preparación de muestras. El análisis de discrepancias no produjo una coincidencia de secuencia con el VIM diana, pero produjo una coincidencia de secuencia para el NDM diana.^f El análisis de discrepancias produjo una coincidencia de secuencia con la diana NDM-1 en uno (1) de dos (2) aislados y produjo una coincidencia de secuencia para la diana tipo OXA-48 en uno (1) de dos (2) aislados. El aislado OXA-48 positivo se clasificó como FP.

Tabla 2. Rendimiento del ensayo Revogene Carba C en colonias aisladas cultivadas en agar MacConkey

Diana	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilidad (95 % CI)	Especificidad (95 % CI)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98,9 % (96,2 - 99,7)	99,4 % (97,8 - 99,8)
KPC	512	114	3 ^b	395	0	100,0 % (96,7 - 100,0)	99,2 % (97,8 - 99,7)
Tipo OXA-48	512	65	2 ^c	445	0	100,0 % (94,4 - 100,0)	99,6 % (98,4 - 99,9)
IMP	512	27	21 ^d	464	0	100,0 % (87,5 - 100,0)	95,7 % (93,5 - 97,2)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100,0 % (93,1 - 100,0)	99,8 % (98,8 - 100,0)

N: número; TP: verdadero positivo; FP: falso positivo; TN: verdadero negativo; FN: falso negativo; CI: intervalo de confianza

Nota: El análisis de discrepancias consistió en cinco (5) PCR alternativas, seguidas por secuenciación bidireccional, y se realizó para todos los resultados diana discrepantes. Los resultados del análisis de discrepancias de 21/31 muestras coincidieron con los del ensayo Revogene Carba C.

^a Uno (1) de dos (2) fue NDM-1 positivo.^b Dos (2) de tres (3) fueron KPC-3/KPC-38 positivos.^c Uno (1) de dos (2) fue OXA-48 positivo. La investigación sugirió una contaminación cruzada con OXA-48 en el paso de la preparación de muestras en uno (1) de dos (2) aislados. El análisis de discrepancias no produjo una coincidencia de secuencia con la diana tipo OXA-48.^d Diecisiete (17) de 21 fueron positivos para IMP, incluida 1 (una) variante de IMP-4 (de Australia [2010]), 11 variantes IMP-13/IMP-37 (una (1) de Argentina [2006], una (1) de América del Norte [2014], nueve (9) de Europa [2005-2015], una (1) variante de IMP-27/IMP-64 (de Canadá [2017]), una (1) variante de IMP-15 (de Argentina [2004]), una (1) variante de IMP-16 (de Brasil [2004]) y dos (2) variantes de IMP-62 (de Argentina [2006]). El análisis de discrepancias indicó diferencias potenciales en la cobertura de la variante IMP entre el ensayo Revogene Carba C y el método de referencia. La investigación sugirió una contaminación cruzada de IMP en el paso de la preparación de muestras en cuatro (4) de los 21 aislados para los cuales el análisis de discrepancias no produjo una coincidencia de secuencia con el IMP diana.^e La investigación sugirió una contaminación cruzada con VIM en el paso de la preparación de muestras. El análisis de discrepancias no produjo una coincidencia de secuencia con el VIM diana, pero produjo una coincidencia de secuencia para el KPC diana.^f El análisis de discrepancias produjo una coincidencia de secuencia con la diana NDM-1 en uno (1) de dos (2) aislados y produjo una coincidencia de secuencia para la diana tipo OXA-48 en uno (1) de dos (2) aislados. El aislado OXA-48 positivo se clasificó como FP.

Tabla 3. Rendimiento del ensayo Revogene Carba C por categoría de organismo y por gen diana, para colonias aisladas cultivadas en agar sangre

Medio	Organismos	Diana	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilidad (95 % CI)	Especificidad (95 % CI)
Agar sangre	Enterobacteriaceae	NDM	306	85	1	219	1	98,8 % (93,7 - 99,8)	99,5 % (97,5 - 99,9)
		KPC	306	112	3	190	1	99,1 % (95,2 - 99,8)	98,4 % (95,5 - 99,5)
		Tipo OXA-48	306	64	3	239	0	100,0 % (94,3 - 100,0)	98,8 % (96,4 - 99,6)
		IMP	306	14	5	287	0	100,0 % (78,5 - 100,0)	98,3 % (96,1 - 99,3)
		VIM	306	12	0	294	0	100,0 % (75,8 - 100,0)	100,0 % (98,7 - 100,0)
	Pseudomonas aeruginosa	NDM	107	26	1	80	0	100,0 % (87,1 - 100,0)	98,8 % (93,3 - 99,8)
		KPC	107	0	0	107	0	N/D	100,0 % (96,5 - 100,0)
		Tipo OXA-48	107	1	0	106	0	100,0 % (20,7 - 100,0)	100,0 % (96,5 - 100,0)
		IMP	107	5	14	88	0	100,0 % (56,6 - 100,0)	86,3 % (78,3 - 91,6)
		VIM	107	39	0	68	0	100,0 % (91,0 - 100,0)	100,0 % (94,7 - 100,0)
	Acinetobacter baumannii	NDM	99	75	0	23	1	98,7 % (92,9 - 99,8)	100,0 % (85,7 - 100,0)
		KPC	99	1	0	98	0	100,0 % (20,7 - 100,0)	100,0 % (96,2 - 100,0)
		Tipo OXA-48	99	0	0	99	0	N/D	100,0 % (96,3 - 100,0)
		IMP	99	8	0	91	0	100,0 % (67,6 - 100,0)	100,0 % (96,0 - 100,0)
		VIM	99	1	1	97	0	100,0 % (20,7 - 100,0)	99,0 % (94,4 - 99,8)

N: número; TP: verdadero positivo; FP: falso positivo; TN: verdadero negativo; FN: falso negativo; CI: intervalo de confianza

Se detectó más de un (1) gen diana para algunos aislados

Tabla 4. Rendimiento del ensayo Revogene Carba C por categoría de organismo y por gen diana, en colonias aisladas cultivadas en agar MacConkey

Medio	Organismos	Diana	N	TP	FP	TN	FN	Sensibilidad (95 % CI)	Especificidad (95 % CI)
Agar MacConkey	<i>Enterobacteriaceae</i>	NDM	306	85	1	219	1	98,8 % (93,7 - 99,8)	99,5 % (97,5 - 99,9)
		KPC	306	113	3	190	0	100,0 % (96,7 - 100,0)	98,4 % (95,5 - 99,5)
		Tipo OXA-48	306	64	2	240	0	100,0 % (94,3 - 100,0)	99,2 % (97,0 - 99,8)
		IMP	306	14	5	287	0	100,0 % (78,5 - 100,0)	98,3 % (96,1 - 99,3)
		VIM	306	12	1	293	0	100,0 % (75,8 - 100,0)	99,7 % (98,1 - 99,9)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NDM	107	26	1	80	0	100,0% (87,1 - 100,0)	98,8 % (93,3 - 99,8)
		KPC	107	0	0	107	0	N/D	100,0 % (96,5 - 100,0)
		Tipo OXA-48	107	1	0	106	0	100,0 % (20,7 - 100,0)	100,0 % (96,5 - 100,0)
		IMP	107	5	14	88	0	100,0 % (56,6 - 100,0)	86,3 % (78,3 - 91,6)
		VIM	107	39	0	68	0	100,0 % (91,0 - 100,0)	100,0 % (94,7 - 100,0)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM	99	75	0	23	1	98,7 % (92,9 - 99,8)	100,0 % (85,7 - 100,0)
		KPC	99	1	0	98	0	100,0 % (20,7 - 100,0)	100,0 % (96,2 - 100,0)
		Tipo OXA-48	99	0	0	99	0	N/D	100,0 % (96,3 - 100,0)
		IMP	99	8	2	89	0	100,0 % (67,6 - 100,0)	97,8 % (92,3 - 99,4)
		VIM	99	1	0	98	0	100,0 % (20,7 - 100,0)	100,0 % (96,2 - 100,0)

N: número; TP: verdadero positivo; FP: falso positivo; TN: verdadero negativo; FN: falso negativo; CI: intervalo de confianza

Se detectó más de un (1) gen diana para algunos aislados.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ANALÍTICO

INCLUSIÓN

- Se determinó la inclusión del ensayo Revogene Carba C para 58 aislados no susceptibles a carbapenems de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* a partir de diversos orígenes geográficos y temporales.
- Dos (2) cepas con dos (2) genes de resistencia.
 - Once (11) cepas que incluyen cinco (5) variantes con el gen de resistencia *bla*_{IMP}.
 - Once (11) cepas que incluyen al menos tres (3) variantes con el gen de resistencia *bla*_{KPC}.
 - Catorce (14) cepas que incluyen cinco (5) variantes con el gen de resistencia *bla*_{NDM}.
 - Once (11) cepas que incluyen tres (3) variantes con el gen de resistencia *bla*_{Tipo OXA-48}.
 - Nueve (9) cepas que incluyen cuatro (4) variantes con el gen de resistencia *bla*_{VIM}.

Cada cepa se analizó a partir de una suspensión bacteriana de 0,5 de McFarland estándar, correspondiente a 1,5 a 3 x 10⁶ CFU/mL de TM. Se analizaron tres (3) réplicas por cepa con (3) lotes de kit Revogene Carba C distintos (1 réplica por lote de kit). Las 58 cepas se detectaron por medio del ensayo Revogene Carba C y se describen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Cepas no susceptibles a carbapenems analizadas para inclusividad con el ensayo Revogene Carba C.

Especies	Número de recogida	Gen de resistencia y variante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® BAA-2793™	KPC-2. VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23061	OXA-232, NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-1705™	KPC-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21587	KPC-2
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21578	KPC-4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CCRI-21581	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19587	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19570	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59413	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59348	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 56233	KPC-2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2340™	KPC ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13443	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2146™	NDM-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22255	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-21711	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22199	NDM-1
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22257	NDM-1
<i>Providencia stuartii</i>	CCRI-22256	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22254	NDM-4
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23064	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23464	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23065	NDM-6
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23066	NDM-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC® BAA-2468™	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 60138	NDM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19585	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22258	VIM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21588	VIM-2
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22261	VIM-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-22720	VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22259	VIM-19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13442	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22263	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22265	OXA-48
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22266	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22264	OXA-181
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22267	OXA-181
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23060	OXA-204
<i>Citrobacter freundii</i>	CCRI-23374	OXA-204
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2523™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2524™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 64452	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP-1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-19488	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19569	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19582	IMP-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21589	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19583	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19588	IMP-4
<i>Citrobacter youngae</i>	CCRI-21591	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19584	IMP-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21590	IMP-9
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22262	IMP-11

^aNo está disponible la identificación de la variante del gen de resistencia.

Por otra parte, se llevó a cabo un análisis *in silico* el 7 de noviembre de 2018, para evaluar la inclusividad de los cebadores y sondas de las dianas del ensayo Revogene Carba C. Para cada diana, se analizaron todas las secuencias de genes de resistencia *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{Tipo OXA-48} y *bla*_{IMP} incluidas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Se alineó una (1) secuencia representativa de cada variante conocida. La cantidad de variantes analizadas y que se preveía detectar se resume para cada diana en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Resumen de detección de variantes de gen de resistencia diana, basada en la predicción *in silico*.

Diana	Análisis con Revogene® Carba C			Predicción <i>in silico</i>		
	N.º de muestras	Variantes detectadas	Variantes no detectadas	Detectables ^a	Possiblemente detectables ^b	No detectables
KPC	12	2, 3, 4	Ninguna	De 2 a 38	Ninguna	N/D
NDM	15	1, 4, 5, 6, 7	Ninguna	1 a 24	Ninguna	N/D
IMP	11	1, 4, 8, 9, 11	Ninguna	1, 2, 4 a 6, 8 a 10, 13 a 20, 23 a 26, 28 a 30, 32, 33, 37, 38, 40, 42, 45, 47 a 49, 53 a 56, 59, 60, 62, 66, 69 a 72, 74 a 79	3, 7 ^c , 11 ^d , 21, 22, 27, 34, 41, 43, 44, 51, 52, 58, 61, 64, 67, 68, 73	12, 31, 35, 63
Tipo OXA-48	12	48, 181, 204, 232	Ninguna	48, 162, 181, 199, 204, 232, 244, 245, 252 ^e , 370, 484, 505, 514 ^f , 515 ^g , 519, 546 ^h , 547 ⁱ , 566	Ninguna	54 ^j , 163 ^k , 247 ^l , 405 ^m , 416 ⁿ , 436, 438 ^o , 439 ^p , 517, 535 ^q , 538 ^r , 567
VIM	10	1, 2, 10, 19	Ninguna	1 a 6, 8 a 12, 14 a 20, 23 a 46, 48 a 50, 52 a 55, 57, 59, 60	51, 56, 58	7, 13, 47

^aBasada en alineaciones con identidad y cobertura de consultas ≥ 95 % y valores E < 0,01.

^bEn función de alineaciones que presentan no más de dos (2) incompatibilidades de nucleótidos.

^cSe probó una cepa recombinante portadora de un gen IMP-7, con el ensayo Revogene Carba C, como complemento del estudio *in silico*, y se confirmó su detección.

^dSe probó una cepa clínica que portaba un gen IMP-11, con el ensayo Revogene Carba C, en el estudio de inclusividad analítica, y se confirmó su detección.

^eVariantes definidas solamente en los escasos patógenos humanos oportunistas del género *Shewanella*.

^fVariantes que presentan una supresión en su secuencia, resultante en la inactividad de carbapenemasa.

REACTIVIDAD CRUZADA

La reactividad cruzada del ensayo Revogene Carba C se evaluó con cargas elevadas de cepas no susceptibles a carbapenems que portan diversos genes de resistencia a β -lactamasa, que no son diana del ensayo.

El estudio incluyó 50 cepas de Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii y Pseudomonas aeruginosa que portan diversos genes de resistencia a β -lactamasa (es decir, bla_{CTX-M}, bla_{AmpC}, bla_{SHV}, bla_{SME}, bla_{TEM}, y bla_{SPM}) (**Tabla 7**). Las cepas se analizaron a una carga mínima de $8,18 \times 10^6$ CFU/mL de SB. Se analizaron tres (3) réplicas por cepa con (3) lotes de kit Revogene Carba C distintos (1 réplica por lote de kit).

En las condiciones del estudio, 49 cepas no reaccionaron al ensayo Revogene Carba C. La cepa *Klebsiella pneumoniae* CCUG 59359 bla_{TEM-52} resultó reactiva a una concentración final de $1,13 \times 10^7$ CFU/mL de TM, pero resultó no reactiva cuando se la diluyó 10 veces hasta una concentración final de $1,13 \times 10^6$ CFU/mL de TM.

Se evaluó la reactividad cruzada con cebadores y sondas del ensayo Revogene Carba C mediante un análisis *in silico*, realizado en las secuencias incluidas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), el 6 de septiembre de 2018. No se descubrió que ningún otro gen diana del ensayo (es decir, genes de resistencia bla_{EC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{ipo OXA-48} y bla_{IMP}) presentara una homología con los cebadores y sondas del ensayo Revogene C Carba, incluidos bla_{AMI} y bla_{WEB}, que son otros dos (2) genes de resistencia a β -lactamasa que no son diana del ensayo.

Tabla 7. Lista de cepas analizadas para pruebas de reactividad cruzada con el ensayo Revogene Carba C.

Especies	Número de recogida	Genes de resistencia que no son diana ¹
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22353	ACT-15
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23473	No se identificó el gen de la β -lactamasa
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21540	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22075	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22097	ACT-16
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23318	TEM-206, CTX-M-15, CMH-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21970	AmpC1, AmpC2, MrdA, AmpH, CMY-44
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CCRI-19495	SHV-5, AmpC
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-21537	SRT-1
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-23334	SME-4, SRT-1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21536	ACT-5
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21603	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21692	ACT-14
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1016	TEM-90, Mbl, Bla _{OXA-65} ² , hidrolasa dependiente de Zn
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-1015	TEM-171, SCO-1, PER-2, OXA-9 ³ , SHV-39, AmpH
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1017	TEM-206, SCO-1, Mbl, Bla _{A2} , OXA-67 ³ , hidrolasa dependiente de Zn
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-831	TEM-206, CTX-M-2, OXA-2 ³
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-825	TEM-33, CTX-M-2, OXA-2 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-873	OXA-50 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-1228	OXA-50 ³
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8892	TEM-166, CTX-M-5, OXA-1 ³
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8893	TEM-95, CTX-M-5, OXA-1 ³
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-785	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-779	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-778	AmpC2, MrdA
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3854	ACT-4 ²
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3879	AmpC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3853	AmpC
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3852	ACT-7
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	CCRI-806	OKP-B-11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-784	SHV-27, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-878	AmpC2, MrdA, AmpH
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-826	TEM-215
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 54718	TEM-33, CTX-M-15, OXA-1 ³ , AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59358	SHV-14, OXA-1 ³ , LAP-2
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13441	CTX-M-15, TEM-198, MrdA, OXA-1 ³ , AmpC2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 58546	SHV-44, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59349	CTX-M-15, OXA-1 ³ , TEM-105, SHV-11, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59359	SHV-70, TEM-15, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59360	TEM-168, SHV-12, OXA-9 ³ , AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55970	CTX-M-9, AmpC2, TEM-206, MrdA, AmpC1, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55971	TEM-143, CTX-M-15, AmpC2
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55972	AmpC1, CTX-M-2, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58540	AmpC2, TEM-206, CTX-M-15, OXA-1 ³ , MrdA, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58541	CTX-M-14, TEM-104, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58542	CTX-M-15, AmpC2, OXA-1 ³ , MrdA
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-21789	No se identificó el gen de la β -lactamasa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13465	SHV-85, TEM-206, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21710	AmpC2, MrdA, CTX-M-15, AmpH, OXA-1 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C72	SPM

¹ Analizado por Secuenciación del genoma completo, excepto para la cepa *P. aeruginosa* C72.

² Gen de resistencia identificado con 99,9 % de homología.

³ Estas variantes de bla_{OXA} no forman parte de la familia bla_{ipo OXA-48}, sino que forman parte de la clase D de Ambler.

SUSTANCIAS DE INTERFERENCIA

El efecto potencialmente inhibidor de las 12 combinaciones de placas de agar y soluciones salinas estériles que se puede utilizar para el aislamiento y la preparación de suspensión de 0,5 de McFarland (McF) se evaluó utilizando cinco (5) cepas positivas bacterianas, cada una de las cuales alberga uno (1) de los genes de resistencia detectados por el ensayo Revogene Carba C, y una (1) cepa negativa no susceptible a carbapenems, que no porta ninguno de los genes de resistencia diana del ensayo. Cada cepa se cultivó primero en placas de agar sangre (BAP) y en placas de agar MacConkey (MAP), en presencia de un disco de meropenem de 10 μ g, y luego se subcultivaron en nuevas BAP o MAP. Las colonias aisladas obtenidas a partir de BAP o MAP se analizaron con una torunda estéril seca y se diluyeron en una solución salina estéril, con una concentración equivalente a una suspensión de 0,5 de McFarland estándar. Se analizó un total de 12 combinaciones (**Tabla 8**). Para cada combinación, se analizó una (1) réplica de cada cepa con tres (3) lotes de kit de Revogene Carba C. Ninguna de las 12 combinaciones mostró una interferencia declarable con el ensayo Revogene Carba C.

Tabla 8. Lista de combinaciones de placas de agar y soluciones salinas analizadas con el ensayo Revogene Carba C.

Placa de agar / solución salina (Fabricante)
Agar sangre Colombia 5 % (Hardy Diagnostics) / solución salina preparada (BD) BBL™
Agar sangre Colombia 5 % (Hardy Diagnostics) / solución salina 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Medio preparado Columbia Agar con 5 % de sangre de carnero BD BBL™ / solución salina preparada (BD) BBL™
Medio preparado Columbia Agar con 5 % de sangre de carnero BD BBL™ / solución salina 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Columbia Agar con 5 % de sangre de carnero (bioMérieux) / solución salina preparada (BD) BBL™
Columbia Agar con 5 % de sangre de carnero (bioMérieux) / solución salina 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Agar MacConkey (Hardy Diagnostics) / solución salina preparada (BD) BBL™
Agar MacConkey (Hardy Diagnostics) / solución salina 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Medio de cultivo Agar MacConkey (Thermo Scientific™ Remel™) / solución salina preparada (BD) BBL™
Medio de cultivo Agar MacConkey (Thermo Scientific™ Remel™) / solución salina 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Agar MacConkey (Thermo Scientific™ Oxoid™) / solución salina preparada (BD) BBL™
Agar MacConkey (Thermo Scientific™ Oxoid™) / solución salina 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)

CONTAMINACIÓN REMANENTE Y CRUZADA

La contaminación remanente (entre distintas series) y cruzada (dentro de la misma serie) se evaluó con muestras positivas y negativas altas. La concentración de cada suspensión bacteriana se estandarizó en 4 McFarland ($\geq 1,14 \times 10^7$ CFU/mL de tampón para muestras), mayor que la concentración nominal de 0,5 de McFarland, que es específica para utilizar en el ensayo. Se prepararon muestras positivas con la cepa de *Klebsiella pneumoniae* CCUG 59348, que alberga el gen *bla_{KPC}*. Se prepararon muestras negativas con la cepa *Enterobacter cloacae* CCRI-22760 no susceptible a carbapenems, que no porta ninguno de los genes resistentes a carbapenemas diana del ensayo.

Para el estudio remanente, dos (2) operadores llevaron a cabo una serie de 8 réplicas de muestras positivas altas, seguida de una serie de 8 réplicas de muestras negativas, con el ensayo Revogene Carba C, para un total de (10) series en un (1) Revogene.

Para el estudio de contaminación cruzada, se analizaron cuatro (4) muestras positivas altas y cuatro (4) muestras negativas, alternando preparación de muestras entre las muestras positivas y negativas para cada serie. Dos (2) operadores llevaron a cabo diez (10) series con el ensayo Revogene Carba C en un (1) Revogene.

No se observó ninguna contaminación remanente ni cruzada de *bla_{KPC}*.

REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se realizó un estudio para evaluar la reproducibilidad y precisión del ensayo Revogene Carba C, incluidos la reproducibilidad entre laboratorios, la reproducibilidad entre lotes y el estudio de precisión dentro del laboratorio.

Se realizó un estudio de reproducibilidad entre laboratorios en tres (3) centros, con dos (2) operadores por centro, durante cinco (5) días, con un (1) lote de kit de Revogene Carba C. Se evaluó un total de 120 réplicas para cada una de las diez (10) cepas bacterianas positivas no susceptibles a carbapenems, cada una de las cuales alberga un (1) gen de resistencia diana del ensayo Revogene Carba C (n=2 cepas por gen de resistencia). Se evaluó un total de 240 réplicas de la cepa bacteriana negativa no susceptible a carbapenems que no porta ninguno de los genes de resistencia diana del ensayo.

El estudio de reproducibilidad entre lotes se realizó en un (1) centro, con dos (2) operadores, durante 15 días, con tres (3) lotes de kit de Revogene Carba C (5 días por lote de kit). Se evaluó un total de 120 réplicas para cada una de las diez (10) cepas bacterianas positivas no susceptibles a carbapenems, cada una de las cuales alberga un (1) gen de resistencia diana del ensayo Revogene Carba C (n=2 cepas por gen de resistencia). Se evaluó un total de 240 réplicas de la cepa bacteriana negativa no susceptible a carbapenems que no porta ninguno de los genes de resistencia diana del ensayo.

La precisión dentro del laboratorio se estableció con datos obtenidos con el lote de kit N.^o 1 probado por dos (2) operadores exclusivamente, en el centro N.^o 1 durante un total de cinco (5) días. Se consideró para el análisis un total de 40 réplicas para cada una de las diez (10) cepas bacterianas positivas no susceptibles a carbapenems, cada una de las cuales alberga un (1) gen de resistencia diana del ensayo Revogene Carba C (n=2 cepas por gen de resistencia). También se consideró un total de 80 réplicas de la cepa bacteriana negativa no susceptible a carbapenems, que no porta ninguno de los genes de resistencia diana del ensayo.

Todas las cepas se analizaron a partir de suspensiones de 0,5 de McFarland (McF) estándar.

Para la reproducibilidad entre laboratorios, la coincidencia porcentual fue del 100 % (120/120) para cada cepa positiva y del 98,8 % (237/240) para la cepa negativa (Tabla 9). Para la reproducibilidad entre lotes, la coincidencia porcentual general fue del 100 % (120/120) para cada cepa positiva y del 99,6 % (239/240) para la cepa negativa (Tabla 10). Los valores de umbral de ciclo (Ct) medio con componentes de variación de desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV) se muestran en las Tablas 9 y 10.

Para la precisión dentro del laboratorio, la coincidencia porcentual fue del 100 % (40/40) para cada cepa positiva y del 100 % (80/80) para la cepa negativa (Tabla 11).

Tabla 9. Resultados del estudio de reproducibilidad entre laboratorios con un (1) lote de kit de ensayo Revogene Carba C

Especies	Gen de resistencia y variante	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Resultados generales/ Total	Coincidencia porcentual general ¹	95 % CI general	Valores de Ct ²		
		Resultados/ Total:	Coincidencia porcentual	Resultados/ Total:	Coincidencia porcentual	Resultados/ Total:	Coincidencia porcentual				Medio general	SD	CV%
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	29,7	1,6	5,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	29,6	1,3	4,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	30,5	2,1	7,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	30,4	2,2	7,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	30,3	1,0	3,1
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	30,2	1,5	4,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	28,5	1,4	4,8
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	30,5	1,9	6,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	27,6	1,0	3,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	28,5	1,2	4,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	80/80	100 %	79/80	98,8 %	78/80	97,5 %	237/240	98,8 %	96,4 % - 99,6 %	34,9	1,9	5,5

¹ Para la cepa negativa, el porcentaje de coincidencia se calculó a partir de los resultados negativos.

² Para los genes de variantes y resistencia, los valores de umbral de ciclo (Ct) informados corresponden al gen especificado. Para la cepa negativa, los valores de umbral de ciclo (Ct) informados corresponden al CdP.

Tabla 10. Resultados del estudio de reproducibilidad entre lotes en un (1) centro con tres (3) lotes de kit de ensayo Revogene Carba C

Especies	Gen de resistencia y variante	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Resultados generales/ Total	Coincidencia porcentual general ¹	95 % CI general	Valores de Ct ²		
		Resultados/ Total:	Coincidencia porcentual	Resultados/ Total:	Coincidencia porcentual	Resultados/ Total:	Coincidencia porcentual				Medio general	SD	CV%
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	29,0	1,1	3,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	29,2	1,4	4,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	29,6	2,2	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	30,8	2,3	7,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	29,5	1,4	4,8
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	28,9	1,5	5,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	28,2	1,5	5,2
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	28,6	1,6	5,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	27,5	1,0	3,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 % - 100,0 %	28,1	1,4	4,8
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	80/80	100 %	79/80	98,8 %	80/80	100 %	239/240	99,6 %	97,7 % - 99,9 %	33,0	2,9	8,8

¹ Para la cepa negativa, el porcentaje de coincidencia se calculó a partir de los resultados negativos.

² Para los genes de variantes y resistencia, los valores de umbral de ciclo (Ct) informados corresponden al gen especificado. Para la cepa negativa, los valores de umbral de ciclo (Ct) informados corresponden al CdP.

Tabla 11. Resultados del estudio de precisión dentro del laboratorio en un (1) centro, con un (1) lote de kit de ensayo Revogene Carba C

Especies	Gen de resistencia y variante	Coincidencia porcentual general ¹	95 % CI general
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100 % (40/40)	91,2 % - 100,0 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	100 % (80/80)	95,4 % - 100,0 %

¹ Para la cepa negativa, el porcentaje de coincidencia se calculó a partir de los resultados negativos.

ETIQUETADO ELECTRÓNICO

Puede acceder en línea a la documentación relativa a este producto en www.meridianbioscience.com/pi. Asimismo, se le pueden proporcionar copias en papel previa solicitud a su distribuidor local o mediante los números de teléfono que figuran en la caja del kit.

revogene®

Carba C

Zur Verwendung mit dem Revogene®

REF 410500

IVD Zur In-Vitro-Diagnose gedacht



Rx Only

VERWENDUNGZWECK

Der Revogene® Carba C Assay ist ein mithilfe des Revogene Instruments durchgeführter, qualitativer In-vitro-Diagnosetest zur Erkennung und Differenzierung der *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}* und *bla_{IMP}* Gensequenzen, die mit Carbapenem-resistenten reinen Kolonien von *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* oder *Pseudomonas aeruginosa* assoziiert sind. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt auf Blutagar oder MacConkey-Agar. Der Test nutzt die automatisierte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Echtzeit.

Der Revogene Carba C Assay sollte in Verbindung mit anderen Labortests, u. a. phänotypischen Tests auf Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Mitteln, verwendet werden. Ein negatives Revogene Carba C Assay-Testergebnis schließt das Vorhandensein anderer Resistenzmechanismen nicht aus.

Der Revogene Carba Assay dient als Hilfsmittel für die Infektionskontrolle bei der Entdeckung von Carbapenem-resistenten Bakterien, die Patienten in medizinischen Einrichtungen besiedeln. Die Identifizierung eines *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* oder *bla_{VIM}* Metallo-β-Lactamase-Gens (d. h. die Gene, die IMP-, NDM- und VIM-Metalloc-β-Lactamasen kodieren) dient zur Unterstützung von Ärzten bei der Bestimmung angemessener therapeutischer Strategien für Patienten mit bekannten oder vermuteten Carbapenem-resistenten Infektionen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Resistenz gegen Carbapeneme kann durch verschiedene Mechanismen verursacht werden. Einer davon ist die Bildung von Carbapenemases. Carbapenemases sind heterogene Enzyme, die fähig sind, Carbapenem-Antibiotika zu hydrolysern¹. Gene, die Carbapenemases kodieren, sind hauptsächlich auf mobilen Elementen wie Plasmiden zu finden, was ihren Austausch zwischen verschiedenen Bakterienarten erleichtert. Plasmide, die Gene tragen, welche Carbapenemases der Klassen A (KPC), B (IMP, NDM, VIM) und D (OXA-48-like) kodieren, haben sich über medizinische Einrichtungen hinaus verbreitet und verursachen kritische ambulant erworbene Infektionskrankheiten². Bakterien, die diese Plasmidgene tragen, werden oft als Carbapenemase-produzierende Organismen (CPO) oder Carbapenem-resistente Organismen (CRO) bezeichnet.

Gramnegative *Enterobacteriaceae*-Bazillen sind ein Teil der normalen Darmflora und sind als Träger von Carbapenemase-Genen bekannt. *Enterobacteriaceae*, die aufgrund der Bildung von Carbapenemase(n) gegen Carbapenem-Antibiotika resistent sind, sind als Carbapenemase-produzierende *Enterobacteriaceae* (CPE) bekannt. CPE können in fast jedem Bereich des Körpers Infektionen verursachen, u. a. Blutvergiftungen und Hamweginfekte, beatmungsassoziierte Pneumonien und intraabdominelle Abszesse³. Die Behandlung der durch diese Organismen verursachten Infektionen ist wegen ihrer Multidrug-Resistenz oft extrem schwierig, was zu hohen Sterberaten führt⁴.

Pseudomonas aeruginosa und *Acinetobacter baumannii* sind zwei (2) bedeutende opportunistische Erreger aus der Gruppe der gramnegativen Nonfermenter. Da intrinsische Antibiotikaresistenz gegen mehrere Antibiotikaklassen bei diesen Organismen häufig vorkommt, werden zur Behandlung oft Carbapeneme eingesetzt⁵. Gramnegative Nonfermenter werden jedoch zunehmend auch gegen Carbapenem-Antibiotika resistent, sodass nur noch wenige Behandlungsmöglichkeiten übrig bleiben. Gramnegative Nonfermenter, die aufgrund der Bildung von Carbapenemase(n) gegen Carbapenem(e) resistent sind, sind als Carbapenemase-produzierende Nonfermenter (CP-NF) bekannt. CP-NF können überall im Körper auftreten, werden jedoch am häufigsten mit nosokomialer Pneumonie assoziiert⁶.

Die frühzeitige Identifizierung und Isolierung besiedelter oder infizierter Patienten sind wesentliche Maßnahmen der Infektionskontrolle, wenn es darum geht, die Ausbreitung dieser Organismen in medizinischen Einrichtungen zu begrenzen und eine bessere Planung der Behandlung zu ermöglichen.

VERFAHRENSPRINZIP

Der Revogene Carba C Assay liefert Ergebnisse aus einer (1) bis zu acht (8) Proben in etwa 70 Minuten unter Verwendung charakterisierter, Carbapenem-resistenter, isolierter Kolonien von *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* oder *Pseudomonas aeruginosa*. Der Assay minimiert die Intervention durch den Benutzer vom Laden der Probe in die mikrofluidische Einweg-Kartusche (PIE) bis hin zum endgültigen Ergebnis.

Der Test wird mithilfe des Revogene-Instruments durchgeführt, das die Arbeitsschritte zur Probenhomogenisierung, Verdünnung, Zellyse und DNA-Extraktion, sowie nachfolgende PCR-Schritte in Echtzeit (Abbildung 1). Die Flüssigkeit einer einzelnen Probe wird nach und nach durch Zentrifugierung von einer (1) Kammer zur nächsten transferiert, und alle für die PCR spezifischen Reagenzien werden aufgenommen und innerhalb der PCR-Wells getrocknet. Jedes PIE beinhaltet eine Verfahrenskontrolle (Process Control, PrC) zur Verifizierung der Probenbearbeitungs- und Amplifizierungsschritte, einschließlich der Verifizierung potenzieller inhibitorischer Stoffe sowie eines eventuellen Mikrofluid-, Instrumenten- oder Reagenzienversagens. Die amplifizierten Produkte werden in Echtzeit mit den ziel spezifischen chemischen TaqMan® Sonden nachgewiesen.

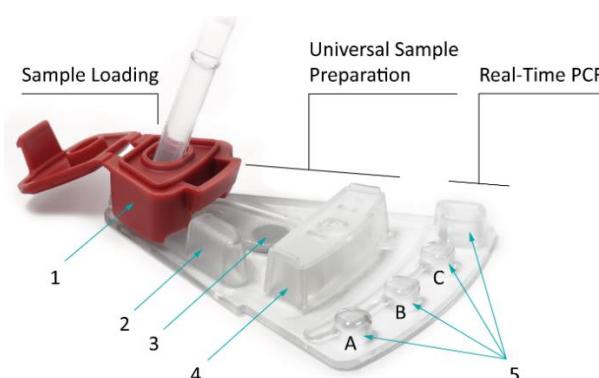


Abbildung 1. Draufsicht auf ein PIE.

1: Probenaufnahmekammer, 2: Überlaufkammer,
3: Homogenisierungskammer mit PrC, 4: Verdünnungs-/Lysekammer,
5: Drei (3) PCR-Wells (A bis C von links nach rechts) und eine (1) Abfallkammer (ganz rechts).

Das Revogene kann in einem Lauf eine (1) bis acht (8) Proben gleichzeitig verarbeiten. Das Karussell muss acht (8) PIES enthalten, um das thermodynamische Gleichgewicht während des gesamten Laufs aufrechtzuerhalten. Nach Beendigung eines Laufs werden die Ergebnisse vom System anhand von gemessenen Fluoreszenzsignalen und eingebetteten Berechnungsalgorithmen kalkuliert. Die Ergebnisse werden auf dem Touchscreen angezeigt und können vom Benutzer ausgedruckt, transferiert und mit Hilfe des USB-Anschlusses oder der Konnektivitätsoption gespeichert werden.

BEREITGESTELLTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Das Revogene Carba C Set enthält ausreichend Reagenzien und Material zur Verarbeitung von 24 Proben. Das Kit enthält die folgenden Materialien:

1. 24 Einweg-Übertragungswerkzeuge (DTT, Disposable Transfer Tool): Eine Kunststoffpipette mit Markierungen des minimalen und maximalen Flüssigkeitspegels für den Transfer der Probe vom TTM zum PIE.
2. 24 Probenpufferröhrchen (SBT, Sample Buffer Tube): Ein mit Barcode versehenes Röhrchen, das Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na₂ (TE 1X) Pufferlösung als Verdünnung und Aufbewahrungspuffer für die Probe enthält.
3. 24 Beutel mit jeweils einer (1) Carba C mikrofluidischen Kartusche (PIE): Integrierte Vorrichtung mit getrockneten Reagenzien zur Probenverarbeitung und für Echtzeit-PCR-Schritte zur Amplifikation und Erkennung von *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48-like}* und *bla_{IMP}* Gensequenzen. Jedes PIE enthält eine Verfahrenskontrolle (PrC), PrC-spezifische Primer und Sonde, *bla_{KPC}*-, *bla_{NDM}*-, *bla_{VIM}*-, *bla_{OXA-48-like}*- und *bla_{IMP}*-Gen-spezifische Primer und Sonden, dNTPs, Pufferlösung und DNA-Polymerase.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN (NICHT MITGELIEFERT)

1. Revogene® (Kat.-Nr. 610210)
2. Puderfreie Einmalhandschuhe
3. Sterile Einwegtupper
4. Kochsalzlösung (0,45 % bis 0,9 % NaCl empfohlen)
5. Blutagar- oder MacConkey-Agarplatten.
6. 10 µg Meropenem-Scheibe (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Kat. Nr. 231704 oder äquivalent)
7. Vortex-Mixer mit einer Maximaldrehzahl von mindestens 3200 U/min (VWR Kat. Nr. 58816-121 oder äquivalent)
8. Densitometer (VWR Kat. Nr. 89402-910 oder äquivalent) oder Karte mit weißem Hintergrund und schwarzen Kontraststreifen (Wickerham-Karte für den Trübungswert, 2 x 3 Zoll, schwarze Streifen empfohlen; Kat. Nr. Z08 oder äquivalent)
9. Kalibriert Mikropipette (P20 empfohlen, VWR Kat. Nr. 89079-964 oder äquivalent)
10. DNase/RNase-freie aerosolresistente Mikropipettenspitzen (verlängerte Spitzen empfohlen; Sarstedt Kat. Nr. 70.1189.215 oder äquivalent)
11. Probenteller (Kat.-Nr 132539; optional)
12. MOCK PIE(s) (Kat. Nr. 610208; optional)

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Der Revogene Carba C Assay kann nur mit dem Revogene verwendet werden.
2. Das Set nicht verwenden, wenn das Etikett, mit dem die Verpackung versiegelt wurde, bei Erhalt beschädigt ist.
3. Die PIEs nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Erhalt offen oder beschädigt sind.
4. Keine DTTs, SBTs und PIEs zwischen Set-Chargen vertauschen.
5. Alle PIEs und DTTs werden nur zur Bearbeitung einer (1) einzelnen Probe verwendet. PIEs und DTTs dürfen nicht wiederverwendet werden.
6. Proben sind stets als infektiös und in Übereinstimmung mit bewährten Laborpraktiken zu handhaben (siehe z. B. „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“⁷ sowie Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Dokument M29-A4⁸).
7. Bei der Handhabung von Proben puderfreie Einmalhandschuhe tragen und anschließend gründlich Hände waschen.
8. Das PIE enthält getrocknete Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst geöffnet werden, wenn alles für die Durchführung des Tests bereit ist.
9. Ungenutzte Reagenzien und Abfälle sind in Übereinstimmung mit den nationalen, bundesweiten, regionalen, und örtlichen Bestimmungen zu entsorgen.
10. Das PIE nach Gebrauch nicht öffnen oder auseinanderbrechen. Die Kappe und das Siegel im PIE verhindern eine Kontamination mit Amplifikationsprodukten und/oder infektiösen Partikeln.
11. PIEs, die nach dem Laden der Probe heruntergefallen sind, geschüttelt oder umgedreht wurden, dürfen nicht mehr verwendet werden, da dies zu ungültigen Testergebnissen führen könnte.
12. Keine Sets verwenden, deren Haltbarkeitsdatum überschritten ist.
13. Geladene PIEs nicht kühlen.
14. Jeder Lauf muss mit acht (8) PIEs im Revogene-Karussell durchgeführt werden, um das thermodynamische und mechanische Gleichgewicht innerhalb des Laufs aufrechtzuerhalten. Wenn weniger als acht (8) Proben getestet werden, sind die leeren Stellen mit MOCK PIEs oder Assay-PIEs mit Probenpuffer zu füllen.
15. Die örtlichen, regionalen und bundesweiten Vorschriften und Bestimmungen über das Melden von meldepflichtigen Erkrankungen werden laufend aktualisiert und enthalten Listen der Organismen, die für die Kontrolle und Untersuchung von Ausbrüchen wichtig sind^{9, 10}. Labore sind für die Einhaltung ihrer regionalen und/oder örtlichen Vorschriften bezüglich meldepflichtiger Krankheitserreger verantwortlich. Richtlinien für die Übergabe von Isolaten und/oder klinischen Proben bieten die örtlichen und regionalen Labore des öffentlichen Gesundheitswesens.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. Das Revogene Carba C-Set bei 2–25 °C aufbewahren. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit.
2. Den Beutel erst öffnen, wenn alles zur Durchführung des Tests vorbereitet ist. Das PIE nach dem Öffnen des Beutels innerhalb von einer (1) Stunde verwenden.
3. Inokulierte SBTs können bei 25 °C max. vier (4) Tage oder bei 2–8 °C max. sieben (7) Tage lang aufbewahrt werden.

GEBRAUCHSANWEISUNG

PROBENAUFBEREITUNG

1. Die Organismen müssen als *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Acinetobacter baumannii* identifiziert werden, und ihr Carbenapenem-Resistenz-Status muss vor dem Test mit dem Revogene Carba C Assay anhand eines Antibiotogramms oder der neuesten Version der CLSI M100 Standards¹¹ bestimmt werden.
2. Eine Blutagar- oder MacConkey-Agarplatte mit dem Organismus beimpfen, zum Isolieren ausstreichen und eine 10 µg Meropenem-Scheibe in den ersten Quadranten platzieren, um sicherzustellen, dass das Isolat seine Resistenz gegen Carbenapenem behält.
3. Die Platte bei 35 °C 18–24 Stunden lang unter aeroben Bedingungen inkubieren.
4. Eine standardisierte 0,5 McFarland-Suspension in Kochsalzlösung aufzubereiten, indem mithilfe eines sterilen Tupfers Carbenapenem-resistente isolierte Kolonien von den inkubierten Agarplatten nahe der Meropenem-Scheibe entnommen werden.
5. Die Suspension so anpassen, dass eine dem McFarland-Standard 0,5 entsprechende Trübung erreicht wird. Die Suspension und den 0,5 McFarland-Standard entweder mit einem photometrischen Gerät oder – falls visuell vorgegangen wird – bei ausreichend Licht mit einer Karte mit weißem Hintergrund und schwarzen Kontrastlinien vergleichen. Dies ergibt eine Suspension mit etwa 1 bis 2×10^8 koloniebildenden Einheiten (KBE)/mL.

SBT-VORBEREITUNG

1. Entnehmen Sie aus der Kit-Verpackung ein (1) SBT für jede zu testende Probe.
2. Das SBT mit der entsprechenden Probenidentifikationsnummer identifizieren (oder kennzeichnen), ohne dabei den Barcode zu überschreiben oder unkenntlich zu machen. Das SBT in den Revogene Probenteller einsetzen, falls verwendet.
3. Die 0,5 McFarland-Suspension im Vortex-Mixer bei maximaler Drehzahl 15 Sekunden lang mischen.
4. Mit einer Mikropipette 15 µL der standardisierten 0,5 McFarland-Suspension ansaugen.
5. Die Kappe vom SBT entfernen und das McFarland-Aliquot in das SBT verbringen, ohne dabei Aerosole zu erzeugen. Die Flüssigkeit auf- und abpipettieren, um sicherzustellen, dass das Aliquot vollständig übertragen wurde. Darauf achten, dass jeweils nur ein (1) SBT offen ist.
6. Die Kappe wieder auf dem SBT anbringen, fest verschließen und das SBT wieder in den Probenteller einsetzen (falls verwendet).
7. Etwaige weitere Proben zum Testen durch Wiederholung der Schritte 1 bis 6 präparieren.
8. Wenn alle Proben verarbeitet sind, mit Schritt 9 fortfahren (PIE-VORBEREITUNG).

PIE-VORBEREITUNG

HINWEIS: Jeweils nur eine (1) Probe verarbeiten.

9. Den Inhalt des SBT mindestens 15 Sekunden bei höchster Geschwindigkeit (≥ 3200 U/min) im Vortex-Mischer mischen.
10. Öffnen Sie den Beutel, der die PIE enthält und entnehmen Sie sie. Nach dem Öffnen des Beutels muss das PIE innerhalb von einer (1) Stunde verwendet werden.
11. Nehmen Sie ein DTT aus der Verpackung des Kits und aspirieren Sie den inokulierten Probenpuffer (SB, Sample Buffer) durch Zusammendrücken des gesamten Ballons. Der Flüssigkeitspegel im DTT muss zwischen den beiden Markierungen liegen (**Abbildung 2**). Wenn der Flüssigkeitspegel nicht zwischen den zwei Markierungen liegt, den Probenpuffer vollständig in das SBT verbringen und diesen Schritt wiederholen.
12. Die Probenpuffermenge im DTT vollständig in die Probenaufnahmekammer des PIE verbringen (**Abbildung 1**). Die Außenkante oder die Unterseite der Probenaufnahmekammer dürfen dabei nicht mit dem DTT berührt werden.
13. Die Kappe des PIE fest verschließen. Das PIE in den Probenteller einsetzen, falls verwendet. Geladene PIEs nicht kühlen.
14. Alle weiteren Proben zum Testen durch Wiederholung der Schritte 9 bis 13 präparieren und dann mit Schritt 1 des Abschnitts BETRIEB DES REVOCENE-SYSTEMS fortfahren.

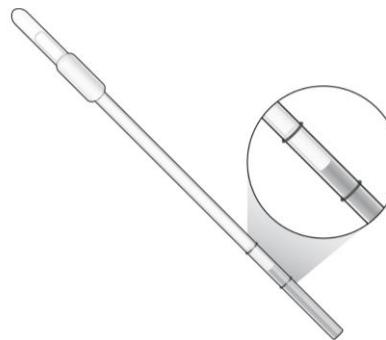


Abbildung 2.

Darstellung eines angemessenen Probenpufferpegels unter Verwendung des Transferhilfsmittels zum Einmalgebrauch (Disposable Transfer Tool, DTT).

BETRIEB DES REVOCENE-SYSTEMS

HINWEIS 1: Bei jedem Durchlauf müssen acht (8) PIEs in das Revogene eingesetzt sein. Wenn weniger als acht (8) Proben bearbeitet werden, müssen die leeren Stellen mit MOCK PIEs gefüllt werden.*

HINWEIS 2: Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Revogene finden das Revogene Bedienungsanleitung.¹²

1. Das Revogene einschalten (falls nicht bereits getan). Die Software startet automatisch.
2. Zur Anmeldung Ihren <Benutzernamen> und Ihr <Passwort> eingeben und auf <Anmelden> tippen. Das Hauptmenü wird automatisch angezeigt.
3. Auf <Setup Run> tippen.
4. Die Probenidentifikationsnummer entweder mit dem Barcode-Scanner einlesen oder manuell eingeben. Für die manuelle Eingabe auf das Bleistift-Symbol der Zeile <Proben-ID scannen oder eingeben> tippen.
5. Die SBT- und PIE-Barcodes mit dem Barcode-Scanner einlesen, wobei das PIE fast vertikal vor den Scanner gehalten werden muss. SBT- und PIE-Barcodes können auch manuell eingegeben werden (durch Tippen auf das Bleistift-Symbol der jeweiligen Zeile). Das PIE vorsichtig handhaben und nicht schütteln oder fallenlassen.
6. (Optional) Auf das Bleistift-Symbol der Zeile <Kommentare hinzufügen> tippen und einen Kommentar eingeben.
7. Das PIE an beliebiger Stelle ins Karussell des Revogene einsetzen. Die Software ordnet die Probe und das SBT automatisch dem richtigen PIE zu.
8. In der Zeile <Das PIE in das Instrument einsetzen> auf <OK> tippen, um zu bestätigen, dass das PIE eingesetzt ist. Anschließend die Schritte 4 bis 8 für die restlichen Proben wiederholen. Wenn weniger als acht (8) PIEs getestet werden, sind die leeren Stellen im Karussell mit Mock PIEs* zu füllen. Beim Einsetzen der MOCK PIEs in den Revogene ist kein Scan erforderlich.
9. Nachdem alle PIEs in das Karussell eingesetzt wurden, auf <Weiter> tippen.
10. Nach dem Einsetzen von MOCK PIEs in das Karussell die Bildschirmanweisungen befolgen.
11. Den Retentionsring scannen und auf dem Karussell anbringen. Der Instrumentendeckel schließen.
12. Den Testlauf durch Tippen auf <Start> initiieren.
13. Das inkolierte SBT für Wiederholungstests (falls nötig) unter angemessenen Bedingungen lagern (siehe Abschnitt LAGERUNG UND STABILITÄT).

*Wenn keine MOCK PIEs verfügbar sind, neue Assay-PIEs verwenden, die mit Probenpuffern (LEER) gefüllt sind.

ANZEIGE UND EXPORT DER ERGEBNISSE

1. Wenn der Durchlauf abgeschlossen ist, öffnet sich der Deckel automatisch.
2. Wenn das Revogene heruntergefahren ist, erneut den <Benutzernamen> und das <Passwort> eingegeben und auf <Anmelden> tippen. Das Hauptmenü wird automatisch angezeigt.
3. Zum Anzeigen der Testergebnisse auf das Symbol Ergebnisse tippen. Im Fenster Ergebnisse werden die Ergebnisse für jede Probe angezeigt (Abbildung 3).



Abbildung 3.
Fenster „Ergebnisse“ zeigt die Ergebnisse für jede Probe.

4. Auf <Letzter Lauf> tippen, um die zuletzt ermittelten Testergebnisse anzuzeigen.
5. Auf <Bericht> tippen, um die genauen Zielergebnisse für jede Probe zu sehen. Der Abschnitt ERGEBNISAUSWERTUNG gibt Auskunft darüber, ob für die angezeigten Zielergebnisse zusätzliche Maßnahmen nötig sind.
HINWEIS: Falls eine Probe einem Wiederholungstest unterzogen wird, sind alle positiven Ergebnisse sowohl des ursprünglichen Tests als auch des Wiederholungstests zu melden, selbst wenn abweichende Ergebnisse für dasselbe Ziel vorliegen.
6. Im Menü <Letzter Lauf> die Proben auswählen, für die ein Ergebnisbericht exportiert werden soll. Um alle Proben auf einmal auszuwählen, das Kästchen in der linken oberen Bildschirmecke markieren.
7. Auf <Exports> tippen und den Speicherort (z. B. einen USB-Stick) auswählen.
8. (Optional) Auf <Suche> tippen, um nach einer bestimmten Probe und deren Ergebnis zu suchen.
9. Den Retentionsring und die PIEs vom Revogene entfernen. Die benutzten PIEs müssen in geeigneten Abfallbehältern gemäß den gängigen Verfahren Ihrer Institution entsorgt werden.

QUALITÄTSSICHERUNG

Qualitätskontrollverfahren dienen der Überwachung der Exaktheit und Präzision des analytischen Verfahrens. Jedes Labor muss die Anzahl, Art und Häufigkeit der Tests von Kontrollmaterial anhand der anwendbaren Vorschriften bzw. der Vorgaben von Akkreditierungsgesellschaften selbst festlegen. Das nachstehend beschriebene Verfahren kann, falls zutreffend, basierend auf örtlichen Richtlinien und Verfahren angewendet werden.

VERFAHRENSKONTROLLE

Jedes PIE enthält eine Verfahrenskontrolle (PrC) zur Überwachung der Probenhomogenisierung, Probenverdünnung, Lyse von Zellen, Inhibition der DNA-Amplifikation und des Assay-Reagenzienversagens.

EXTERNE KONTROLLEN

HINWEIS: Für jede aufbereitete externe Kontrolle sind separate DTTs, SBTs und PIEs zu verwenden.

1. Gemäß bewährter Laborpraxis empfiehlt sich der Einsatz von Kontrollmaterialien. Benutzer sollten die entsprechenden Leitlinien zur Durchführung externer Kontrollen befolgen. Es wird empfohlen, in jedem Labor täglich mindestens eine (1) externe Positivkontrolle und eine (1) externe Negativkontrolle mit dem Revogene Carba C Assay auf dem Revogene durchzuführen, bis das Verfahren angemessen validiert ist.
2. Externe Kontrollmaterialien werden nicht von Meridian Bioscience, Inc. bereitgestellt. Die Revogene-Software verwendet keine externen Kontrollen für die Auswertung von Probentestergebnissen. Externe Kontrollen werden wie Proben behandelt.

Fünf (5) verschiedene externe Positivkontrollen und eine (1) externe Negativkontrolle sind empfohlen und nachstehend aufgelistet.

Externe Positivkontrollen

Zur Verwendung als externe Positivkontrolle wird eine standardisierte, in Kochsalzlösung verdünnte 0,5 McFarland-Suspension isolierter Kolonien aus charakterisierten, Carbapenem-resistenten, handelsüblichen Stämmen empfohlen. Empfohlene Stämme sind:

- *K. pneumoniae bla^{KPC-2} (CCUG 59348)*,
- *K. pneumoniae bla^{NDM-1} (ATCC® BAA-2146™)*,
- *K. pneumoniae bla^{VIM-1} (NCTC 13440)*,
- *E. coli bla^{OXA-48} (ATCC® BAA-2523™)*,
- *E. coli bla^{IMP-1} (NCTC 13476)*.

Jede der fünf (5) empfohlenen externen Positivkontrollen kann abwechselnd getestet werden.

Externe Negativkontrollen

Zur Verwendung als externe Negativkontrolle wird eine standardisierte, in Kochsalzlösung verdünnte 0,5 McFarland-Suspension aus isolierten Kolonien eines repräsentativen, Carbapenem-resistenten Stamms von *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* oder *P. aeruginosa* empfohlen, der keine der Zielresistenzgene des Revogene Carba C Assay trägt.

AUFBEREITUNG DER EXTERNEN KONTROLLEN

1. Eine Blutagar- oder MacConkey-Agarplatte mit dem Organismus beimpfen, zum Isolieren ausstreichen und eine 10 µg Meropenem-Scheibe in den ersten Quadranten platzieren, um sicherzustellen, dass das Isolat seine Resistenz gegen Carbapenem behält.
2. Die Platte bei 35 °C 18–24 Stunden lang unter aeroben Bedingungen inkubieren.
3. Eine standardisierte 0,5 McFarland-Suspension in Kochsalzlösung aufzubereiten, indem mithilfe eines sterilen Tupfers isolierte Kolonien von der inkubierten Agarplatte nahe der Meropenem-Scheibe entnommen werden.
4. Die Suspension so anpassen, dass eine dem McFarland-Standard 0,5 entsprechende Trübung erreicht wird. Die Suspension und den 0,5 McFarland-Standard entweder mit einem photometrischen Gerät oder – falls visuell vorgegangen wird – bei ausreichend Licht mit einer Karte mit weißem Hintergrund und schwarzen Kontrastlinien vergleichen. Dies ergibt eine Suspension mit etwa 1 bis 2 × 10⁶ koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml.

Aufbereitete externe Kontrollsuspensionen gemäß den Abschnitten SBT-VORBEREITUNG/PIE-VORBEREITUNG verarbeiten und testen, dann gemäß dem Abschnitt BETRIEB DES REVOCENE-SYSTEMS vorgehen.

WIEDERHOLUNGSTESTVERFAHREN

UNBESTIMMTES ODER UNGEKLÄRTE ERGEBNIS

Wenn für eine Probe unbestimmte (Indeterminate, IND) oder ungeklärte (Unresolved, UNR) Zielergebnisse vorliegen, ist innerhalb des im Abschnitt LAGERUNG UND STABILITÄT angegebenen Zeitraums ein Wiederholungstest aus dem entsprechenden inkulierten SBT durchzuführen.

Das entsprechende inkulierte Original-SBT ist zum Laden eines neuen PIE aus derselben Set-Charge zu verwenden und das nicht benutzte SBT zu entsorgen. Für jede Probe die Schritte 9 bis 13 aus dem Abschnitt PIE-VORBEREITUNG durchführen und dann gemäß dem Abschnitt BETRIEB DES REVOGENE-SYSTEMS vorgehen. Wenn nötig, kann ein neues SBT aus einer neuen standardisierten 0,5 McFarland-Suspension inkuliert werden.

Unbestimme oder ungeklärte Ergebnisse für eine externe Kontrolle

Wenn für eine externe Kontrolle ein unbestimmtes (IND) oder ungeklärtes (UNR) Zielergebnis vorliegt, ist der Lauf als ungültig zu werten. Für die externen Positiv- und Negativkontrollen sowie für alle Proben des betreffenden Durchlaufs ist ein Wiederholungstest mithilfe des entsprechenden inkulierten SBT durchzuführen. Alle inkulierten SBTs müssen innerhalb des im Abschnitt LAGERUNG UND STABILITÄT angegebenen Zeitraums getestet werden.

Das entsprechende inkulierte SBT ist zum Laden eines neuen PIE aus derselben Set-Charge zu verwenden. Die Anweisungen des Abschnitts PIE-VORBEREITUNG ab Schritt 9 und dann die des Abschnitts BETRIEB DES REVOGENE-SYSTEMS befolgen.

Unerwartete negative oder unerwartete positive Ergebnisse für eine externe Kontrolle

Wenn für eine externe Kontrolle ein unerwartetes negatives oder unerwartetes positives Ergebnis erzielt wird, ist der Lauf als ungültig zu werten. Ein Wiederholungstest der externen Positiv- und Negativkontrollen ist gemäß dem Abschnitt QUALITÄTSSECURERUNG mit neuen externen Kontrollen durchzuführen. Die Technik der Handhabung/Aufbereitung ist zu überprüfen.

Außerdem ist für alle Proben des Durchlaufs innerhalb des im Abschnitt LAGERUNG UND STABILITÄT angegebenen Zeitraums ein Wiederholungstest mit neuen externen Kontrollen mithilfe des entsprechenden inkulierten Original-SBTs durchzuführen. Informationen zur Aufbereitung neuer externer Kontrollen erhalten Sie im Abschnitt QUALITÄTSSECURERUNG.

Das entsprechende inkulierte SBT ist zum Laden eines neuen PIE aus derselben Set-Charge zu verwenden. Die Anweisungen des Abschnitts PIE-VORBEREITUNG ab Schritt 9 und dann die des Abschnitts BETRIEB DES REVOGENE-SYSTEMS befolgen.

ERGEBNISAUSWERTUNG

Die Ergebnisse werden vom Revogene anhand von gemessenen Fluoreszenzsignalen und eingebetteten Berechnungsalgorithmen kalkuliert und im Fenster „Ergebnisse“ angezeigt. Die möglichen Ergebnisse sind unten aufgeführt.

Proben-typ	Auf Benutzerbildschirm angezeigte(s) Symbol(e)	Gemeldete(s) Ergebnis(se)	Interpretation	Weitere Schritte
Isolierte Kolonie		Positiv	KPC-, NDM-, VIM-, OXA-48-like- und IMP-Ziel-DNA erkannt.	Keine weiteren Schritte nötig.
		Negativ	Keine KPC-, NDM-, VIM-, OXA-48-like- und IMP-Ziel-DNA erkannt.	Keine weiteren Schritte nötig.
		Positiv/Negativ	KPC- und/oder NDM- und/oder VIM- und/oder OXA-48-like- und/oder IMP-Ziel-DNA erkannt. UND Ob KPC- und/oder NDM- und/oder VIM- und/oder OXA-48-like- und/oder IMP-Ziel-DNA nicht erkannt wurde.	Keine weiteren Schritte nötig.
		Ungeklärt	Amplifikations-/Erkennungsfehler der Verfahrenskontrolle. Dieser könnte auf inhibitorische Proben, Mikrofluid- oder Reagenzienversagen zurückzuführen sein.	Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt WIEDERHOLUNGSTESTVERFAHREN).
		Positiv/ Ungeklärt	KPC- und/oder NDM- und/oder VIM- und/oder OXA-48-like- und/oder IMP-Ziel-DNA erkannt. UND Amplifikations-/Erkennungsfehler der Verfahrenskontrolle. Dieser könnte auf inhibitorische Proben, Mikrofluid- oder Reagenzienversagen zurückzuführen sein.	Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt WIEDERHOLUNGSTESTVERFAHREN). Alle ursprünglich positiven Ergebnisse müssen als positiv gewertet werden, selbst wenn beim Wiederholungstest ein anderes Ergebnis vorliegt.
		Unbestimmt	Aufgrund eines möglichen Erkennungsfehlers des Revogene während der Assay-Verarbeitung, der Datenanalyse oder infolge einer Laufunterbrechung kein Ergebnis anzeigbar.	Wiederholungstest erforderlich (siehe Abschnitt WIEDERHOLUNGSTESTVERFAHREN).

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

- Der Revogene Carba C Assay erkennt bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48-like} und bla_{IMP} Gensequenzen und dient nicht zur Identifizierung von Bakterien.
- Die Leistung des Revogene Carba C Assay mit anderen Bakterien als *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* oder *Pseudomonas aeruginosa* ist nicht erprobt. Die Identifizierung der Organismen und die Feststellung ihres Carbapenem-Resistenz-Status muss vor dem Test mit dem Revogene Carba C Assay erfolgen.
- Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* weisen eine inhärente Resistenz gegen Ertapenem auf. Die Carbapenem-Resistenz dieser Arten und die Einsetzbarkeit des Revogene Carba C Assays sollte anhand von Tests mit Meropenem, Imipenem und/oder Doripenem bestimmt werden.
- Der Revogene Carba C Assay dient nicht zur Bestimmung von Unterarten und meldet keine Varianten der bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48-like} und bla_{IMP}-Gene.
- Der Revogene Carba C Assay darf mit dem Revogene-Instrument nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.
- Innerhalb eines Laufs dürfen nur Revogene Carba C PIES verwendet werden. PIES von anderen Revogene Assays sind nicht mit dem Revogene Carba C Assay kompatibel und dürfen nicht verwendet werden.
- Die Ergebnisse des Revogene Carba C Assays sollten als Zusatz zu klinischen Beobachtungen und anderen dem Arzt verfügbaren Informationen herangezogen werden.
- Falsche Testergebnisse können durch unsachgemäße Vorbereitung, Handhabung oder Lagerung von Kulturen, technische Fehler oder das Vertauschen von Proben auftreten. Um falsche Ergebnisse zu vermeiden, ist eine sorgfältige Einhaltung der Anleitungen in dieser Beilage, das Revogene-Bedienungsanleitung sowie bewährter Leitlinien erforderlich.
- Eine Kontamination oder unerwartete Positivergebnisse können auftreten, wenn eine PIE-Kappe nicht richtig verschlossen wurde oder ein Tröpfchen auf den Rand der Probenaufnahmekammer gefallen ist.
- Eine längere Lagerzeit der SBT-Proben als im Abschnitt LAGERUNG UND STABILITÄT angegeben kann zu unerwarteten oder ungültigen Ergebnissen führen.
- Mutationen oder Polymorphismen in aktuellen, neuen oder unbekannten bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48-like} und bla_{IMP}-Gensequenzen können die Erkennung beeinflussen und zu falschen Negativergebnissen führen.
- Es wurden *In-silico*-Prognosen bezüglich der Zugehörigkeit der Revogene Carba C Primer- und -Sonden anhand der 2018 in der GenBank verfügbaren Sequenzdaten durchgeführt. Es wurden keine Analysen der nach 2018 in der GenBank platzierten neuen abweichenden Sequenzen der Carbapenemase-Zielgene durchgeführt.
- Die Leistung des Revogene Carba C Assay mit nicht gezielt bestimmten Carbapenemase-Genen außer bla_{CTX-M}, bla_{AmpC}, bla_{SHV}, bla_{SME}, bla_{TEM} und bla_{SPM} ist unbekannt.

ERWARTETE WERTE

Im Rahmen der klinischen Carba-Studie wurden insgesamt 512 Carbapenem-resistente Bakterienisolale an drei (3) Standorten in den Vereinigten Staaten und Kanada bewertet. Die Ergebnisse des Revogene Carba C Assays für jedes Zielgen im Vergleich zur Referenzmethode (einem handelsüblichen Nukleinsäure-Amplifikationstest – Nucleic Acid Amplification Test, NAAT) sind in Tabelle 1 bis 4 dargestellt.

KLINISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistung des Revogene Carba C Assay wurde in einer klinischen Studie ermittelt, die an drei (3) Standorten in den Vereinigten Staaten und Kanada durchgeführt wurde.

Bakterienisolale, die als *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* oder *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt wurden, wurden sowohl auf Blutagar- als auch auf MacConkey-Agarplatten gezüchtet. *Enterobacteriaceae*-Isolate waren entweder intermedär/mäßig resistent oder resistent gegen Doripenem, Ertapenem, Imipenem und/oder Meropenem gemäß den CLSI M02¹³-Standards. Isolate aus *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa* waren entweder intermedär/mäßig resistent oder resistent gegen Doripenem, Imipenem und/oder Meropenem, da diese bereits inhärent resistent gegen Ertapenem sind. Die in Blutagar und MacConkey-Agar isolierten Kolonien wurden in Kochsalzlösung verdünnt, um eine dem 0,5 McFarland-Standard entsprechende Suspension zu erhalten, und dann anhand des Revogene Carba C Assays getestet. Die Referenzmethode bestand aus einem hochleistungsfähigen, von der FDA zugelassenen Nukleinsäure-Amplifikationstest (NAAT) zur Erkennung der Carbapenemase-Zielgene aus isolierten Kolonien bekannter Carbapenem-resistenter Organismen. Die Leistung des Tests wurde im Vergleich zu PCR/bidirektionaler Sequenzierung festgestellt und der Test gemäß den Anweisungen des Herstellers angewendet.

Die Werte für die Sensitivität und Spezifität wurden anhand des Vergleichs der Revogene Carba C Assay-Ergebnisse mit der Referenzmethode berechnet. Proben mit abweichenden Ergebnissen zwischen dem Revogene Carba C Assay und dem Referenz-NAAT wurden einer Diskrepanzanalyse unterzogen. Hierfür wurde eine alternative PCR-Methode für die Amplifikation und Erkennung von bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48-like} und bla_{IMP}-Genen gefolgt von einer bidirektionalen Sequenzierung der amplifizierten Produkte genutzt.

ERGEBNISSE

Im Rahmen der klinischen Studie wurden insgesamt 532 Bakterienisolate getestet (475 klinische Bestandsisolate und 57 prospektiv gesammelte frische Isolate). Zwanzig Isolate wurden von der Leistungsanalyse ausgeschlossen, weil sie entweder zu einer Nicht-Zielart gehörten, ihre Identität nicht bestätigt werden konnte, sie Empfindlichkeit gegen Carbenemase aufwiesen, ein Laborfehler vorlag oder keine gültigen PCR-Ergebnisse erzielt werden konnten. Zur Ermittlung der Leistung des Revogene Carba C Assays im Vergleich zur Referenzmethode wurden also insgesamt 512 Proben verwendet.

Die Sensitivität und Spezifität des Revogene Carba C Assays bezüglich der Erkennung der fünf (5) Carbenemase-Zielgene aus Kolonien, die in Blutagar und MacConkey-Agar kultiviert wurden, sind in **Tabelle 1** bzw. **Tabelle 2** dargestellt.

Insgesamt enthielten 24 Isolate laut Bestimmung des Revogene Carba C Assays mehr als ein Carbenemase-Gen. Die Referenzmethode bestätigte, dass 21 dieser Isolate Carbenemase-Gene enthielten. Allerdings entdeckte die Referenzmethode nur ein Carbenemase-Gen in den restlichen drei (3) Isolaten.

Die ursprünglichen nicht ausweisbaren Raten (ungeklärte und unbestimmte Ergebnisse zusammen) betragen hinsichtlich der Nährmedien 1,7 % (9/516) für Blutagar und 1,4 % (7/516) für MacConkey-Agar. Nach Zielvorgaben lagen die Raten für Blutagar bei 1,7 % (9/516) für *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* und *bla_{OXA-48-like}*-Zielgene und bei 1,6 % (8/516) für das *bla_{VIM}*-Zielgen, mit einer Gesamtrate von 1,7 % (9/516). Für MacConkey-Agar lagen die nicht ausweisbaren Raten für alle Zielgene bei 1,4 % (7/516). Nach dem Wiedeholungstest lagen die nicht ausweisbaren Raten für alle Medien und Zielgene bei 0,8 % (4/516).

Die Leistung des Revogene Carba C Assays für jede Gruppe von Organismen in Blutagar bzw. MacConkey-Agar sind in **Tabelle 3** und **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 1. Leistung des Revogene Carba C Assays bei isolierten Kolonien, die in Blutagar kultiviert wurden

Ziel	N	TP	FP	TN	FN	Sensitivität (95 % CI)	Spezifität (95 % CI)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98,9 % (96,2 – 99,7)	99,4 % (97,8 – 99,8)
KPC	512	113	3 ^b	395	1	99,1 % (95,2 – 99,8)	99,2 % (97,8 – 99,7)
OXA-48-like	512	65	3 ^c	444	0	100,0 % (94,4 – 100,0)	99,3 % (98,0 – 99,8)
IMP	512	27	19 ^d	466	0	100,0 % (87,5 – 100,0)	96,1 % (94,0 – 97,5)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100,0 % (93,1 – 100,0)	99,8 % (98,8 – 100,0)

N: Anzahl; TP: Echt positiv; FP: Falsch positiv; TN: Echt negativ; FN: Falsch negativ; CI: Konfidenzintervall

Hinweis: Der Diskrepanztest umfasste fünf (5) alternative PCRs gefolgt von einer bidirektionalen Sequenzierung und wurde für jedes abweichende Zielergebnis durchgeführt. Die Ergebnisse des Diskrepanztests an 21/31 Proben stimmte mit denen des Revogene Carba C Assays überein.

^a Eines (1) von zwei (2) war NDM-1-positiv.

^b Zwei (2) von drei (3) waren KPC-3/KPC-38-positiv.

^c Eines (1) von drei (3) war OXA-48-positiv. Eine Überprüfung deutete auf eine OXA-48-Kreuzkontamination bei der Probenaufbereitung in einem (1) von drei (3) Isolaten hin. Der Diskrepanztest ergab keine Sequenzübereinstimmung mit dem OXA-48-ähnlichen Ziel.

^d Siebzehn (17) von 19 wurden als IMP-positiv ausgewiesen, darunter eine (1) Variante von IMP-4 (aus Australien [2010]), 11 Varianten von IMP-13/IMP-37, eine (1) aus Argentinien [2006], eine (1) aus Nordamerika [2014], neun (9) aus Europa [2005-2015], eine (1) Variante von IMP-27/IMP-64 (aus Kanada [2017]), eine (1) Variante von IMP-15 (aus Argentinien [2004]), eine (1) Variante von IMP-16 (aus Brasilien [2004]) und zwei (2) Varianten von IMP-62 (aus Argentinien [2006]). Die Diskrepanzanalyse deutete auf mögliche Unterschiede der IMP-Variantendeckung zwischen dem Revogene Carba C Assay und der Referenzmethode hin. Eine Überprüfung deutete auf eine IMP-Kreuzkontamination bei der Probenaufbereitung in zwei (2) von 19 Isolaten hin, wobei der Diskrepanztest keine Sequenzübereinstimmung mit dem IMP-Ziel ergab.

^e Eine Überprüfung deutete auf eine VIM-Kreuzkontamination bei der Probenaufbereitung hin. Der Diskrepanztest ergab keine Sequenzübereinstimmung mit dem VIM-Ziel, ergab jedoch eine Sequenzübereinstimmung mit dem NDM-Ziel.

^f Der Diskrepanztest ergab eine Sequenzübereinstimmung mit dem NDM-1-Ziel bei einem (1) von zwei (2) Isolaten und ergab eine Sequenzübereinstimmung mit dem OXA-48-ähnlichen Ziel bei einem (1) von zwei (2) Isolaten. Das OXA-48-positive Isolat wurde als falsch positiv klassifiziert.

Tabelle 2. Leistung des Revogene Carba C Assays bei isolierten Kolonien, die in MacConkey kultiviert wurden

Ziel	N	TP	FP	TN	FN	Sensitivität (95 % CI)	Spezifität (95 % CI)
NDM	512	186	2 ^a	322	2 ^f	98,9 % (96,2 – 99,7)	99,4 % (97,8 – 99,8)
KPC	512	114	3 ^b	395	0	100,0 % (96,7 – 100,0)	99,2 % (97,8 – 99,7)
OXA-48-like	512	65	2 ^c	445	0	100,0 % (94,4 – 100,0)	99,6 % (98,4 – 99,9)
IMP	512	27	21 ^d	464	0	100,0 % (87,5 – 100,0)	95,7 % (93,5 – 97,2)
VIM	512	52	1 ^e	459	0	100,0 % (93,1 – 100,0)	99,8 % (98,8 – 100,0)

N: Anzahl; TP: Echt positiv; FP: Falsch positiv; TN: Echt negativ; FN: Falsch negativ; CI: Konfidenzintervall

Hinweis: Der Diskrepanztest umfasste fünf (5) alternative PCRs gefolgt von einer bidirektionalen Sequenzierung und wurde für jedes abweichende Zielergebnis durchgeführt. Die Ergebnisse des Diskrepanztests an 21/31 Proben stimmte mit denen des Revogene Carba C Assays überein.

^a Eines (1) von zwei (2) war NDM-1-positiv.

^b Zwei (2) von drei (3) waren KPC-3/KPC-38-positiv.

^c Eines (1) von zwei (2) war OXA-48-positiv. Eine Überprüfung deutete auf eine OXA-48-Kreuzkontamination bei der Probenaufbereitung in einem (1) von zwei (2) Isolaten hin. Der Diskrepanztest ergab keine Sequenzübereinstimmung mit dem OXA-48-ähnlichen Ziel.

^d Siebzehn (17) von 21 wurden als IMP-positiv ausgewiesen, darunter eine (1) Variante von IMP-4 (aus Australien [2010]), 11 Varianten von IMP-13/IMP-37, eine (1) aus Argentinien [2006], eine (1) aus Nordamerika [2014], neun (9) aus Europa [2005-2015], eine (1) Variante von IMP-27/IMP-64 (aus Kanada [2017]), eine (1) Variante von IMP-15 (aus Argentinien [2004]), eine (1) Variante von IMP-16 (aus Brasilien [2004]) und zwei (2) Varianten von IMP-62 (aus Argentinien [2006]). Die Diskrepanzanalyse deutete auf mögliche Unterschiede der IMP-Variantendeckung zwischen dem Revogene Carba C Assay und der Referenzmethode hin. Eine Überprüfung deutete auf eine IMP-Kreuzkontamination bei der Probenaufbereitung in vier (4) von 21 Isolaten hin, wobei der Diskrepanztest keine Sequenzübereinstimmung mit dem IMP-Ziel ergab.

^e Eine Überprüfung deutete auf eine VIM-Kreuzkontamination bei der Probenaufbereitung hin. Der Diskrepanztest ergab keine Sequenzübereinstimmung mit dem VIM-Ziel, ergab jedoch eine Sequenzübereinstimmung mit dem KPC-Ziel.

^f Der Diskrepanztest ergab eine Sequenzübereinstimmung mit dem NDM-1-Ziel bei einem (1) von zwei (2) Isolaten und ergab eine Sequenzübereinstimmung mit dem OXA-48-ähnlichen Ziel bei einem (1) von zwei (2) Isolaten. Das OXA-48-positive Isolat wurde als falsch positiv klassifiziert.

Tabelle 3. Leistung des Revogene Carba C Assays nach Organismuskategorie und nach Zielgenen bei isolierten Kolonien, die in Blutagar kultiviert wurden

Medium	Organismen	Ziel	N	TP	FP	TN	FN	Sensitivität (95 % CI)	Spezifität (95 % CI)
Blutagar	<i>Enterobacteriaceae</i>	NDM	306	85	1	219	1	98,8 % (93,7 – 99,8)	99,5 % (97,5 – 99,9)
		KPC	306	112	3	190	1	99,1 % (95,2 – 99,8)	98,4 % (95,5 – 99,5)
		OXA-48-like	306	64	3	239	0	100,0 % (94,3 – 100,0)	98,8 % (96,4 – 99,6)
		IMP	306	14	5	287	0	100,0 % (78,5 – 100,0)	98,3 % (96,1 – 99,3)
		VIM	306	12	0	294	0	100,0 % (75,8 – 100,0)	100,0 % (98,7 – 100,0)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NDM	107	26	1	80	0	100,0 % (87,1 – 100,0)	98,8 % (93,3 – 99,8)
		KPC	107	0	0	107	0	N/A	100,0 % (96,5 – 100,0)
		OXA-48-like	107	1	0	106	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	100,0 % (96,5 – 100,0)
		IMP	107	5	14	88	0	100,0 % (56,6 – 100,0)	86,3 % (78,3 – 91,6)
		VIM	107	39	0	68	0	100,0 % (91,0 – 100,0)	100,0 % (94,7 – 100,0)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM	99	75	0	23	1	98,7 % (92,9 – 99,8)	100,0 % (85,7 – 100,0)
		KPC	99	1	0	98	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	100,0 % (96,2 – 100,0)
		OXA-48-like	99	0	0	99	0	N/A	100,0 % (96,3 – 100,0)
		IMP	99	8	0	91	0	100,0 % (67,6 – 100,0)	100,0 % (96,0 – 100,0)
		VIM	99	1	1	97	0	100,0 % (20,7 – 100,0)	99,0 % (94,4 – 99,8)

N: Anzahl; TP: Echt positiv; FP: Falsch positiv; TN: Echt negativ; FN: Falsch negativ; CI: Konfidenzintervall

Bei manchen Isolaten wurde mehr als ein (1) Zielgen erkannt.

Tabelle 4. Leistung des Revogene Carba C Assays nach Organismuskategorie und nach Zielgen bei isolierten Kolonien, die in MacConkey-Agar kultiviert wurden

Medium	Organismen	Ziel	N	TP	FP	TN	FN	Sensitivität [95 % CI]	Spezifität [95 % CI]
MacConkey-Agar	<i>Enterobacteriaceae</i>	NDM	306	85	1	219	1	98,8 % [93,7 – 99,8]	99,5 % [97,5 – 99,9]
		KPC	306	113	3	190	0	100,0 % [96,7 – 100,0]	98,4 % [95,5 – 99,5]
		OXA-48-like	306	64	2	240	0	100,0 % [94,3 – 100,0]	99,2 % [97,0 – 99,8]
		IMP	306	14	5	287	0	100,0 % [78,5 – 100,0]	98,3 % [96,1 – 99,3]
		VIM	306	12	1	293	0	100,0 % [75,8 – 100,0]	99,7 % [98,1 – 99,9]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NDM	107	26	1	80	0	100,0 % [87,1 – 100,0]	98,8 % [93,3 – 99,8]
		KPC	107	0	0	107	0	N/A	100,0 % [96,5 – 100,0]
		OXA-48-like	107	1	0	106	0	100,0 % [20,7 – 100,0]	100,0 % [96,5 – 100,0]
		IMP	107	5	14	88	0	100,0 % [56,6 – 100,0]	86,3 % [78,3 – 91,6]
		VIM	107	39	0	68	0	100,0 % [91,0 – 100,0]	100,0 % [94,7 – 100,0]
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM	99	75	0	23	1	98,7 % [92,9 – 99,8]	100,0 % [85,7 – 100,0]
		KPC	99	1	0	98	0	100,0 % [20,7 – 100,0]	100,0 % [96,2 – 100,0]
		OXA-48-like	99	0	0	99	0	N/A	100,0 % [96,3 – 100,0]
		IMP	99	8	2	89	0	100,0 % [67,6 – 100,0]	97,8 % [92,3 – 99,4]
		VIM	99	1	0	98	0	100,0 % [20,7 – 100,0]	100,0 % [96,2 – 100,0]

N: Anzahl; TP: Echt positiv; FP: Falsch positiv; TN: Echt negativ; FN: Falsch negativ; CI: Konfidenzintervall

Bei manchen Isolaten wurde mehr als ein (1) Zielgen erkannt.

ANALYTISCHE LEISTUNGSMERKMALE

ZUGEHÖRIGKEIT

Die Zugehörigkeit des Revogene Carba C Assays wurde für 58 Carbapenem-resistente Isolate von *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* unterschiedlicher geografischer und zeitlicher Herkunft ermittelt, darunter:

- Zwei (2) Stämme mit zwei (2) Resistenzgenen;
- Elf (11) Stämme einschließlich fünf (5) Varianten mit dem *bla_{IMP}*-Resistenzgen;
- Elf (11) Stämme einschließlich mindestens drei (3) Varianten mit dem *bla_{KPC}*-Resistenzgen;
- Vierzehn (14) Stämme einschließlich fünf (5) Varianten mit dem *bla_{NDM}*-Resistenzgen;
- Elf (11) Stämme einschließlich drei (3) Varianten mit dem *bla_{OXA-48-like}*-Resistenzgen;
- Neun (9) Stämme einschließlich vier (4) Varianten mit dem *bla_{VIM}*-Resistenzgen.

Jeder Stamm wurde anhand einer standardisierten 0,5 McFarland-Bakteriensuspension getestet, die 1,5 bis 3×10^6 KBE/ml des SB entsprach. Pro Stamm wurden drei (3) Replikate mit drei (3) verschiedenen Revogene Carba Set-Chargen getestet (1 Replikat pro Set-Charge). Die 58 Stämme wurden vom Revogene Carba C Assay erkannt und sind in **Tabelle 5** beschrieben.

Tabelle 5. Carbapenem-resistente Stämme, die hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zum Revogene Carba C Assay getestet wurden.

Bakterienart	Sammel-nummer	Resistenzgen und Variante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® BAA-2793™	KPC-2, VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23061	OXA-232, NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-1705™	KPC-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21587	KPC-2
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21578	KPC-4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CCRI-21581	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19587	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19570	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59413	KPC-3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59348	KPC-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 56233	KPC-2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2340™	KPC ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13443	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2146™	NDM-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22255	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-21711	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22199	NDM-1
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22257	NDM-1
<i>Providencia stuartii</i>	CCRI-22256	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22254	NDM-4
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23064	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23464	NDM-5
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23065	NDM-6
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-23066	NDM-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC® BAA-2468™	NDM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 60138	NDM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19585	VIM-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22258	VIM-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21588	VIM-2
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22261	VIM-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-22720	VIM-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22259	VIM-19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13442	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22263	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-22265	OXA-48
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22266	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-22264	OXA-181
<i>Providencia rettgeri</i>	CCRI-22267	OXA-181
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-23060	OXA-204
<i>Citrobacter freundii</i>	CCRI-23374	OXA-204
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® BAA-2523™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® BAA-2524™	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 64452	OXA-48
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP-1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-19488	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19569	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19582	IMP-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21589	IMP-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19583	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19588	IMP-4
<i>Citrobacter youngae</i>	CCRI-21591	IMP-4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-19584	IMP-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-21590	IMP-9
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-22262	IMP-11

^a Keine Identifizierung der Resistenzgenvariante verfügbar.

Zusätzlich wurde am 7. November 2018 eine *In-silico*-Analyse durchgeführt, um die Zugehörigkeit der Primer und Sonden der Revogene Carba C Assay-Ziele zu bewerten. Für jedes Ziel wurden alle bla_{KPC}-, bla_{NDM}-, bla_{VIM}-, bla_{OXA-48-like}- und bla_{IMP}-Resistenzgensequenzen analysiert, die in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) angeführt waren. Es wurde eine (1) repräsentative Sequenz jeder bekannten Variante abgeglichen. Die Anzahl der analysierten Varianten, deren Erkennung prognostiziert wurde, ist für jedes Zielgen in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Tabelle 6. Zusammenfassung der Erkennung von Zielresistenzgenvarianten anhand der *In-silico*-Prognose.

Ziel	Getestet mit Revogene® Carba C			In-silico-Prognose		
	Anz. der Proben	Entdeckte Varianten	Nicht entdeckte Varianten	Nachweisbar ^a	Potenziell nachweisbar ^b	Nicht nachweisbar
KPC	12	2, 3, 4	Keine	2 bis 38	Keine	entf.
NDM	15	1, 4, 5, 6, 7	Keine	1 bis 24	Keine	entf.
IMP	11	1, 4, 8, 9, 11	Keine	1, 2, 4 bis 6, 8 bis 10, 13 bis 20, 23 bis 26, 28 bis 30, 32, 33, 37, 38, 40, 42, 45, 47 bis 49, 53 bis 56, 59, 60, 62, 66, 69 bis 72, 74 bis 79	3, 7 ^c , 11 ^d , 21, 22, 27, 34, 41, 43, 44, 51, 52, 58, 61, 64, 67, 68, 73	12, 31, 35, 63
OXA-48-like	12	48, 181, 204, 232	Keine	48, 162, 181, 199, 204, 232, 224, 245, 252 ^e , 370, 484, 505, 514 ^f , 515 ^e , 519, 546 ^e , 547 ^e , 566	Keine	54 ^e , 163 ^f , 247 ^f , 405 ^f , 416 ^e , 436, 438 ^f , 439 ^f , 517, 535 ^e , 538 ^e , 567
VIM	10	1, 2, 10, 19	Keine	1 bis 6, 8 bis 12, 14 bis 20, 23 bis 46, 48 bis 50, 52 bis 55, 57, 59, 60	51, 56, 58	7, 13, 47

^a Basierend auf Abgleichen mit Identität und Suchsequenzdeckung ≥ 95 % und E-Werten < 0,01.^b Basierend auf Abgleichen, die nicht mehr als zwei (2) Nichtübereinstimmungen von Nukleotiden ergeben.^c Ein rekombinanter Stamm, der ein IMP-7-Gen trug, wurde ergänzend zur *In-silico*-Studie mit dem Revogene Carba C Assay getestet, und seine Erkennung wurde bestätigt.^d Ein klinischer Stamm, der ein IMP-7-Gen trug, wurde in einer analogen Zugehörigkeitsstudie mit dem Revogene Carba C Assay getestet, und seine Erkennung wurde bestätigt.^e Diese Varianten wurden nur in seltenen humanpathogenen opportunistischen Krankheitserregern des Genus *Shewanella* identifiziert.^f Varianten, bei denen eine Lösung in ihrer Sequenz ohne Folge von Carbapenemase-Aktivität auftritt.

REUZREAKTIVITÄT

Die Kreuzreakтивität des Revogene Carba C Assays wurde mit hohen Anreicherungen von Carbapenem-resistenten Stämmen bewertet, die verschiedene β-Lactamase-Resistenzgene tragen, die nicht zu den Zielgenen des Assays gehören.

Die Studie umfasste 50 Stämme von *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa*, die verschiedene β-Lactamase-Resistenzgene tragen (d. h. bla_{CTX-M}, bla_{AmpC}, bla_{SHV}, bla_{SME}, bla_{TEM} und bla_{SPM}) (**Tabelle 7**). Die Stämme wurden mit einer Minimallast von 8,18x10⁶ KBE/ml des SB getestet. Pro Stamm wurden drei (3) Replikate mit drei (3) verschiedenen Revogene Carba C Set-Chargen getestet (1 Replikat pro Set-Charge).

Unter den Studienbedingungen waren 49 Stämme mit dem Revogene Carba C Assay nicht reaktiv. Der Stamm *Klebsiella pneumoniae* CCUG 59359 bla_{TEM-52} war reaktiv bei einer Endkonzentration von 1,13x10⁷ KBE/ml des SB, nach einer 10-fachen Verdünnung bei einer Endkonzentration von 1,13x10⁶ KBE/ml des SB jedoch nicht reaktiv.

Die Kreuzreakтивität mit Primern und Sonden des Revogene Carba Assays wurde am 6. September 2018 durch eine *In-silico*-Analyse der Sequenzen aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) bewertet. Es wurde bei keinen anderen Resistenzgenen außer den Assay-Zielgenen (d. h. bla_{KPC}-, bla_{NDM}-, bla_{VIM}-, bla_{OXA-48-like}- und bla_{IMP}-Resistenzgene) eine Homologie mit den Primern und Sonden des Revogene Carba Assays festgestellt, einschließlich bla_{IMI} und bla_{WEB}, zwei (2) weitere β-Lactamase-Resistenzgene, die nicht zu den Zielgenen des Assays gehören.

Tabelle 7. Liste der Stämme, die zum Test der Kreuzreaktivität mit dem Revogene Carba C Assay herangezogen wurden.

Bakterienart	Sammel-nummer	Nicht-Zielresistenzgen(e) ¹
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22353	ACT-15
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23473	Kein β -Lactamase-Gen identifiziert
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21540	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22075	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-22097	ACT-16
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-23318	TEM-206, CTX-M-15, CMH-1
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21970	AmpC1, AmpC2, MrdA, AmpH, CMY-44
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CCRI-19495	SHV-5, AmpC
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-21537	SRT-1
<i>Serratia marcescens</i>	CCRI-23334	SME-4, SRT-1
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21536	ACT-5
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21603	ACT-7
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-21692	ACT-14
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1016	TEM-90, Mbl, BlaA2, OXA-65 ² , Zn-abhängige Hydrolase
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-1015	TEM-171, SCO-1, PER-2, OXA-9 ³ , SHV-39, AmpH
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCRI-1017	TEM-206, SCO-1, Mbl, BlaA2, OXA-67 ³ , Zn-abhängige Hydrolase
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-831	TEM-206, CTX-M-2, OXA-2 ³
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-825	TEM-33, CTX-M-2, OXA-2 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-873	OXA-50 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCRI-1228	OXA-50 ³
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8892	TEM-166, CTX-M-5, OXA-1 ³
<i>Salmonella enterica</i>	CCRI-8893	TEM-95, CTX-M-5, OXA-1 ³
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-785	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-779	TEM-206, AmpC1, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-778	AmpC2, MrdA
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3854	ACT-4 ²
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3879	AmpC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCRI-3853	AmpC
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRI-3852	ACT-7
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	CCRI-806	OKP-B-11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI-784	SHV-27, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-878	AmpC2, MrdA, AmpH
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-826	TEM-215
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 54718	TEM-33, CTX-M-15, OXA-1 ³ , AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59358	SHV-14, OXA-1 ³ , LAP-2
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13441	CTX-M-15, TEM-198, MrdA, OXA-1 ³ , AmpC2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 58546	SHV-44, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59349	CTX-M-15, OXA-1 ³ , TEM-105, SHV-11, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59359	SHV-70, TEM-15, AmpH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCUG 59360	TEM-168, SHV-12, OXA-9 ³ , AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55970	CTX-M-9, AmpC2, TEM-206, MrdA, AmpC1, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55971	TEM-143, CTX-M-15, AmpC2
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 55972	AmpC1, CTX-M-2, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58540	AmpC2, TEM-206, CTX-M-15, OXA-1 ³ , MrdA, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58541	CTX-M-14, TEM-104, MrdA, AmpC2, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 58542	CTX-M-15, AmpC2, OXA-1 ³ , MrdA
<i>Proteus mirabilis</i>	CCRI-21789	Kein β -Lactamase-Gen identifiziert
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13465	SHV-85, TEM-206, AmpH
<i>Escherichia coli</i>	CCRI-21710	AmpC2, MrdA, CTX-M-15, AmpH, OXA-1 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C72	SPM

¹ Analysiert anhand von Gesamt-Genom-Sequenzierung, mit Ausnahme des *P. aeruginosa* C72-Stamms.² Resistzenzen mit 99,9 % Homologen identifiziert.³ Diese bla_{OXA}-Varianten gehören nicht zur bla_{OXA-48-like}-Familie, gehören jedoch zur Ambler-Klasse D.

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Die potenziell hemmende Wirkung von 12 Kombinationen aus Agarplatten und sterilen Kochsalzlösungen, die für die Isolierung und die Aufbereitung der 0,5 McFarland- (McF-) Suspension verwendet werden können, wurde mit fünf (5) positiven Bakterienstämmen, von denen jeder eines (1) der vom Revogene Carba C erkannten Resistenzgene trug, und einem (1) negativen Carbapenem-resistenten Stamm, der keine der Zielresistenzgene des Assays trug, bewertet. Jeder Stamm wurde erst auf Blutagarplatten (BAP) und MacConkey-Agarplatten (MAP) unter Verwendung einer 10 µg Meropenem-Scheibe kultiviert und dann auf frischen BAP oder MAP subkultiviert. Von den isolierten Kolonien aus den frischen BAP oder MAP wurden mit einem sterilen Abstrichtupfer Proben entnommen und in einer sterilen Kochsalzlösung zu einer Konzentration verdünnt, die einer standardisierten 0,5 McFarland-Suspension entsprach. Insgesamt wurden 12 Kombinationen getestet (Tabelle 8). Für jede Kombination wurde ein (1) Replikat jedes Stamms mit drei (3) Revogene Carba C Set-Chargen getestet. Bei keiner der 12 Kombinationen zeigte sich eine ausweisbare Beeinflussung des Revogene Carba C Assays.

Tabelle 8. Liste der mit dem Revogene Carba C Assay getesteten Kombinationen von Agarplatten und Kochsalzlösungen.

Agarplatte / Kochsalzlösung (Hersteller)
Columbia-Blutagar 5 % (Hardy Diagnostics) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
Columbia-Blutagar 5 % (Hardy Diagnostics) / Kochsalzlösung 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Prepared Media BD BBL™ Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (BD) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
Prepared Media BD BBL™ Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (BD) / Kochsalzlösung 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (bioMérieux) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (bioMérieux) / Kochsalzlösung 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
MacConkey-Agar (Hardy Diagnostics) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
MacConkey-Agar (Hardy Diagnostics) / Kochsalzlösung 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
MacConkey-Agar-Nährboden (Thermo Scientific™ Remel™) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
MacConkey-Agar-Nährboden (Thermo Scientific™ Remel™) / Kochsalzlösung 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)
MacConkey-Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™) / BBL™ Prepared Saline Solution (BD)
MacConkey-Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™) / Kochsalzlösung 0,85 % (Thermo Scientific™ Oxoid™)

VERSCHLEPPUNG UND KREUZKONTAMINATION

Die Verschleppung (zwischen den Läufen) und Kreuzkontamination (während den Läufen) wurde anhand von hoch positiven und negativen Proben bewertet. Die Konzentration jeder Bakteriensuspension wurde auf 4 McFarland ($\geq 1,14 \times 10^7$ KBE/mL des Probenpuffers) standardisiert, höher als die nominale Konzentration von 0,5 McFarland, die für den Gebrauch im Assay angegeben ist. Positive Proben wurden mit dem Stamm *Klebsiella pneumoniae* CCUG 59348 aufbereitet, der das bla_{KPC}-Gen trägt. Negative Proben wurden mit dem Carbapenem-resistenten Stamm *Enterobacter cloacae* CCRI-22760 aufbereitet, der keine der Carbapenem-resistenten Zielgene des Assays trägt.

Für die Verschleppungsstudie wurden von zwei (2) Bedienern insgesamt zehn (10) Läufe mit dem Revogene Carba C Assay auf einem (1) Revogene ausgeführt. Dabei erfolgte ein Lauf mit acht (8) Replikaten hoch positiver Proben gefolgt von einem Lauf mit acht (8) Replikaten negativer Proben.

Für die Kreuzkontaminationsstudie wurden bei jedem Lauf vier (4) hoch positive Proben und vier (4) negative Proben durch abwechselnde Probenaufbereitung von positiven und negativen Proben getestet. Insgesamt wurden von zwei (2) Bedienern zehn (10) Läufe mit dem Revogene Carba C Assay auf einem (1) Revogene ausgeführt.

Es war keine Verschleppung oder Kreuzkontamination von bla_{KPC} zu beobachten.

REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

Es wurde eine Studie zur Bewertung der Reproduzierbarkeit und Präzision des Revogene Carba C Assays durchgeführt, wobei die Reproduzierbarkeit zwischen Labors, die Reproduzierbarkeit zwischen Chargen und die laborinterne Präzision untersucht wurden.

An drei (3) Standorten wurde von zwei (2) Bediennern pro Standort eine Studie zur Reproduzierbarkeit zwischen Labors durchgeführt. Die Studie erfolgte an fünf (5) verschiedenen Tagen unter Verwendung einer (1) Revogene Carba C Set-Charge. Insgesamt wurden 120 Replikate für jeden der zehn (10) positiven Carbapenem-resistenten Bakterienstämme getestet, wovon jeder ein (1) Zielresistenzgen des Revogene Carba C Assays trägt (n=2 Stämme pro Resistenzgen). Insgesamt wurden 240 Replikate des negativen Carbapenem-resistenten Bakterienstamms getestet, der keine Zielresistenzgene des Revogene Carba C Assays trägt.

An einem (1) Standort wurde von zwei (2) Bediennern eine Studie zur Reproduzierbarkeit zwischen Chargen durchgeführt. Die Studie erfolgte über 15 Tage unter Verwendung von drei (3) Revogene Carba C Assay-Set-Chargen (fünf Tage pro Set-Charge). Insgesamt wurden 120 Replikate für jeden der zehn (10) positiven Carbapenem-resistenten Bakterienstämme getestet, wovon jeder ein (1) Zielresistenzgen des Revogene Carba C Assays trägt (n=2 Stämme pro Resistenzgen). Insgesamt wurden 240 Replikate des negativen Carbapenem-resistenten Bakterienstamms getestet, der keine Zielresistenzgene des Revogene Carba C Assays trägt.

Die laborinterne Präzision wurde anhand von Daten bestimmt, die mit der Set-Charge Nr. 1 gewonnen wurden. Die Tests wurden von zwei (2) Bediennern ausschließlich am Standort Nr. 1 an insgesamt fünf (5) Tagen durchgeführt. Insgesamt wurden 40 Replikate für jeden der zehn (10) positiven Carbapenem-resistenten Bakterienstämme für die Analyse berücksichtigt, wovon jeder ein (1) Zielresistenzgen des Revogene Carba C Assays trägt (n=2 Stämme pro Resistenzgen). Außerdem wurden insgesamt 80 Replikate des negativen Carbapenem-resistenten Bakterienstamms berücksichtigt, der keine Zielresistenzgene des Revogene Carba C Assays trägt.

Alle Stämme wurden anhand von standardisierten 0,5 McFarland- (McF-) Suspensionen getestet.

Bei der Reproduzierbarkeit zwischen Labors lag die gesamte prozentuale Übereinstimmung für jeden positiven Stamm bei 100 % (120/120) und für den negativen Stamm bei 98,8 % (237/240) (**Tabelle 9**). Bei der Reproduzierbarkeit zwischen Chargen lag die gesamte prozentuale Übereinstimmung für jeden positiven Stamm bei 100 % (120/120) und für den negativen Stamm bei 99,6 % (239/240) (**Tabelle 10**). Die Mittelwerte für den Zyklusgrenzwert (Cycle Threshold, Ct) mit Varianzkomponenten der Standardabweichung (SD) und des Variationskoeffizienten (CV) sind ebenfalls in **Tabelle 9** und **Tabelle 10** dargestellt.

Bei der laborinternen Präzision lag die prozentuale Übereinstimmung für jeden positiven Stamm bei 100 % (40/40) und für den negativen Stamm bei 100 % (80/80) (**Tabelle 11**).

Tabelle 9. Ergebnisse der Studie zur Reproduzierbarkeit zwischen Labors mit einer (1) Revogene Carba C Assay-Set-Charge

Bakterienart	Resistenzgen und Variante	Standort 1		Standort 2		Standort 3		Gesamt-ergebnisse-/Gesamtzahl	Gesamte prozentuale Übereinstimmung ¹	Gesamt 95 % CI	Ct-Werte ²		
		Ergebnisse/ Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung	Ergebnisse/ Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung	Ergebnisse/ Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung				Mittelwert gesamt	SD	CV %
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,7	1,6	5,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,6	1,3	4,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,5	2,1	7,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,4	2,2	7,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,3	1,0	3,1
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,2	1,5	4,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,5	1,4	4,8
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,5	1,9	6,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	27,6	1,0	3,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,5	1,2	4,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativ	80/80	100 %	79/80	98,8 %	78/80	97,5 %	237/240	98,8 %	96,4 %-99,6 %	34,9	1,9	5,5

¹ Für den negativen Stamm wurde aus den negativen Ergebnissen eine prozentuale Übereinstimmung berechnet.

² Für die Resistenzgene und Varianten beziehen sich die gemeldeten Ct-Werte auf das vorgegebene Ziel. Für den negativen Stamm beziehen sich die gemeldeten Ct-Werte auf die PrC.

Tabelle 10. Ergebnisse der Studie zur Reproduzierbarkeit zwischen Chargen an einem (1) Standort mit drei (3) Revogene Carba C Assay-Set-Chargen

Bakterienart	Resistenzgen und Variante	Charge 1		Charge 2		Charge 3		Gesamt-ergebnisse-/Gesamtzahl	Gesamte prozentuale Übereinstimmung ¹	Gesamt 95 % CI	Ct-Werte ²		
		Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung	Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung	Ergebnisse/Gesamt	Prozentuale Übereinstimmung				Mittelwert gesamt	SD	CV %
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,0	1,1	3,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,2	1,4	4,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,6	2,2	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	30,8	2,3	7,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	29,5	1,4	4,8
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,9	1,5	5,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,2	1,5	5,2
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,6	1,6	5,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	27,5	1,0	3,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	40/40	100 %	40/40	100 %	40/40	100 %	120/120	100 %	96,9 %-100,0 %	28,1	1,4	4,8
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativ	80/80	100 %	79/80	98,8 %	80/80	100 %	239/240	99,6 %	97,7 %-99,9 %	33,0	2,9	8,8

¹ Für den negativen Stamm wurde aus den negativen Ergebnissen eine prozentuale Übereinstimmung berechnet.

² Für die Resistenzgene und Varianten beziehen sich die gemeldeten Ct-Werte auf das vorgegebene Ziel. Für den negativen Stamm beziehen sich die gemeldeten Ct-Werte auf die PrC.

Tabelle 11. Ergebnisse der Studie zur laborinternen Präzision an einem (1) Standort mit einer (1) Revogene Carba C Assay-Set-Charge

Bakterienart	Resistenzgen und Variante	Gesamte prozentuale Übereinstimmung ¹		Gesamt 95 % CI
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IMP-4	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC-4	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Escherichia coli</i>	NDM-5	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-181	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	100 % (40/40)		91,2 %-100,0 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativ	100 % (80/80)		95,4 %-100,0 %

Für den negativen Stamm wurde aus den negativen Ergebnissen eine prozentuale Übereinstimmung berechnet.

E-LABELING

Die Dokumentation zu kiesem Produkt steht online unter www.meridianbioscience.com/pi. Zur Verfügung. Papierexemplare sind auf Anfrage von Ihrem örtlichen Vertriebshändler oder telefonisch über die auf der Verpackung des Sets aufgeführten Rufnummern erhältlich.

REFERENCES

- He, Q, Gallagher J. Pharmacodynamic and pharmacokinetic considerations in the treatment of critically ill patients infected with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. 2017;8(4):440-452.
- Mollenkopf, Stull et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016.
- <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-clinicianfaq.html>
- Neuner, E, Gallagher J. Pharmacodynamic and pharmacokinetic considerations in the treatment of critically ill patients infected with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. 2017;8(4):440-452.
- Gniadek, TJ, et al. Carbapenem-resistant non-glucose- fermenting Gram-negative bacilli: the missing piece to the puzzle. *J Clin microbiol*. 2016;54(7):1700-1710.
- Kaye, KS & Pogue JM. Infections caused by resistant Gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy* 2015;35:949-962.
- Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories-5th ed. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. Revised Dec 2009
- CLSI M29-A4, 2014, Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline-4th ed.
- <https://www.cdc.gov/nndss/conditions/notifiable/2019/infectious-diseases/>
- CIFOR Analysis of State Legal Authorities, available at <http://www.cifor.us/>
- CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018. 28th ed.
- SN134822 Revogene® Operator's Manual.
- CLSI M02 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 2018. 13th ed.



Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.
2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud
BELGIUM
Tel: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
Email: info.bn1@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe France
34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
FRANCE
Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
Email: info.fr@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe B.V.
Zekeringstraat 17 A
1014BM Amsterdam
NETHERLANDS
Tel: +31 (0) 411 62 11 66
Fax: +31 (0) 411 62 48 41
Email: Info.bn1@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labelling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use-by date / Data di scadenza / Date de péremption / Fecha de caducidad / Verwendbar bis
LOT	Batch code / Codice di lotto / Code de lot / Código de lote / Chargennummer
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i> / Instrument de test diagnostique <i>in vitro</i> / Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> / <i>In-vitro-Diagnostikum</i>
	CE Mark / Marcatura CE / Symbole CE / Marcado CE / CE-Kennzeichen
REF	Catalog number / Numero di catalogo / Référence catalogue / Referencia / Bestellnummer
	Consult instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter le mode d'emploi / Consultar las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten
	Manufacturer / Produttore / Fabricant / Fabricante / Hersteller
	Contains sufficient for <n> tests / Contiene una quantità sufficiente per <n> test / Contient le matériel suffisant pour <n> tests / Contiene la cantidad suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Temperature limit / Limite di temperatura / Limite de température / Límite de temperatura / Temperaturgrenze
EC REP	Authorized representative in the European Community / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Représentant agréé dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter EU-Repräsentant
	Do not reuse / Non riutilizzare / Ne pas réutiliser / No reutilizar / Nicht wiederverwenden
	Keep dry / Conservare all'asciutto / Conserver au sec / Mantener seco / Vor Feuchtigkeit schützen
	Contains # pouches: 1 Disposable Transfer Tool (DTT), 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 PIE / Contiene # buste: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT) / Contient # sachets: Une cartouche PIE, Un tube échantillon, Un outil de transfert jetable (OTJ) / Incluye # bolsitas: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT) / Enthält # Beutel: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT)
	Humidity Limitation / Limitazione dell'umidità / Limite d'humidité / Limitación de humedad / Feuchtigkeitsbegrenzung
Rx Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé / No utilizar si el envase está dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist
	Keep away from sunlight / Tenere lontano dalla luce del sole / Tenir à l'écart de la lumière du soleil / Mantener alejado de la luz solar / Vor Sonnenlicht schützen
24x	Contains 24 Disposable Transfer Loops (DTL) / Contiene 24 loop di trasferimento monouso (DTL) / Contient 24 boucles de transfert jetables (DTL) / Contiene 24 bucles de transferencia desechables (DTL) / Enthält 24 Einwegübertragungsschleifen (DTL)
DTT	Disposable Transfer Tool (DTT) / Disposable Transfer Tool 9DTT) / Un outil de transfert jetable (OTJ) / Disposable Transfer Tool (DTT) / Disposable Transfer Tool (DTT)
PIE	Revogene Test Device / Dispositivo Test Revogene / Dispositif de test Revogene / Dispositivo para la Prueba Revogene / Revogene-Analysegefäß
EUA	For Emergency Use Authorization only / Solo per l'autorizzazione per l'uso di emergenza / pour autorisation d'utilisation d'urgence uniquement / para autorización de uso de emergencia solamente / nur für Notfallverwendungsaufzierung
LOOP	Disposable Transfer Loop / Loop di trasferimento monouso / Boucles de transfert jetables / Bucle de transferencia desechables / Einwegübertragungsschleifen
SBT	Sample Buffer Tube / Sample Buffer Tube / Un tube échantillon / Smaple Buffer Tube / Sample Buffer Tube
	Revogene Test Device / Dispositivo Test Revogene / Dispositif de test Revogene / Dispositivo para la Prueba Revogene / Revogene-Analysegefäß

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order call Customer Service Department at 800-543-1980.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BBL and Sensi-Disc are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
Thermo Fisher Scientific is a trademark of Thermo Fisher Scientific Inc.
Oxoid is a trademark of Thermo Fisher Scientific Inc.
Remel is a trademark of Thermo Fisher Scientific Inc.
Revogene and associated logos are registered trademarks of Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.
Made in Canada

TaqMan è un marchio registrato di Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC è un marchio commerciale di American Type Culture Collection.
BBL e Sensi-Disc sono marchi commerciali di Becton, Dickinson and Company.
Thermo Fisher Scientific è un marchio commerciale di Thermo Fisher Scientific Inc.
Oxoid è un marchio commerciale di Thermo Fisher Scientific Inc.
Remel è un marchio commerciale di Thermo Fisher Scientific Inc.
Revogene e i loghi associati sono marchi commerciali di Meridain Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.
Prodotto in Canada

TaqMan est une marque commerciale déposée de Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC est une marque commerciale de l'American Type Culture Collection.
BBL et Sensi-Disc sont des marques commerciales de Becton, Dickinson and Company.
Thermo Fisher Scientific est une marque commerciale de Thermo Fisher Scientific Inc.
Oxoid est une marque commerciale de Thermo Fisher Scientific Inc.
Remel est une marque commerciale de Thermo Fisher Scientific Inc.
Revogene et les logos connexes sont des marques déposées de Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.
Fabriqué au Canada

TaqMan es una marca registrada de Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC es una marca comercial de American Type Culture Collection.
BBL y Sensi-Disc son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company.
Thermo Fisher Scientific es una marca comercial de Thermo Fisher Scientific Inc.
Oxoid es una marca comercial de Thermo Fisher Scientific Inc.
Remel es una marca comercial de Thermo Fisher Scientific Inc.
Revogene, así como los logotipos asociados son marcas comerciales de Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.
Hecho en Canadá

TaqMan ist eine eingetragene Marke von Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC ist eine Marke der American Type Culture Collection.
BBL und Sensi-Disc sind Marken von Becton, Dickinson and Company.
Thermo Fisher Scientific ist eine Marke von Thermo Fisher Scientific Inc.
Oxoid ist eine Marke von Thermo Fisher Scientific Inc.
Remel ist eine Marke von Thermo Fisher Scientific Inc.
Revogene und die damit verbundenen Logos sind Marken von Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.
Made in Canada