

MAST ISOPLEX® *CRE-ART*

PARA USO EM INVESTIGAÇÃO E DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

DNA/LYO5 10 testes.

Utilização Pretendida

O Kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* destina-se ao Diagnóstico *in vitro* e deve ser manipulado por especialistas em Biologia Molecular. É baseado na amplificação isotérmica mediada por *loops* (*Loop-mediated isothermal amplification* ou LAMP) com vista à deteção qualitativa, e diferenciação de estirpes de Enterobacterales resistentes aos Carbapenemes (CRE), e de outras bactérias resistentes aos Carbapenemes, obtidas de culturas crescidas na noite anterior (*overnight culture*) originárias de amostras clínicas.

Método de análise e princípios

O MAST ISOPLEX® *CRE-ART* permite a deteção qualitativa e diferenciar o DNA das Carbapenemases OXA-48, OXA-23, OXA-24/OXA-40, KPC, VIM, NDM e IMP. O kit é composto por tiras de 8 tubos e cada tubo deteta em particular um alvo de DNA específico, de entre outros possíveis alvos (o que ocorre em sete dos oito tubos). Um DNA controlo da inibição é fornecido dentro da embalagem e deve ser adicionado antes do início do trabalho. O ensaio de controlo da inibição é efetuado no 8º tubo da tira de 8 tubos, e permitirá a identificação de possíveis inibições da amplificação do DNA na amostra, além de confirmar a integridade dos reagentes usados nos ensaios.

O Ensaio LAMP envolve o uso de primers específicos para 8 regiões distintas do DNA alvo, uma enzima DNA Polimerase com atividade de distensão da cadeia (strand displacement activity), substratos, e um corante fluorocromo intercalador a uma temperatura constante (63°C para o MAST ISOPLEX® *CRE-ART*). Devido à alta especificidade da tecnologia LAMP a presença de produto amplificado pode sinalizar a presença de DNA alvo em 30 minutos.

Componentes

Tabela 1: Componentes do Kit

Código do Kit	Conteúdo	Número	Volume	Cor da tampa	Informação adicional fornecida na embalagem
IC DNA	DNA controlo da inibição	1 tubo	<i>Pellet</i> limpo e desidratado	Verde	Armazenado em bolsa re-selável única, contendo 2 sacos c/ exsicante
RB3	Tampão de reconstituição	1 tubo	1.5mL	Laranja	O Tubo é colocado num suporte feito à medida
WTR	Água de grau de pureza Molecular	1 tubo	1.5mL	Preto	O Tubo é colocado num suporte feito à medida
CRE STRIP	<i>Pellet</i> de reagentes para alvos LAMP específicos	10 x tiras 8 tubos. Cada tubo é numerado individualmente (nºs 1 a 8)	<i>Pellet</i> branco	Límpido	CRE_STRIP são embalados individualmente em bolsa re-selável única, contendo 2 sacos c/ exsicante

Cada número inscrito nos tubos CRE STRIP indica o alvo específico a ser detetado conforme descrito na Tabela 2

Tabela 2: CRE STRIP definição dos tubos:

Número do tubo	Alvo detetado
1	OXA-48
2	OXA-23
3	OXA-24/OXA-40
4	KPC
5	VIM
6	NDM
7	IMP
8	Controlo da inibição

Equipamento adicional necessário

1. Equipamento real-time PCR adequado ou equipamento capaz de efetuar amplificações isotérmicas de DNA, assim como capaz de detetar por fluorescência o produto amplificado (consultar na Tabela 3, os instrumentos adequados ao uso com o MAST ISOPLEX® CRE-ART).
2. Meio de cultura microbiológico para o isolamento de uma única colónia visível crescida a partir da amostra de um doente (consultar na tabela 3, os meios de crescimento usados para isolar as colónias de amostras clínicas, durante o desenvolvimento do kit MAST ISOPLEX® CRE-ART).
3. Tubos de reação de 1.5mL livres de nucleases que servem para a ressuspensão da colónia isolada (Consultar o Procedimento de Análise).
4. Centrífuga de bancada com rotor para tubos de reação de 1.5mL.
5. Colocar a centrífuga ou microcentrífuga com um adaptador de tiras de 8 tubos (strips 4Ti).
6. Consumíveis de laboratório livres de dnases (*DNase Free*) como sejam, tubos de reação, pipetas e pontas de pipetas.
7. Luvas sem pó, descartáveis.
8. Pipetas calibradas de volume variável com capacidade de dispensar volumes de 10µL a 200µL.
9. Dispositivos sem nucleases como os usados na manipulação de bactérias (*toothpick*) ou pontas de pipeta.
10. Balde térmico contendo gelo ou bloco de frio.
11. Unidade com bloco de aquecimento, que possa suportar tubos de reação de 1.5mL e mantenha a temperatura a 95°C durante cinco minutos.
12. Equipamento de proteção pessoal (luvas e óculos) para a preparação de amostras.
13. Em função do equipamento de amplificação que vai ser usado, podem ser necessários suportes para conter as tiras de 8 tubos (o CRE STRIP usa tiras de 8 tubos (4Ti tiras de tubos)). Ver as instruções do fabricante sobre o tema que possam ser relevantes.

Tabela 3: Equipamento de Real-time PCR e placas com meios de cultura microbiológicos

Fabricante do Real-time PCR	Modelo
MAST – Qiagen	TS 2.4
Applied Biosystems	ABI 7500 FAST, ABI 7500
Fabricante de meios para Microbiologia	Media
E&O Laboratories Ltd	Columbia Agar, Mueller Hinton
Mast Diagnostica GmbH	CHROMagar™ KPC/CHROMagar™ ESBL, CHROMagar mSuperCARBA

Preparação dos Reagentes

Preparar o Controlo de inibição do DNA (ICDNA) da seguinte forma:

1. Colocar o tubo por breves instantes numa microcentrífuga, para garantir que o DNA liofilizado fica depositado no funo.
2. Adicionar 200µL de água de grau de pureza molecular, e deixar para dissolver, durante 5 minutos.
3. Agitar o conteúdo suavemente, colocando a ponta da pipeta e aspirando repetidamente de forma ascendente e descendente.
4. Colocar no gelo ou no bloco de frio até o seu uso efetivo, ou no caso de ser necessário um armazenamento mais prolongado deve efetuar alíquotas de volumes menores (tenha em conta que são necessários 10µL, por amostra testada).

O isolamento de colónias de bactérias desde amostras clínicas deve ser efetuado de acordo com as práticas microbiológicas normalizadas e de segurança definidas nas *Guidelines*.



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



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

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



Armazenamento e Validade após a 1ª abertura da embalagem

1. Os kits MAST ISOPLEX® *CRE-ART* são transportados à temperatura ambiente.
2. Armazene entre 2°C a 30°C a embalagem fechada.
3. Proteja os reagentes da exposição solar direta.
4. Os reagentes podem ser usados até a data de validade indicada na embalagem. A qualidade do produto não é assegurada após a data de validade ter expirado.
5. Após ressuspensão de ICDNA, a solução pode ser armazenada à temperatura entre 2°C e 8°C, no caso de ser utilizada no próprio dia. Se for necessário armazenar a solução já reconstituída, por períodos de tempo mais longos, deve efetuar alíquotas de menor volume (nota: 10µL é o volume necessário, por cada amostra testada) e armazenar à temperatura de (-20°C). Prevenindo-se assim, os ciclos de congelamento/descongelamento múltiplos.
6. O tampão (RB3) e a água de grau molecular (WTR) após abertura das respectivas embalagens devem ser armazenados a temperaturas entre 2°C e 30°C podendo ser usados até ao final do prazo de validade indicado.
7. No dia previsto para a realização dos testes, enquanto se prepara o ensaio, o CRE-STRIP reconstituído deve ficar guardado à temperatura entre 2°C e 8°C.

Avisos e Precauções

1. O kit foi concebido para ser usado exclusivamente por pessoal treinado no manuseamento do equipamento necessário e qualificado para a realização de técnicas de diagnóstico molecular.
2. O utilizador do kit deve assegurar a integridade da embalagem, da respetiva etiquetagem e dos componentes que compõem a embalagem antes da primeira utilização (as possíveis deficiências encontradas devem ser de imediato reportadas ao fabricante).
3. O kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* não deve ser utilizado após expirada a validade.
4. Em concordância com as diretivas nacionais locais, as amostras a partir das quais as colónias serão isoladas devem ser tratadas como infecciosas e/ou representando um risco biológico.
5. Os utilizadores do kit e seus componentes devem usar equipamento pessoal de proteção.
6. Devem ser tomadas as devidas precauções de forma a prevenir a contaminação por microrganismos ou nucleases dos reagentes MAST ISOPLEX® *CRE-ART* e das amostras.
7. Deve utilizar unicamente consumíveis regulares livres de nucleases como sejam: tubos de reação, pontas de pipetas e dispositivos *toothpick* para manipulação de bactérias.
8. Os tubos de reação após adição dos reagentes devem permanecer sempre fechados. Após a conclusão do trabalho devem igualmente ser descartados fechados, em concordância com as Regras de Saúde e Indicações de Segurança Locais.
9. De modo a evitar quaisquer contaminações com o produto amplificado, nunca abra os tubos CRE STRIP com conteúdo previamente submetido a amplificação.
10. Os tubos de reação não devem ser submetidos a agitação por vortex uma vez que a tensão tangencial criada poderá danificar a enzima e originar a formação de bolhas, que interferem com a deteção por fluorescência.
11. O utilizador deve assegurar-se igualmente, que todos os tubos de reação antes de uso não estão riscados ou partidos.
12. As áreas de trabalho devem ser dedicadas com espaços segregados: a) Manuseamento de amostras e isolamento de colónias; b) Procedimentos de Análise; c) Amplificação por real time-PCR e deteção estando garantida a disponibilidade e a alocação dos equipamentos necessários/área.
13. Assegurar que após incubação a 95°C por 5 minutos, os tubos de reação são colocados no gelo ou bloco de frio antes do seu conteúdo ser adicionado ao CRE STRIP de modo a prevenir a inativação dos seus componentes.
14. Assegurar que os tubos de reação que contêm amostra, o tampão (RB3) e o ICDNA se encontram bem fechados antes de serem colocados a incubar à temperatura de 95°C.
15. Na operação de equipamentos de aquecimento devem ser tomadas as devidas precauções, assim como, devem ser seguidas as normas e os procedimentos de segurança locais e/ou em vigor no país.
16. Assegurar que os equipamentos estão perfeitamente instalados, calibrados e funcionais garantindo ainda, a realização de manutenções regulares, de acordo com as instruções do fabricante.

Colheita da 1ª amostra, manuseamento e armazenagem

A 1ª amostra a ser testada com o MAST ISOPLEX® CRE-ART é uma colónia de bactérias isolada a partir de uma cultura proveniente de uma amostra clínica. Os testes devem ser efetuados partindo-se de uma colónia isolada da cultura de uma amostra clínica crescida durante a noite.

Procedimento da Análise

1. Pipete 90µL de tampão RB3 para um tubo de reação de 1.5mL.
2. Recorrendo a uma tampa de pipeta ou dispositivo *toothpick*, toque a superfície de uma colónia (~0.2McFarland; 10⁸cfu/mL) isolada de uma placa de cultura crescida na véspera, emulsionando a quantidade retirada de colónia no tubo de reação de 1.5mL (passo 1) e agitando suavemente.
3. Adicione 10µL de ICDNA reconstituído à mistura no tubo de reação. Agite o conteúdo pelo menos 5 vezes, colocando a ponta da pipeta e aspirando de forma ascendente e descendente.
4. Assegure que o tubo de reação se encontra bem fechado, e coloque-o à temperatura de 95°C durante 5 min.
5. Após o aquecimento do tubo de reação, remova-o imediatamente colocando-o sobre o gelo ou bloco de frio preparados, durante 5 minutos.
6. Após arrefecimento, agite a mistura reacional numa centrífuga durante (~ 5 segundos) e velocidade de ~6000rpm.
7. Adicione 10µl da mistura reacional a cada tubo do CRE STRIP.
8. Agite o CRE STRIP numa centrífuga de placas durante 5 segundos a ~2500rpm.
9. Posicione o CRE STRIP no equipamento disponível para efetuar a amplificação isotérmica (se necessário assegure-se que é usado um suporte adequado para as tiras de 8 tubos fornecidas com o kit).
10. Dê instruções ao equipamento para correr o ensaio LAMP.

Recorra se necessário ao Manual do Utilizador para se orientar na montagem e na programação do equipamento.

- a. Introduza os parâmetros do teste. Estes podem diferir em função do equipamento selecionado.

Tabela 4: Parâmetros do teste

Equipamento	Parâmetros			
ABI 7500 FAST ABI 7500	Temperatura: 63°C	Tempo do teste: 30 minutos	Tempo do Ciclo: 1 minuto	Referência de <i>background</i> : Nenhuma
TS2.4	Selecionar o protocolo CreArt_Eng_3			

Nota: se tiver disponível outro equipamento que não conste da lista acima deve seguir a temperatura e tempo indicados para o equipamento ABI7500/FAST.

- b. Selecionar o canal FAM para a deteção.

Controlo do Processo

Os kits MAST ISOPLEX® CRE-ART (e cada lote) são testados face às especificações predefinidas, de forma a assegurar a consistência da qualidade do produto, e para estar em concordância com o Sistema de Gestão da Qualidade implementado no Grupo Mast Lda, ou seja, EN ISO13485:2016 'Dispositivos médicos – Sistemas de Gestão da Qualidade – Requerimentos para fins regulatórios' e IVDD 98/79/EC 'Dispositivos Médicos para diagnóstico in vitro'.

O tubo nº8 do CRE STRIP atua como indicador de controlo de qualidade para cada CRE STRIP em teste, uma vez que deve produzir sempre um resultado positivo. O teste com o tubo nº8 tem por alvo o ICDNA, que deve ser adicionado à amostra antes desta ser aquecida. Um resultado positivo, neste tubo é por isso revelador de que o tratamento com aquecimento não conseguiu desnaturar o DNA. Sendo assim, os componentes CRE STRIP têm o comportamento esperado e o ICDNA terá sido adicionado à amostra antes do tratamento térmico. Um resultado negativo no tubo nº8 do CRE STRIP é indicativo da existência de degradação no DNA durante o tratamento térmico, ou da ausência de ICDNA na amostra, ou ainda do mau funcionamento dos reagentes no CRE STRIP. No caso de obtenção de um resultado negativo deve assegurar-se, de que foi efetuada a preparação adequada do equipamento, e seguido corretamente o procedimento do teste, e se optar por repetir o teste, assegure-se que os reagentes se encontram dentro do prazo de validade. Por forma a assegurar que não são introduzidas contaminações durante o procedimento de análise, deve ser efetuado um teste na ausência de ICDNA ou de amostra. Substitua o volume de ICDNA ou de amostra, por água com grau de pureza molecular (WTR) que é fornecido com o kit MAST ISOPLEX® CRE-ART. Todos os tubos devem demonstrar resultados negativos. Um resultado positivo é indicativo da presença de DNA não-específico. Antes de repetir o teste assegure-se de que não existe contaminação em nenhum dos equipamentos usados nem nas áreas de trabalho. No caso de encontrar um resultado positivo, como o que foi referido, contacte o suporte técnico do grupo Mast. Por forma a assegurar que os tubos CRE STRIP estão a funcionar corretamente deve usar DNA de controlo positivo específico para cada um dos tubos alvo em substituição das amostras a testar. Um resultado positivo deve ser exibido em cada tubo onde foi adicionado controlo positivo. No caso de se obter um resultado negativo este facto é indicativo de inibição do teste LAMP ou de falta de adição de DNA de controlo positivo. Repita o teste. Contacte o suporte técnico do grupo Mast para mais informações sobre DNA de controlo positivo.

Tabela 5: Interpretação dos controlos

	CRE STRIP (número do tubo)								Interpretação dos Resultados	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Amostra Controlo										
Controlo sem o alvo (apenas adicionado o ICDNA)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Resultado Válido:
Controlo sem o alvo (apenas adicionado o ICDNA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Resultado inválido: Repetir o teste garantindo ausência de dna (<i>DNA free</i>) em todo o equipamento
DNA de Controlo Positivo DNA +ICDNA	- Em qualquer tubo (tubos de 1 a 7)								+	Resultado inválido: Repetir o teste garantindo a adição de DNA Controlo

+ denota uma amplificação positiva e Ct < 30; - denota uma amplificação negativa e ausência de valor de Ct.

Interpretação dos resultados

A análise de cada teste é conduzida pelo software do equipamento. Em geral, um resultado positivo é indicado quando a intensidade do resultado é claramente diferente, em um dado ponto temporal, quando comparado com a intensidade do resultado de um controlo com ausência de DNA alvo (*None template control*). Para que um resultado seja válido é necessário que o tubo nº 8 (ICDNA) evidencie um resultado positivo. No caso de o tubo nº8 do CRE STRIP reportar um resultado negativo, o teste deve ser repetido na presença de ICDNA.

Tabela 6: MAST ISOPLEX® CRE-ART interpretação de resultados

CRE STRIP (número de tubo)								Interpretação de Resultados
1	2	3	4	5	6	7	8	
+	-	-	-	-	-	-	+	Resultado Válido: Positivo para OXA-48
-	+	-	-	-	-	-	+	Resultado Válido: Positivo para OXA-23
-	-	+	-	-	-	-	+	Resultado Válido: Positivo para OXA-24/OXA40
-	-	-	+	-	-	-	+	Resultado Válido: Positivo para KPC
-	-	-	-	+	-	-	+	Resultado Válido: Positivo para VIM
-	-	-	-	-	+	-	+	Resultado Válido: Positivo para NDM
-	-	-	-	-	-	+	+	Resultado Válido: Positivo para IMP
-	-	-	-	-	-	-	+	Resultado Válido: amostra Negativa (ausência de DNA alvo na amostra)
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	Resultado Inválido: Repetir o teste assegurando que o ICDNA é adicionado à amostra em teste antes do tratamento térmico da amostra
+ em número superior a um tubo (tubos 1 a 7)							+	Resultado Válido: Positivo para mais do que um DNA alvo

+ denota uma amplificação positiva e Ct < 30; - denota uma amplificação negativa e ausência de valor de Ct.

No caso da obtenção de resultados duvidosos é recomendável que a amostra seja re-testada e os testes efetuados em duplicado garantindo a confirmação do resultado. Em alternativa, deve confirmá-los recorrendo a métodos diferentes.

Um resultado positivo é evidenciado por um aumento da intensidade de fluorescência em um intervalo de tempo relativamente curto, e sempre dentro do intervalo de tempo do teste, ou seja, de 30 minutos. Enquanto um resultado negativo não demonstra um rápido aumento da intensidade de fluorescência ao longo do mesmo período de tempo (consultar as Figuras 1 a 2).

Figura 1: Curva típica de amplificação usando o TS2.4 *Klebsiella pneumoniae* possuindo o gene OXA48 e testada com o kit MAST ISOPLEX® CRE-ART

Nota: um intervalo de tempo é equivalente a 0.5 minutos, e a curva é amplificada ao longo do tempo de teste de 30 minutos

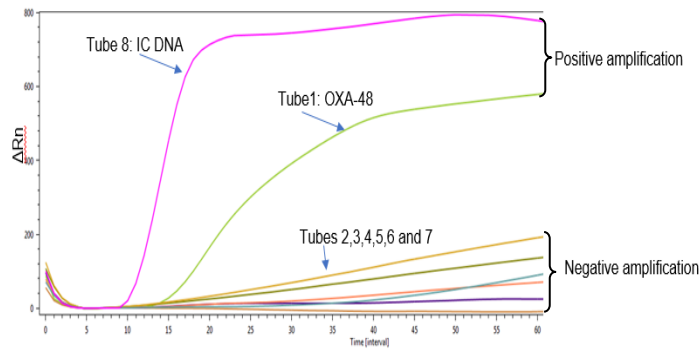
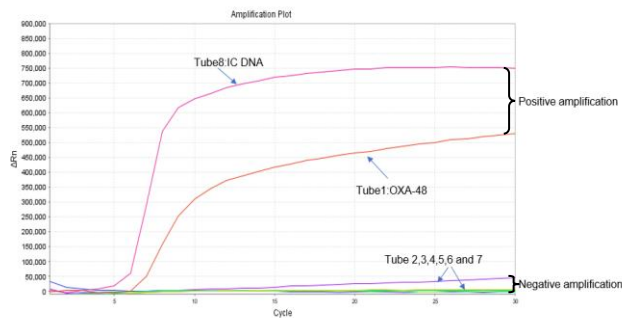


Figure 2: Curva típica de amplificação usando o ABI 7500 FAST *Klebsiella pneumoniae* possuindo o gene OXA48 e testada com o kit MAST ISOPLEX® CRE-ART



Características do teste

Traceabilidade e valores atribuídos a calibradores e materiais de controlo

Todos os serviços técnicos, de manutenção ou calibração efetuados no equipamento que é usado em conjunto com o kit MAST ISOPLEX® CRE-ART seguem as recomendações nacionais e locais, e todos os componentes são sujeitos a controlo de qualidade, sendo testados e validados em concordância com essas recomendações.

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do kit MAST ISOPLEX® CRE-ART foi determinada usando o plasmídeo pEX-A218 que incorpora o gene DNA alvo. Os testes foram conduzidos em 10 vezes diluições seriadas do DNA do plasmídeo, na gama de valores entre 10pg a 0.001fg. Foram efetuadas 8 réplicas por cada plasmídeo e em cada gama de concentrações sendo os dados avaliados com a análise Probit.

Tabela 7: Sensibilidade analítica (baseada em plasmídeos que contêm sequência alvo específicos)

Gene Alvo	Valor <i>Probit</i> Femtogramas/ μ L (Intervalo de confiança: 95%)	Valor <i>Probit</i> Nº de cópias de DNA/ μ L (Intervalo de confiança: 95%)
OXA-48	0.13fg/ μ L (0.07 a 0.75)	44 cópias/ μ L (22.5 a 244.2)
OXA-23	0.28 fg/ μ L (0.15 a 1.19)	92 cópias / μ L (49.7 a 386.7)
OXA-24/OXA-40	2.1 fg/ μ L (1.05 a 2.02)	683 cópias / μ L (344 a 6576)
KPC	0.1 fg/ μ L (0.05 a 0.58)	35 cópias / μ L (17.4 a 187.4)
VIM	0.1 fg/ μ L (0.05 a 0.62)	35 cópias / μ L (16.6 a 195.7)
NDM	0.2 fg/ μ L (0.08 a 1.36)	53 cópias / μ L (27.6 a 442.7)
IMP	2.7 fg/ μ L (1.12 a 27.8)	879 cópias / μ L (364.8 a 9035.3)

Tabela 8: Sensibilidade analítica (baseada em estirpes bacterianas produtoras de Carbapenemases)

Estirpe	ACTC/ATCC Estirpe de controlo	Família do Gene Alvo	Valor <i>Probit</i> ufc/ μ L (Intervalo de confiança: 95%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NCTC 13424	OXA-23	57 cfu/ μ L (16.71 to 925)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NCTC 13302	OXA-24/OXA-40	43 cfu/ μ L (18.4 to 1043.5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC	12 cfu/ μ L (7.0 to 53.2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM	12cfu/ μ L (5.5 to 72.6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2472	NDM	15 cfu/ μ L (9.8 to 140.3)
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP	5 cfu/ μ L (2.7 to 25.5)

Especificidade analítica

O kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* apresenta uma especificidade analítica de 100% quando testado com o plasmídeo. Que incorpora os alvos específicos usados nos testes de sensibilidade analítica, e não forma registadas reações Cruzadas, com nenhuma das espécies (possuidoras de conhecidas B-Lactamases) listadas (consultar a Tabela 9).

Tabela 9: Testes de Reatividades-Cruzadas

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

Precisão

A precisão do kit MAST ISOPLEX® *CRE ART* foi determinada em termos da repetibilidade (variação *inratchs* com um único *batch* e realização de seis testes ao longo de um dia, consultar as Tabelas 10a e 10b) e reprodutibilidade (variação *entre batchs*, e com três *batchs* considerados nos testes, consultar as Tabelas 11a e 11b).

Como os testes realizados pela tecnologia LAMP não são quantitativos a medição da precisão não é uma medida absoluta da sua *performance* quando se pretende avaliar o tempo necessário para obter positividade de um teste. Os dados obtidos demonstram para a repetibilidade para os vários alvos valores dos desvios padrão na gama de 0.35 a 1.94 e % CV na gama de valores entre 2.29 e 12.31., e para a reprodutibilidade, obtivera-se desvios standard na gama de valores entre 0.21 e 3.02 e as % CV de 2.1 a 17.96.

Uma % de CV <10 é considerada muito boa, de 10 a 20 é boa, de 20 a 30 é aceitável e >30 é considerada não aceitável. Em consequência os valores obtidos são considerados boa.

Tabela 10a: Repetibilidade dos alvos específicos do kit MAST ISOPLEX® *CRE ART*.

Alvo	Valor médio de Ct	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%CV)
OXA-48	15.13	1.12	7.67
OXA-23	15.18	1.87	12.31
OXA-24/OXA-40	19.21	1.94	10.07
KPC	15.34	0.35	2.29
VIM	12.10	1.08	8.88
NDM	10.66	0.47	4.43
IMP	14.23	1.27	8.91

Tabela 10b: Repetibilidade para o DNA Controlo da inibição (ICDNA)

Alvo	Valor médio de Ct	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
ICDNA	11.59	1.35	11.61

Tabela 11a: Reprodutibilidade do kit MAST ISOPLEX® CRE ART

Alvo	Valor médio de Ct	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%CV)
OXA-48	13.2	1.17	8.86
OXA-23	12.99	1.05	8.03
OXA-24/OXA-40	17.98	3.02	17.96
KPC	14.52	0.57	3.92
VIM	10.34	1.44	13.93
NDM	9.99	0.21	2.1
IMP	13.03	0.58	4.43

Tabela 11b: Reprodutibilidade do kit MAST ISOPLEX® CRE ART para DNA Controlo da Inibição (ICDNA)

Alvo	Valor médio de Ct	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
ICDNA	10.63	0.27	2.52

Características de desempenho em Diagnóstico

As características de desempenho em Diagnóstico do kit MAST ISOPLEX® CRE (ver a Tabela 12a e 12b) foram determinadas em 248 isolados clínicos de Enterobacterales (n=203), espécies de *Acinetobacter* (n=37) e estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* (n=8). As Carbapenemases, que não constituem alvos do teste não serão identificadas quando estiverem presentes nos isolados testados, sendo os resultados classificados como verdadeiros negativos. O trabalho foi realizado pelo departamento de Microbiologia, Hospitais de "Newcastle upon Tyne" e NHS Foundation Trust.

Tabela 12a: Detecção de Carbapenemases em 248 bactérias Gram-negativas com o kit MAST ISOPLEX® CRE-ART kit

Tipo de Isolado / Gene Alvo	Número testado	Número detetado pela MAST Kit ISOPLEX® CRE-ART
Enterobacterales Produtores de Carbapenemases		
KPC	16	16
VIM	13	13
IMP	12	12
OXA-48 like	61	61
NDM	52	52
NCM-A	1	0
Pseudomonas aeruginosa Produtoras de Carbapenemases		
VIM	2	2
NDM	2	2
Acinetobacter species Produtores de Carbapenemases		
OXA-23-like	23	23
OXA-24-like/ OXA-40-like	2	2
NDM	3	3
OXA-51-like	12	0
OXA-58-like	5	0
OXA-69-like	1	0
Isolados sem Carbapenemases	53	2

Note: O Kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* não tem por alvo, os genes: NCM-A, OXA-51like, OXA-58-like ou OXA-69-like DNA e os resultados do teste realizado com estas estirpes são considerados como verdadeiros negativos. A partir dos dados acima listados as características de desempenho em diagnóstico do kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12b: Características de desempenho em diagnóstico do kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART*

Características em Diagnóstico	
Sensibilidade	100%
Especificidade	97%
Valor Preditivo Positivo	99%
Valor Preditivo Negativo	100%

Intervalo de medida

O kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* permite realizar testes qualitativos, mas, no entanto, foi testado para determinar a sensibilidade analítica tendo sido usados alvos específicos de DNA com valores compreendidos na gama valores, entre 100fg e 1pg/reação.

Intervalo de referência biológico

O kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* permite a realização de testes qualitativos e não quantitativos consequentemente os intervalos de referência biológicos não são relevantes.

Limitações do procedimento de análise

- Os resultados obtidos com o kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* não devem ser usados apenas com a finalidade de obtenção do diagnóstico de uma certa condição clínica, mas antes devem ser avaliados conjuntamente com outros fatores clínicos.
- O Kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* está validado para efetuar testes, em colónias de bactérias, isoladas de culturas de amostras clínicas.
- A quantidade de bactérias inoculada (verificar o passo 2 do “Procedimento de análise”) deve ter uma concentração equivalente a ~0.2McFarland ou 10⁸ufc/mL.
- O kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* foi validado com os equipamentos e os meios microbiológicos apresentados neste documento. O uso de equipamentos ou meios microbiológicos alternativos requer a validação pelo utilizador antes da utilização do kit para fins de diagnóstico.
- A presença de DNases ou protéases pode originar resultados inválidos, pelo que o utilizador deve assegurar-se de que os equipamentos e acessórios usados sempre livres de DNase (*DNase-free*).
- Concentrações muito grandes de DNA alvo podem causar um elevado ruído (*background*) e proporcionar resultados falsos negativos pelo facto de o teste de amplificação, atingir o valor máximo de *threshold* do equipamento. Uma correta aderência às Instruções para Uso, no que toca em particular a recolher pequenas quantidades de colónias, deverá prevenir esta ocorrência.
- A amplificação LAMP pode produzir um resultado positivo a partir de quantidades muito pequenas do DNA alvo, no entanto, valores inferiores aos limites de deteção indicados podem não ser reprodutíveis.
- O kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* é concebido para amplificar especificamente certas classes de β-Lactamases e subgrupos. O teste permitirá amplificar as classes/subgrupos identificados na Tabela 13.

Tabela 13: Famílias e seus membros, identificados como Alvos pelo kit MAST ISOPLEX® CRE-ART

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

9. O Kit MAST ISOPLEX® CRE-ART não consegue amplificar os genes OXA-535, OXA-436, OXA-54, VIM-7, VIM 61, NDM-25 e NDM-26
10. O utilizador deve sempre ter como referência a curva de amplificação e aos dados não tratados (*raw data*) que foram gerados durante a realização do teste. Deste modo está assegurado, que um resultado positivo se deve à amplificação de alvos específicos, e não são uma consequência do efeito de rampa (*ramping effect*), que pode ser visualizado em equipamentos onde o *threshold* residual (*background threshold*) não pode ser manualmente modificado.
11. Nos kits MAST ISOPLEX® CRE-ART cada CRE STRIP deve ser usado apenas com uma única amostra. Por forma a estar assegurada a validade de uma amplificação positiva, o utilizador deve realizar em um CRE STRIP um controlo sem DNA alvo, e em outro CRE STRIP um controlo positivo.

Referências Bibliográficas

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