

Manual do utilizador

Check-Direct CPE for BD MAX™

Para a deteção e diferenciação dos genes de carbapenemases de colónias puras de *Enterobacteriaceae*

Versão 1.6

Data de publicação: 10.07.2017

REF 18-0082  24

CE IVD

Índice

Utilização pretendida	2
Introdução e princípio do método.....	2
Conteúdo do kit (para 24 reações)	2
Materiais necessários mas não fornecidos com o kit	2
Armazenamento e estabilidade	2
Advertências e precauções.....	3
Instruções de utilização.....	4
Procedimentos de preparação de amostras	4
Operação do BD MAX™	4
Interpretação dos resultados	5
Perguntas mais frequentes (FAQ) e Resolução de problemas	6
Limitações	7
Legenda dos símbolos utilizados	7
Assistência técnica	8
Anexo 1: Criação do programa de teste do Check-Direct CPE v.4.30B ou superior.....	9
Anexo 2: Características do desempenho.....	10

Utilização pretendida

O Check-Direct CPE for BD MAX™ é um teste de diagnóstico qualitativo *in vitro* para a rápida deteção dos genes de carbapenemases em *Enterobacteriaceae*. Este teste destina-se a ser utilizado em culturas de bactérias provenientes de amostras clínicas. O Check-Direct CPE deteta a presença dos genes de carbapenemases KPC, NDM, VIM e OXA-48, atualmente a principal causa da produção de carbapenemases em *Enterobacteriaceae*. O ensaio utiliza o sistema BD MAX™ para a extração de ADN e, posteriormente, PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos em conjunto com reagentes universais e descartáveis para o sistema BD MAX™. O Check-Direct CPE para o BD MAX™ pode ser usado como meio auxiliar para identificar, prevenir e controlar *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases que colonizam pacientes em instalações de cuidados de saúde. O Check-Direct CPE for BD MAX™ não se destina ao diagnóstico de infeções com *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases nem a orientar ou monitorizar o tratamento destas infeções. São necessárias culturas paralelas para recuperar microrganismos para tipagem epidemiológica, testes de sensibilidade e identificação confirmatória adicional.

Introdução e princípio do método

A emergência a nível mundial e a disseminação da resistência a carbapenemes entre *Enterobacteriaceae* é uma séria ameaça para a saúde pública. Estes organismos estão associados a elevadas taxas de mortalidade e têm o potencial para se disseminarem amplamente. A causa mais comum de resistência a carbapenemes em *Enterobacteriaceae* é a expressão de carbapenemases, *ou seja*, *Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases* ou CPE. As CPE têm uma resistência elevada ou total a carbapenemes e à maioria dos outros antibióticos β -lactâmicos. Atualmente, a grande maioria das CPE estão associadas à presença de uma das seguintes carbapenemases codificadas num plasmídeo: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), VIM (Verona metalo-beta-lactamase codificada por integrons), NDM (Nova Deli metalo-beta-lactamase) ou OXA-48 (Oxacillinase-48). Além disso, muitas vezes as CPE têm outros determinantes de resistência a não- β -lactâmicos, resultando em isolados resistentes a múltiplos fármacos e pan-resistentes.

O Check-Direct CPE é um ensaio multiplex de PCR em tempo real para a deteção dos genes de carbapenemases KPC, OXA-48, NDM e VIM. O ensaio baseia-se no reconhecimento específico e amplificação de sequências alvo por PCR e a deteção simultânea da acumulação de produtos de amplificação de PCR com sondas de ADN fluorescentes. Para os KPC, VIM, OXA-48 e NDM existem muitas variantes de genes e o Check-Direct CPE foi concebido para detetar com fiabilidade todas as variantes. O Check-Direct CPE for BD MAX™ emprega cinco sondas fluorescentes diferentes e permite a deteção e a discriminação dos 4 genes de carbapenemases e do SPC alvo de controlo, que monitoriza a extração de ADN e a amplificação de PCR.

Conteúdo do kit (para 24 reações)

Componentes (n.º de mat.)	Descrição
Tubos de reagentes de CPE (9-0062)	24 tubos selados (selo roxo)
Controlo positivo de CPE (9-0060)	1 tubo (tampa roxa) 100 μ l
Manual do utilizador (9-0079)	Folheto informativo – transferir do website

Materiais necessários mas não fornecidos com o kit

Consumíveis	Equipamento
<ul style="list-style-type: none"> BD MAX™ ExK DNA-1 Extraction Kit (ref.: 442818) BD MAX™ DNA MMK Master Mix (ref.: 442848) BD MAX™ PCR Cartridges (ref: 437519) Bata/Luvas (sem pó) descartáveis de laboratório Pipetas e pontas (com filtro) descartáveis para volumes de 10 até 1000 μl Soro fisiológico (150 mM de NaCl ou 0,9% p/v de NaCl) Água Milli-Q ou água bidestilada 	<ul style="list-style-type: none"> Instrumento de PCR em tempo real: Sistema BD MAX™, versão do software 4.30B ou superior Densitómetro adequado para suspensões bacterianas Misturador Vortex

Armazenamento e estabilidade

Os componentes do ensaio Check-Direct CPE for BD MAX™ são estáveis entre 2 a 25 °C até à data de validade indicada. Não utilize componentes após o prazo de validade.

Os tubos de reagentes do Check-Direct CPE for BD MAX™ e controlo positivo são fornecidos numa bolsa selada. Para proteger os reagentes da humidade, volte a selar imediatamente a bolsa depois de abrir. Os tubos de reagentes são estáveis durante um período máximo de 14 dias a 2-25 °C após a abertura inicial e re-selagem da bolsa.

Advertências e precauções

- O ensaio Check-Direct CPE for BD MAX™ destina-se ao uso diagnóstico *in vitro*.
- Este produto apenas pode ser utilizado no Sistema BD MAX™.
- Não utilize o kit se o rótulo de segurança da caixa exterior estiver partido.
- Não utilize os reagentes se as bolsas protetoras estiverem abertas ou danificadas quando fornecidas.
- Feche as bolsas protetoras dos reagentes rapidamente com o fecho de correr após cada utilização. Elimine a presença excessiva de ar nas bolsas antes de selar.
- Verifique se as tiras de reagentes apresentam níveis corretos de líquido (certifique-se de que os líquidos estão no fundo dos tubos).
- Verifique se todas as pontas de pipeta estão presentes nas tiras de reagentes.
- Não retire o excicante das bolsas de reagentes.
- Não utilize os reagentes se o excicante não estiver presente ou estiver partido no interior das bolsas de reagentes.
- Não utilize os reagentes se a folha de alumínio estiver partida ou danificada.
- Não misture os reagentes de bolsas e/ou kits e/ou lotes diferentes.
- Não troque nem reutilize as tampas, dado que pode ocorrer contaminação e comprometer os resultados do teste.
- Tenha cuidado ao utilizar soluções químicas, visto que podem alterar a legibilidade dos códigos de barras da Mistura de reação e do Tubo de extração.
- Não utilize reagentes e/ou materiais após o prazo de validade.
- Uma boa técnica de laboratório é essencial para o desempenho adequado deste ensaio. Em virtude da elevada sensibilidade analítica deste teste, deverá ser tomada extrema precaução para preservar a pureza de todos os materiais e reagentes.
- Para evitar a contaminação com amplificadores, não desfaça os Cartuchos de PCR do BD MAX™ após a utilização. Os vedantes nos Cartuchos de PCR do BD MAX™ destinam-se a impedir a contaminação.
- A realização do ensaio Check-Direct CPE for BD MAX™ fora dos intervalos de tempo recomendados pode produzir resultados inválidos. Os ensaios não realizados dentro dos intervalos de tempo especificados devem ser repetidos com uma nova amostra.
- Podem testar-se controlos adicionais de acordo com as orientações ou requisitos dos regulamentos locais, nacionais e/ou comunitários ou de organizações de acreditação.
- Se forem realizados outros testes de PCR ou culturas no laboratório, deve ter-se o cuidado de assegurar que os componentes do ensaio Check-Direct CPE for BD MAX™, todos os reagentes adicionais necessários para o teste e o Sistema BD MAX™ não estão contaminados. Evite a contaminação microbiana e por desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes em qualquer momento. As luvas devem ser substituídas antes de manusear reagentes e cartuchos.
- As amostras devem ser sempre manuseadas como se fossem infecciosas e de acordo com os procedimentos de segurança laboratorial, tais como os descritos no documento do CLSI M2911 e em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.
- Utilize vestuário protetor e luvas descartáveis durante o manuseamento de qualquer reagente.
- Lave cuidadosamente as mãos depois de realizar o teste.
- Não fume, não beba, não mastigue nem coma, em áreas onde ocorre manuseamento de amostras e reagentes do kit.
- Elimine os resíduos e os reagentes não utilizados em conformidade com os regulamentos locais, nacionais e/ou comunitários.
- Consulte o Manual do utilizador do Sistema BD MAX™ para obter advertências, precauções e procedimentos adicionais.

Leia o protocolo completo antes de iniciar o teste

Instruções de utilização

Procedimentos de preparação de amostras

Preparação de teste para bactérias de cultura

1. Inocule placas de ágar nutriente com as amostras clínicas ou as estirpes bacterianas a serem testadas e deixe incubar, de um dia para o outro, a 37 °C. Os meios típicos de crescimento incluem gelose de sangue, gelose de MacConkey e gelose de soja tríptica.
2. Prepare uma suspensão de células bacterianas em soro fisiológico de McFarland 0,5 – 1,0 ($\approx 1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL) proveniente de uma ou mais colónias de cada placa utilizando uma ansa de 1 ou 10 µL.
3. Pipete 10 µL da suspensão de células bacterianas ($\approx 1 - 2 \times 10^6$ UFC/mL) e 500 µL de água Milli-Q ou água bidestilada num único Tubo de tampão de amostras de ADN SB-1, fornecido pela BD com o kit de extração de ADN (consulte a secção *Materiais necessários mas não fornecidos com o kit*).
4. Feche o Tubo de tampão de amostras de ADN com uma tampa de septo e agite-o no Vortex durante 10 segundos a velocidade baixa.
5. Transfira os Tubos de tampão de amostra com as suspensões de células bacterianas a serem analisadas para a sala de PCR.

Preparação das reações de controlo

Para validar a execução, realize reações de controlo positivo e negativo para cada execução de PCR do Check-Direct CPE. O controlo positivo é fornecido com o kit.

- **Controlo positivo:**

Pipete 10 µL de controlo positivo e 500 µL de água Milli-Q ou água bidestilada num Tubo de tampão de amostras. Agite no Vortex durante 10 segundos.

- **Controlo negativo:**

Pipete 500 µL de água Milli-Q ou água bidestilada num Tubo de tampão de amostras. Agite no Vortex durante 10 segundos.

Operação do BD MAX™

1. Configuração do PCR em tempo real multiplex

O Quadro 1 apresenta a configuração do PCR em tempo real multiplex com os alvos detetados em cada canal de deteção do Sistema BD MAX™.

Quadro 1: Configuração da qPCR multiplex

Detetor	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Canal	1	2	3	4	5
Alvo	KPC	VIM	OXA-48	NDM	SPC*

*SPC: Controlo do processamento da amostra

Quando o teste for realizado pela primeira vez, crie o programa de teste de PCR "Check-Direct CPE", conforme descrito no Anexo 1.

2. Configuração do Suporte do BD MAX™

2.1. Coloque os suportes do sistema BD MAX™ com o número de Tiras de reagente unificado™ de ADN necessárias para o número de amostras a testar. Bata suavemente em cada tira para assegurar que todos os líquidos estão no fundo do seu recipiente.

2.2. Prepare as Tiras de reagente unificado:

2.2.a. Encaixe um tubo de reagente BD Exk-1 (selo branco) de extração de ADN na posição 1 da tira de ADN (consulte a Figura 1).

2.2.b. Encaixe um tubo DNA MMK Mistura de reação (selo verde/amarelo) na posição 2 da tira de ADN (consulte a Figura 1).

2.2.c. Encaixe um tubo de reagente de CPE (selo azul/roxo) na posição 3 da tira de ADN (consulte a Figura 1).

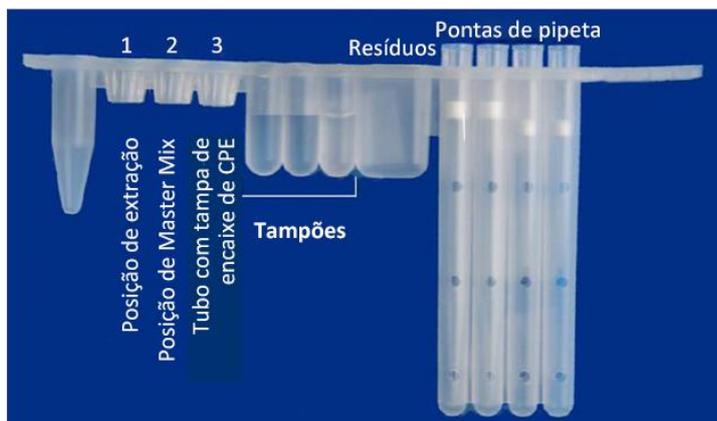


Figura 1: Configuração da Tira de reagente unificado de ADN.

3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 3.1 Abra o separador **Executar** do **software v4.30B** ou superior do Sistema BD MAX™ e preencha a Lista de trabalho.
- 3.2 Selecione o **Teste "Check-Direct CPE"**. Consulte o Anexo 1 para criar o teste "Check-Direct CPE", caso ainda não exista no menu Teste.
- 3.3 Introduza o código de barras do **Tubo de tampão de amostras** usando o leitor de códigos de barras (pode também digitar manualmente o código de barras). Comece com a posição 1 do suporte A. Coloque cada um dos Tubos de tampão de amostra na sua posição correspondente nos suportes do BD MAX™ (com tampa de septo).
- 3.4 Introduza as informações de identificação do paciente ou amostra na caixa **Acesso**. Verifique se todas as informações do paciente ou amostra correspondem aos seus Tubos de tampão de amostra específicos no suporte.
- 3.5 Carregue o(s) suporte(s) no Sistema BD MAX™. (O Suporte A está posicionado no lado esquerdo do instrumento e o Suporte B no lado direito).
- 3.6 Carregue o(s) cartucho(s) de PCR do BD MAX™.
- 3.7 Feche a porta do instrumento e selecione **Iniciar execução**.

Interpretação dos resultados

Pontos importantes antes de começar: para uma descrição pormenorizada sobre como analisar dados, consulte o *Manual do utilizador do Sistema BD MAX™*.

Inspecione sempre visualmente a placa de amplificação de cada amostra testada em relação aos valores de C_T obtidos com o software.

1. Resultados apresentados

O software BD MAX™ apresenta os valores de C_T e as curvas de amplificação para cada canal de deteção de cada amostra testada da seguinte forma:

- Um valor de C_T de **0** indica que não houve qualquer valor de C_T calculado pelo software com o Limiar especificado (consulte o Anexo 1). Uma curva de amplificação da amostra que apresente um valor "0" de C_T tem de ser verificada manualmente.
- Um valor de C_T de **-1** indica que não ocorreu qualquer processo de amplificação válido. Verifique que não há qualquer curva de amplificação para a amostra com um valor de C_T de -1 nos resultados gráficos.
- Qualquer outro valor de C_T deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e de acordo com o método de interpretação descrito nos Quadros 2 e 3.

2. Interpretação

2.1 Validação da corrida

Confirme que a execução do PCR em tempo real é válida antes da interpretação de dados dos resultados. Confirme que não existe qualquer relatório de falha do Sistema BD MAX™. Se aplicável, verifique as curvas de amplificação de controlo positivo e negativo. O Quadro 2 mostra os critérios para uma execução válida em tempo real do Check-Direct CPE no sistema BD MAX™. Se os valores de C_T dos controlos não forem os esperados, consulte a secção Perguntas frequentes e resolução de problemas "3".

Quadro 2: Critérios para uma execução válida com o teste Check-Direct CPE. (N.R. = não relevante)

Tipo de amostra*	C _T 475/520 KPC	C _T 530/565 VIM	C _T 585/630 OXA-48	C _T 630/665 NDM	C _T 680/715 SPC
Controlos positivos	32 ±3	30 ±3	29 ±3	31 ±3	N.R.
Amostra negativa	-1	-1	-1	-1	29 ±3

2.2 Interpretação dos resultados

Se a execução tiver sido validada, interprete os resultados como positivos, negativos ou não resolvidos com os valores de C_T obtidos para as amostras, seguindo as diretrizes resumidas no Quadro 3. As execuções não resolvidas devem ser testadas novamente.

Os valores de C_T obtidos com células bacterianas estarão geralmente num intervalo de C_T específico para cada alvo devido à quantidade bem definida de células usadas como material de entrada para o teste. No entanto, tenha em atenção que os valores de C_T podem diferir significativamente entre estirpes individuais. O **Quadro 3** especifica o limite superior deste intervalo de C_T; um valor mais elevado de C_T sugere a contaminação da amostra ou uma estirpe que não é pura. Portanto, este será considerado um resultado "não resolvido".

Quadro 3: Diretrizes de interpretação de dados para células bacterianas (N.R. = não relevante)

C _T 475/520 KPC	C _T 530/565 VIM	C _T 585/630 OXA-48	C _T 630/665 NDM	C _T 680/715 SPC	Interpretação
≤33	≤27	≤26	≤32	N.R.	Positivo
-1	-1	-1	-1	29 ±3	Negativo
> 33	>27	>26	>32	N.R.	Não resolvido
-1	-1	-1	-1	-1	Não resolvido

NOTAS IMPORTANTES:

- Se o Sistema BD MAX™ apresentar resultados indeterminados ou incompletos (IND ou INC) devido a uma falha no Sistema BD MAX™, contacte o representante local da BD.

Perguntas mais frequentes (FAQ) e Resolução de problemas

Consulte a secção "Resolução de problemas" do Manual do utilizador do Sistema BD MAX™ para obter informações adicionais.

1. Os resultados em tempo real não apresentam valores de C_T ou a interpretação indica que a amostra não está resolvida. Causas possíveis e resolução de problemas:

- A reação de PCR foi inibida por substâncias endógenas e exógenas testadas. Por favor, repita os testes das amostras. Quando ainda inibida, uma quantidade menor de amostra de entrada pode melhorar os resultados.
- Ocorreu uma falha na extração de ADN, pois o SPC não foi detetado.
- O BD DNA MMK pode estar fora de validade.
- Ocorreu um erro no manuseamento de líquidos: verifique as tiras de reagente unificado e o cartucho de PCR para determinar onde ocorreu o problema de manuseamento de líquidos (exemplo: bolha de ar no cartucho) e execute novamente a amostra. Se o problema persistir, contacte o representante local da BD.

2. Resolução de problemas para resultados não resolvidos.

Para resultados não resolvidos: repita o teste com a amostra original preparando um novo Tubo de tampão de amostras. Em alternativa, teste amostras colhidas recentemente ou utilize uma quantidade menor de amostra.

3. Os resultados em tempo real não apresentam valores de C_T para o controlo positivo ou a interpretação indica que a amostra não está resolvida?

Causas possíveis e resolução de problemas:

- A solução de controlo positivo não foi adicionada.
- O BD DNA MMK pode estar fora da validade.
- Ocorrência de bolhas de ar na câmara de reação de PCR do controlo positivo.

4. Os resultados em tempo real apresentam sinais fluorescentes muito baixos em todas as amostras e canais de deteção, incluindo o sinal do SPC.

Causas possíveis e resolução de problemas:

- Os tubos de reagentes de CPE que contêm as sondas fluorescentes e os iniciadores poderão estar degradados. Verifique a data de validade e certifique-se de que os tubos de CPE foram armazenados corretamente.
- O Sistema BD MAX™ pode ser responsável por estes resultados. Consulte o Manual do utilizador do BD MAX™ ou contacte o seu representante local da BD.

5. O Sistema BD MAX™ indica um erro ou uma falha.

Consulte o Manual do utilizador do instrumento BD MAX™ ou contacte o seu representante local da BD.

6. As amostras duplicadas testadas com o teste Check-Direct CPE não produzem resultados idênticos.

Os valores de C_T de amostras idênticas podem variar entre reações individuais. Grandes variações, valores > 2 de C_T , sugerem erros de pipetagem ou outras diferenças entre as amostras duplicadas.

Limitações

O Check-Direct CPE utiliza uma série de marcadores de ADN específicos para detetar a presença dos genes de carbapenemases KPC, NDM, OXA-48 e VIM, que atualmente representam as carbapenemases mais prevalentes clinicamente. O teste deteta todas as variantes atualmente conhecidas de KPC, NDM, OXA-48 e VIM, exceto a VIM-7, uma variante rara encontrada apenas na *Pseudomonas aeruginosa*. Convém referir que não são detetadas outras famílias de genes de carbapenemases raros. O teste destina-se a ser utilizado com células bacterianas puras como material de entrada.

A qualidade do ADN de entrada é um fator importante para obter resultados fiáveis com o Check-Direct CPE. Para suspensões de células, as densidades celulares corretas são um fator importante para obter resultados fiáveis e o procedimento descrito neste manual deve ser rigorosamente seguido. O ensaio foi testado extensivamente com ADN purificado a partir de bactérias Gram-negativas, tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Pseudomonas*, com excelentes resultados. No entanto, nunca pode ser excluída a possibilidade de que outras bactérias Gram-negativas ou certas estirpes das espécies anteriores possam produzir resultados insatisfatórios. O Check-Direct CPE não pode fazer, e não faz, qualquer representação ou garantia de que é capaz de detetar corretamente os genes de carbapenemases em todas as espécies, subespécies ou tipos Gram-negativos, ou em todas as amostras clínicas. Pode ser necessário confirmar os resultados com metodologias adicionais em casos específicos (por exemplo, para amostras regulamentares). Devido à alta variabilidade dos genomas bacterianos, é possível que certos subtipos não possam ser detetados. O teste reflete o grau de conhecimentos da Check-Points Health B.V. A presença de múltiplas espécies de bactérias numa amostra pode dificultar a interpretação do teste. À semelhança do que acontece com outros ensaios de diagnóstico, os resultados deste teste apenas podem ser interpretados em conjunto com dados laboratoriais e clínicos adicionais aos quais a pessoa responsável tenha acesso. A utilização deste ensaio limita-se a pessoal apropriadamente qualificado, com boa formação na realização de métodos de deteção molecular baseados em ADN.

Legenda dos símbolos utilizados

Símbolo	Definição
	Controlo de CPE
	Para uso diagnóstico <i>In Vitro</i>
	Número de catálogo
	Código de lote
	Utilizar antes de AAAA-MM
	Consultar as instruções de utilização
	Fabricante
	Limites de temperatura
	Contém o suficiente para < n > testes

Assistência técnica

support@check-points.com

+31 317 453 908

Embora tenha o maior cuidado no desenvolvimento e preparação do protocolo, a Check-Points não pode assumir qualquer responsabilidade por erros, omissões e/ou alterações futuras aqui descritos.

Citações bibliográficas: ao descrever um procedimento para publicação utilizando este produto, por favor, refira-se ao mesmo como *Check-Direct CPE*.

Aviso ao comprador:

Este produto é vendido sob licença da PHRI Properties e só pode ser usado ao abrigo dos direitos de patente da PHRI Properties para diagnósticos *in vitro* humanos, testes alimentares, testes veterinários ou investigação.

Os compostos de supressão e corantes neste produto são vendidos sob licença da Biosearch Technologies, Inc. e estão protegidos por patentes já emitidas ou em processo de candidatura nos EUA e a nível mundial. A concessão da licença abrange aplicações humanas de diagnóstico *in vitro* (IVD).

Marcas comerciais

BD e BD MAX™ são marcas comerciais registadas da Becton Dickinson GmbH

Check-Points Health BV
Binnenhaven 5
6709 PD Wageningen
Países Baixos

Tel.: +31 317 453 908
Fax: +31 317 210 147
info@check-points.com
www.check-points.com



Anexo 1: Criação do programa de teste do Check-Direct CPE v.4.30B ou superior

Pontos importantes antes de começar: consulte o Manual do utilizador do Sistema BD MAX™ para obter instruções detalhadas sobre como operar o Sistema BD MAX™ e a versão do software **4.30B ou superior**.

Para criar um novo teste, no separador **Editor de teste**, selecione **Criar** e aplique as seguintes instruções:

- No separador **Informações básicas**, insira os seguintes parâmetros:
 - Nome do teste:** *Check-Direct CPE*.
 - Tipo de extração:** selecione *Exk DNA-1 (plasma/soro)*.
 - Formato de Mistura de reação:** selecione *Type 1: BD MMK or MMK(SPC) and Dried Primers & Probes* (Tipo 1: BD MMK ou MMK(SPC) e sondas e iniciadores liofilizados)
 - Parâmetros de extração da amostra:** selecione *Default settings* (Predefinições), consulte o Quadro A.
 - Cálculo de Ct:** selecione *Consultar Ct no ponto de inflexão*.

Guarde os parâmetros

- No separador **Definições de PCR**, insira os seguintes parâmetros:
 - Nome alternativo, Ganho de PCR e Limiar:** para cada detetor de canal, insira os parâmetros corretos especificados no Quadro B.
 - Compensação de cor:** insira os parâmetros corretos especificados no Quadro C.

Guarde os parâmetros

- No separador **Passos de teste**, insira os passos de PCR, conforme especificado no Quadro D.

Guarde os parâmetros

Quadro A: Parâmetros de extração da amostra.

Parâmetros	Valor
Tempo de aquecimento de lise	10
Temperatura de lise	37
Altura de ponta de amostra	1600
Volume de amostra	937,5
Volume de lavagem	500
Volume de neutralização	12,5
Tempo de aquecimento de DNase	----

Quadro B: Parâmetros de Ganho.

Detetor	Nome alternativo	Ganho	Limiar
475/520	KPC	40	100
530/565	VIM	80	150
585/630	OXA-48	30	150
630/665	NDM	80	150
680/715	SPC	40	150

Quadro C: Parâmetros de interferência espectral.

	Canal de receção falso					
	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715	
Canal de excitação	475/520		0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0		0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0		7.4	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0		0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	4.4	

Quadro D: Parâmetros dos Passos de PCR do teste.

Nome do passo	Tipo de perfil	Ciclos	Tempo	Temp. (°C)	Detetar
Desnaturação	Hold (Espera)	1	600	98	NÃO
Amplificação e deteção	2 - temperatura	45	15	98	NÃO
			62	60	SIM

Anexo 2: Características do desempenho

Especificidade *In silico*

A especificidade do teste de diagnóstico em tempo real Check-Direct CPE for BD MAX™ é assegurada pela seleção dos iniciadores e sondas corretos, bem como pela seleção de condições de reação rigorosas. As sequências de iniciadores e sondas foram concebidas para identificar especificamente as variantes de genes indicadas no Quadro a seguir. Foi assumida uma correspondência de sequência de 100% com os iniciadores e as sondas por análise *in silico* para garantir uma detecção fiável de cada uma das variantes apresentadas. Existem disparidades individuais com os iniciadores e as sondas em algumas variantes, das quais estava previsto que a detecção não fosse comprometida. Esta confirmação foi efetuada ao testar essas variantes com variantes que eram 100% homólogas.

Foram testadas sequências de iniciadores e sondas para detetar potenciais homologies com genes provenientes de outros organismos, utilizando todas as sequências de genes presentes no banco genético internacional a 1 de abril de 2014 (GenBank, base de dados de sequências genéticas do NIH), com uma análise de comparação de sequências. Não foi encontrada qualquer homologia cruzada com outros organismos para os iniciadores e sondas selecionados.

Gene de Carbapenemase	Variantes detetadas
KPC	1 – 17
NDM	1 – 10
VIM	1 – 6 e 8 – 38
OXA-48	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247, 370

Especificidade analítica

A especificidade analítica do teste de diagnóstico em tempo real Check-Direct CPE for BD MAX™ foi determinada ao testar a reatividade cruzada com amostras que contêm uma grande quantidade de organismos não-alvo. É apresentada uma descrição geral destas estirpes no Quadro a seguir. Foi realizado um estudo retrospectivo com 100 estirpes bacterianas de 9 espécies Gram-negativas diferentes, que foram previamente identificadas com o teste Check-MDR CT103 de diagnóstico microarray da Check-Points (Check-Points Health).

Todos os isolados apresentaram resultados negativos com o Check-Direct CPE para o ensaio BD MAX™ e o controlo interno foi detetado com fiabilidade em todas as amostras. A especificidade foi de 100% com base nas estirpes de referência testadas.

Espécie	Estirpes testadas
<i>Citrobacter freundii</i>	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	24
<i>Escherichia coli</i>	47
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2

Inclusividade analítica

Foi realizado um estudo retrospectivo com 93 estirpes bacterianas de 14 espécies Gram-negativas diferentes, que foram previamente identificadas como carbapenemases-positivas com o teste Check-MDR CT103 de diagnóstico microarray da Check-Points (Check-Points Health). Todas as 93 estirpes bacterianas foram tipificadas corretamente para os genes de carbapenemases alvo. Os resultados estão apresentados no Quadro a seguir. A inclusividade foi de 100% para as estirpes testadas.

Número de estirpes testadas	Resultado do Check-MDR CT103	Resultado do Check-Direct CPE	Inclusividade de resultados
19	KPC	KPC	100%
14	NDM	NDM	100%
36	VIM	VIM	100%
23	OXA-48	OXA-48	100%
1	NDM + OXA-48	NDM + OXA-48	100%
1	VIM + OXA-48	VIM + OXA-48	100%

Desempenho clínico

O desempenho clínico do Check-Direct CPE para o ensaio BD MAX™ foi avaliado num laboratório de referência central, utilizando isolados de bactérias não suscetíveis a carbapenemases enviados a partir de vários centros clínicos geograficamente espalhados. Foi selecionado um total de 450 isolados e representativo de 438 Enterobacteriaceae e 12 Pseudomonas spp. Para referência, foi avaliada a presença e identidade dos genes de carbapenemases nestes isolados por PCR específica dos genes e/ou análise com o ensaio Check-MDR CT102 da Check-Points. Foram cultivados isolados em placas de gelose de MacConkey com um disco de ertapenem de 10 mg e processados utilizando o procedimento deste Manual. Em relação ao método de referência, o ensaio Check-Direct CPE demonstrou sensibilidade geral e especificidade de 100% e 100%, respetivamente.

Espécies e genes de Carbapenemases do painel de isolados bacterianos

Espécie	Genes específicos de CPE						
	KPC	NDM	VIM	OXA-48	NDM + OXA-48	IMP	NENHUM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	62	52	55	59	2	0	7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	0	12	3	0	1	0
<i>Klebsiella spp.</i>	0	0	0	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	9	28	8	29	0	2	5
<i>Enterobacter spp.</i>	18	14	16	8	0	8	10
<i>Pseudomonas spp.</i>	0	0	0	0	0	11	1
Outras*	5	6	9	1	0	1	1
Total	100	100	100	100	2	24	24

*23 isolados incluindo *Citrobacter spp.* (n=15), *Raoultella spp.* (n=3), *Leclercia adecarboxylata* (n=2), *Serratia marcescens* (n=2) e *Kluyvera georgiana* (n=1).

Desempenhos globais do Check-Direct CPE versus o método de referência

CPE		Referência		Total
		+	-	
PCR de CPE do BD MAX	+	402	0	402
	-	0	48	48
Total		402	48	450

Sensibilidade: 100%
Especificidade: 100%

Desempenho do Check-Direct CPE versus o método de referência para KPC

KPC		Referência		Total
		+	-	
PCR de CPE do BD MAX	+	100	0	100
	-	0	350	350
Total		100	350	450

Sensibilidade: 100%
 Especificidade: 100%

Desempenho do Check-Direct CPE versus o método de referência para OXA-48

OXA-48		Referência		Total
		+	-	
PCR de CPE do BD MAX	+	102	0	102
	-	0	348	348
Total		102	348	450

Sensibilidade: 100%
 Especificidade: 100%

Desempenho do Check-Direct CPE versus o método de referência para VIM

VIM		Referência		Total
		+	-	
PCR de CPE do BD MAX	+	100	0	100
	-	0	350	350
Total		100	350	450

Sensibilidade: 100%
 Especificidade: 100%

Desempenho do Check-Direct CPE versus o método de referência para NDM

NDM		Referência		Total
		+	-	
PCR de CPE do BD MAX	+	102	0	102
	-	0	348	348
Total		102	348	450

Sensibilidade: 100%
 Especificidade: 100%

Bibliografia:

Findlay, J., Hopkins, K.L., Meunier, D. and Woodford, N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 2015 May;70(5): 1338-42. doi: 10.1093/jac/dku571. Epub 2015 Jan 27.