

NOTICE of CHANGE dated 14/11/18

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«CRE ELITe MGB[®] Kit»

Ref. RTS200ING

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- *Change of the probe used for OXA-48-like genes detection..*

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



CRE ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS200ING



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 2
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 3
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 4
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 5
PROCEDIMENTO	página 6
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 12
REFERÊNCIAS	página 18
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 19
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 20
SÍMBOLOS	página 21
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 22

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «CRE ELITE MGB® Kit» faz parte de um ensaio qualitativo de amplificação de ácidos nucleicos para a deteção de ADN dos genes de resistência à carbapenema **KPC**, **NDM**, **VIM**, **IMP**, **OXA-48-like*** da *Enterobacteriaceae* em amostras de ADN extraídas de esfregaços retais e hemocultura.

O produto está previsto para utilização como auxiliar no rastreio de infeções por *Enterobacteriaceae* positivas para genes de resistência à carbapenema, em conjunto com os dados clínicos do paciente e outros resultados de testes laboratoriais.

O produto é também compatível com amostras de ADN extraídas de isolado de cultura para a caracterização de *Enterobacteriaceae* positivas para genes de resistência à Carbapenem.

*Para a lista completa das variantes genéticas detetadas por este produto, consulte o capítulo "Características de desempenho".

CRE ELITE MGB® Kit

reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF RTS200ING

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real multiplexada realizada em associação com o **ELITE InGenius®**, um sistema automático integrado para extração, amplificação, deteção e interpretação de resultados.

A partir do ADN extraído de cada amostra sujeita a teste, são realizadas diferentes reações de amplificação pela **CRE PCR Mix** na PCR Cassette para amplificar os seguintes genes de forma a conferir resistência ao antibiótico carbapenema:

- genes da família KPC, detetados pela sonda específica de KPC (Canal 1),
- genes da família NDM, detetados pela sonda específica de NDM (Canal 4),
- genes da família VIM, detetados pela sonda específica de VIM (Canal 4),
- genes da família IMP, detetados pela sonda específica de IMP (Canal 4),
- genes da família OXA-48-like, detetados pela sonda específica de OXA (Canal 5).

Para além disso, o Controlo Interno da extração e inibição também é amplificado no cartucho. O controlo interno baseia-se numa sequência artificial (IC2) detetado pela sonda específica (Canal 2).

As sondas com tecnologia TaqMan™ MGB são ativadas quando são hibridizadas com o produto específico da reação de amplificação e são hidrolisadas pela enzima Taq ADN polimerase. À medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. O processamento de dados permite a deteção de qualquer ADN de genes de resistência à carbapenema na amostra inicial.

O ensaio foi validado com o **ELITE InGenius**.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «CRE ELITE MGB® Kit» fornece a CRE PCR Mix, uma mistura completa **pronta a usar** para amplificação em tempo real, **aliquotada em oito tubos de teste**. Cada tubo contém **280 µL** de solução, suficiente para **12 testes** em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão) quando usado com o sistema **ELITE InGenius**.

A CRE PCR Mix contém os primers e sonda específicos para:

- os primers e a sonda específicos para a família de genes **KPC**. A sonda KPC (Canal 1) é marcada com fluoróforo FAM, estabilizada pelo grupo MGB® e inativada por humidade não fluorescente,
- os primers e a sonda específicos para a família de genes **NDM**. A sonda NDM (Canal 4) é marcada com fluoróforo AP593, estabilizada pelo grupo MGB® e inativada por humidade não fluorescente,
- os primers e a sonda específicos para a família de genes **VIM**. A sonda VIM (Canal 4) é marcada com fluoróforo AP593, estabilizada pelo grupo MGB® e inativada por humidade não fluorescente,
- os primers e a sonda específicos para a família de genes **IMP**. A sonda IMP (Canal 4) é marcada com fluoróforo AP593, estabilizada pelo grupo MGB® e inativada por humidade não fluorescente,
- os primers e a sonda específicos para a família de genes **OXA-48-like**. A sonda OXA (Canal 5) é marcada com fluoróforo AP693, estabilizada pelo grupo MGB® e inativada por humidade não fluorescente,
- os primers específicos e a sonda para a sequência sintética **IC2** do controlo interno. A sonda IC (Canal 2) é marcada com fluoróforo AP525, estabilizada pelo grupo MGB® e inativada por humidade não fluorescente,

A CRE PCR Mix contém o tampão, o cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleótidos, os estabilizadores e a enzima de polimerase de ADN com ativação térmica (início a quente).

Nota: os três genes da família metal beta-lactamase, NDM, VIM e IMP, são detetados por diferentes sondas com o mesmo corante fluorescente e, depois, detetados pelo mesmo Canal NDM VIM IMP e não podem ser distinguidos.

O produto é suficiente para **96 testes em associação com o ELITE InGenius**, incluindo controlos.

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
CRE PCR Mix	Mistura de reação completa	8 x 280 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifuga de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água de grau de biologia molecular.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ADN das amostras a serem analisadas, o controlo interno da extração e inibição, o positivo control da amplificação e os consumíveis **não** estão incluídos neste produto.

Para a extração de ADN automática, amplificação em tempo real e interpretação dos resultados das amostras a serem analisadas, é necessário o instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) e os seguintes Assay Protocols (Protocolos de Ensaio) específicos (ELITechGroup S.p.A.):

- parâmetros para o positivo control da amplificação «**CRE ELITE_PC**»,
- parâmetros para o negativo control da amplificação «**CRE ELITE_NC**»,
- parâmetros para as amostras a serem analisadas «**CRE ELITE_RcS_200_100**» e «**CRE ELITE_BC_200_100**».

Com o instrumento «**ELITE InGenius**» são necessários os seguintes produtos genéricos:

- cartuchos de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumíveis para extração e amplificação «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificação «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- pontas «**300 µL Universal Fit Filter Tips**» (Axygen BioScience Inc., CA, EUA, ref. TF-350-L-R-S),
- caixas «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Como modelo do controlo interno da extração e inibição, é necessário o produto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE). Esta é uma solução estabilizada contendo dois ADNs plasmídeos e ARN genómico do fago MS2.

Como modelo do positivo control da amplificação, é necessário o produto específico «**CRE - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR200ING). Esta é uma solução estabilizada de ADNs plasmídeos.

Como dispositivo de colheita para amostras de esfregaços retais, são recomendados os seguintes produtos genéricos:

- eNAT™ kit (COPAN Italia S.p.A., ref. 606CS01R), esfregaço e frasco com 2 mL de meio,
- FecalSwab™ (COPAN Italia S.p.A., ref. 470CE), esfregaço e frasco com 2 mL de meio.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido exclusivamente para utilização *in vitro*.

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com 3% de hipoclorito de sódio ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas com o produto antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

São necessárias batas de laboratório, luvas e ferramentas para preparação da sessão de trabalho.

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

As PCR Cassettes devem ser manuseadas de modo a reduzir, tanto quanto possível, a difusão do produto de amplificação para o ambiente, para evitar a contaminação da amostra e do reagente.

Avisos e precauções específicos para os componentes

A **CRE PCR Mix** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

A **CRE PCR Mix** pode ser congelada e descongelada para um máximo de **quatro sessões**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Esfregaços retais colhidos em eNAT™ kit

Recomenda-se que os esfregaços retais para extração de ADN sejam colhidos no eNAT™ kit e identificados de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportados a +2/+8 °C e guardados a +2/+8 °C durante um período máximo de 4 semanas, caso contrário, devem ser congelados e guardados a -20 °C durante um período máximo de seis meses ou a -70 °C para períodos mais longos. Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra em meio eNAT™ para o tubo de sonicação fornecido com o «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

Esfregaços retais colhidos em FecalSwab™ kit

Recomenda-se que os esfregaços retais para extração de ADN sejam colhidos em FecalSwab™ e identificados de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportados a +2 / +8 °C e armazenados a +2 / +8 °C durante um máximo de três dias. Antes da análise com este produto, deve transferir 0,5 mL de amostra em meio FecalSwab™ para um tubo eNAT™ limpo com 2,0 mL de meio, agitado em vórtex. As amostras diluídas em meio eNAT™ podem ser armazenadas a +2/+8 °C durante um período máximo de 4 semanas ou congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de seis meses ou a -70 °C durante períodos mais longos. Após a adição de 0,5 mL de amostra ao meio FecalSwab™, o tubo eNAT™ pode ser colocado diretamente no sistema como um tubo primário.

Nota quando a extração de ADN de esfregaços retais é realizada com o **ELITE InGenius** e o **ELITE InGenius® Software** versão 1.2 (ou versões posteriores), use Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) **CRE ELITE_RcS_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o CPE - Internal Control a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Hemocultura

As amostras de hemocultura devem ser identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais. As amostras têm de ser transportadas e armazenadas à temperatura ambiente durante um máximo de 24 horas.

Antes da análise com este produto, dilua a amostra numa relação de 1:1000 em água ultrapurificada de grau molecular (pelo menos 10 µL de amostras em 10 mL de água ultrapurificada), misture por meio de vórtice e transfira 0,2 mL de amostras diluídas para um tubo de sonicação fornecido com «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

Nota: quando a extração de ácidos nucleicos da hemocultura for realizada com o **ELITE InGenius** e o **ELITE InGenius® Software** versão 1.2 (ou versões equivalentes posteriores), utilize o protocolo de extração **CRE ELITE_BC_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o CPE a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

O produto é compatível para utilização com as seguintes amostras clínicas:

Isolados de cultura

Antes da análise com este produto, dilua a amostra num tubo de eNAT™ fresco com 2,0 mL de meio, tirando com um laço uma alíquota de colónia isolada, submeta a vórtice e transfira 0,2 mL de amostra diluída para o tubo de sonicação fornecido com o «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Nota: quando a extração de ácidos nucleicos de isolados de cultura for realizada com o **ELITE InGenius** e o **ELITE InGenius® Software** versão 1.2 (ou versões equivalentes posteriores), utilize os protocolos de extração **CRE ELITE_BC_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o CPE a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Substâncias interferentes

Os dados disponíveis relativos à inibição causada por fármacos e outras substâncias são comunicados no parágrafo "Substâncias interferentes" do capítulo "Características de desempenho".

Nota: Um elevado conteúdo de matriz fecal colhida com o esfregaço retal (amostra com elevada turvação) pode inibir o ensaio.

Controlos de amplificação

Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar os controlos de amplificação para o lote do reagente de amplificação que será usado nos testes: como positive control da amplificação, use o produto **CRE - ELITE Positive Control** (não fornecido com este kit), em associação com o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) **CRE ELITE_PC**, como negative control da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) **CRE ELITE_NC**.

Nota: O sistema **ELITE InGenius** requer resultados aprovados e válidos dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados.

Os resultados do controlo da amplificação, aprovados e guardados na base de dados, irão expirar **após 15 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Positive e Negative Controls em associação com o lote do reagente de amplificação em utilização.

Para além disso, os controlos da amplificação devem ser novamente executados quando:

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados da análise de controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento **ELITE InGenius**.

Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise, extração e amplificação, testando como controlos do processo uma amostra testada negativa e uma amostra testada positiva ou um material de referência.

PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do **CRE ELITE MGB® Kit** com o sistema **ELITE InGenius** consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema,
- preparação da sessão,
- revisão e aprovação de resultados.

Verificação da prontidão do sistema

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o **ELITE InGenius** e selecionar o modo de início de sessão "**CLOSED**" (Fechado),
- certificar-se de que os controlos da amplificação (Controlos, Positive Control CRE, Negative Control CRE) são executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Se não existirem controlos da amplificação aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes,
- escolher o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Assay Protocols (Protocolo de Ensaio) fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITE MGB®, o instrumento ELITE InGenius e a matriz citada.

O Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) disponível para teste da amostra com o produto **CRE ELITE MGB® Kit** está descrito na tabela seguinte.

Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) para o CRE ELITE MGB® Kit			
Nome	Matriz	Relatório	Características
CRE ELITE_RcS_200_100	Zaragatoa retal	Positivo/ Negativo	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) para o CRE ELITE MGB® Kit			
Nome	Matriz	Relatório	Características
CRE ELITE_BC_200_100	Hemocultura	Positivo/ Negativo	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicção: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

Se o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup da sua localidade.

Preparação da sessão

O produto **CRE ELITE MGB® Kit** pode ser usado com o sistema **ELITE InGenius** para realizar:

- Execução integrada (Extract + PCR) (Extrair + PCR),
- Execução de amplificação (PCR Only) (Apenas PCR),
- Execução de amplificação para Positive Control e Negative Control (Apenas PCR),

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: o sistema ELITE InGenius pode ser ligado ao "Laboratory Information Server" (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS) que permite carregar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Estão descritos a seguir os passos principais para a preparação dos três tipos de execução.

A. Execução integrada

Para configurar uma execução integrada com extração e amplificação da amostra, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

- Descongele os tubos da CRE PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele o CRE PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele os tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
- Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluição do extraído) é de 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) a ser usado na coluna "Assay" (isto é, CRE ELITE_RcS_200_100).
- Certifique-se de que o "Protocol" (Protocolo) apresentado é: "Extract + PCR" (Extrair + PCR).
- Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position":
 - se for usado um tubo primário, selecione "Tubo primário",
 - se for usado um tubo secundário, selecione "Tubo de sonicção".
 Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a CPE e a CRE PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Tip Racks (Suportes de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.

- Carregue as "PCR Cassettes", os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 200", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas, seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" (Iniciar) para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no "Tubo de eluição" deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **4 sessões de trabalho** de 3 horas cada.

B. Execução da amplificação

Para preparar uma execução de amplificação a iniciar a partir de Ácidos nucleicos extraídos, realize os passos seguintes de acordo com a GUI:

- Descongele os tubos da CRE PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele o CRE PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
- Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluição do extraído) é de 100 µL.
- Para cada Rastreo de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) a ser usado na coluna "Assay" (isto é, CRE ELITE_RcS_200_100).
- Selecione "PCR Only" (Apenas PCR) na coluna "Protocol" (Protocolo).
- Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]). Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a CRE PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) selecionado seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Tip Racks (Suportes de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as "PCR Cassettes" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" (Iniciar) para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída no "Tubo de eluição" deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **4 sessões de trabalho** de 3 horas cada.

C. Execução de amplificação para Positive Control e Negative Control

Para preparar a execução de amplificação para o Positive Control e Negative Control, realize os passos seguintes em conformidade com a GUI:

- Descongele os tubos da CRE PCR Mix para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 12 reações em condições ideais de consumo do reagente (pelo menos 2 testes por sessão). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.

Nota: Descongele o CRE PCR Mix num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Descongele o tubo CRE - Positive Control para a sessão. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution Tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
- Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
- Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" (Volume de eluição do extraído) é de 100 µL
- No Track de interesse, selecione o "Assay Protocol" (Protocolo de Ensaio) a ser usado na coluna "Assay" (Ensaio).
- Para o Positive Control, selecione CRE ELITE_PC na coluna "Assay" (Ensaio) e preencha o número do lote e a data de validade do CRE - Positive Control,
- Para o Negative Control, selecione CRE ELITE_NC e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
- Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a CRE PCR Mix no "Inventory Block" (Gestor do reagente) selecionado seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue/verifique os Tip Racks (Suportes de Ponta) na "Inventory Area" (Área dos reagentes) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as "PCR Cassettes", um tubo com CRE - Positive Control e um tubo com água para biologia molecular (CRE Negative Control) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" (Iniciar) para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução o restante Positive Control deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. Evite derramar o Controlo positivo. O restante Negative Control deve ser eliminado.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **4 sessões de trabalho** de 3 horas cada.

Revisão e aprovação de resultados

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display" (Exibição dos resultados). Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios ("Sample Report" ou "Track Report"). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: o sistema ELITE InGenius pode ser ligado ao "Laboratory Information System" (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS) através do qual é possível enviar os resultados da sessão de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

O sistema **ELITE InGenius** gera os resultados utilizando o produto **CRE ELITE MGB® Kit** através do seguinte procedimento:

- Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação,
- Validação dos resultados da amostra,
- Elaboração do relatório do resultado da amostra.

A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos genes de resistência (canais **KPC**, **NDM VIM IMP** e **OXA**) na reação de amplificação de Positive Control e Negative Control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do ELITE InGenius com os parâmetros incluídos nos Assay Protocols (Protocolos de Ensaio) "CRE ELITE_PC" e "CRE ELITE_NC".

Os resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação usado, são registados na base de dados (Controls). Podem ser visualizados e aprovados por pessoal qualificado como o "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar **após 15 dias**.

Os resultados das execuções de amplificação de Positive Control e Negative Control são usados pelo software do instrumento para preparar os "Gráficos de controlo" e são usados para monitorizar os desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: Se o resultado do Positive Control ou Negative Control da amplificação não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Controls" e não é possível aprovar o mesmo. Neste caso, devem ser repetidas as reações de amplificação de Positive Control ou Negative Control.

Nota: Se o Positive Control ou Negative Control é executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado é inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

B. Validação dos resultados da amostra

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos genes de resistência (canais **KPC**, **NDM VIM IMP** e **OXA**) e pela sonda do Controlo Interno (canal **CI**) nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software ELITE InGenius com os parâmetros incluídos nos Assay Protocols (Protocolos de Ensaio) CRE ELITE_RcS_200_100.

Os resultados são mostrados nos relatórios gerados pelo instrumento ("Exibição dos resultados"). A execução da amostra pode ser aprovada quando forem cumpridas as duas condições reportadas na tabela abaixo.

1) Positive Control	Estado
CRE Positive Control	APROVADO
2) Negative Control	Estado
CRE Negative Control	APROVADO

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema como estabelecido pelo algoritmo ELITE InGenius Software e os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de Ensaio).

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado. Para cada amostra válida, o sistema comunica uma combinação de mensagens a especificar se os genes CRE foram detetados ou não detetados.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
ADN KPC detetado.	Foi detetado ADN do gene KPC na amostra.
NDM, VIM or IMP DNA Detected (ADN de NDM, VIM ou IMP DNA detetado).	Foi detetado ADN do gene NDM, VIM ou IMP na amostra.
ADN OXA detetado.	Foi detetado ADN do gene OXA na amostra.
ADN KPC não detetado ou inferior ao LoD.	Não foi detetado ADN do gene KPC na amostra. A amostra é negativa válida para este gene ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
Não foi detetado ADN de NDM, VIM e IMP ou este é inferior ao LdD.	Não foi detetado ADN do gene NDM, VIM e IMP na amostra. A amostra é negativa válida para estes genes ou as respetivas concentrações estão abaixo do Limite de deteção do ensaio.
ADN OXA não detetado ou inferior ao LoD.	Não foi detetado ADN do gene OXA na amostra. A amostra é negativa válida para este gene ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
Invalid - Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra).	Resultado da amostra não válido devido a falha do Internal Control (Extração incorreta ou transferência do inibidor). O teste deve ser repetido.

As amostras não adequadas para interpretação dos resultados são reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo **ELITE InGenius Software**. Neste caso, o ADN do controlo interno não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode resultar em falsos negativos.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only" (Apenas PCR). No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo "Extract + PCR".

As amostras adequadas para análise mas em que não foi possível detetar ADN do gene de resistência são reportadas como: "KPC, NDM, VIM, IMP or OXA DNA Not Detected or below LoD". (Não foi detetado ADN de KPC, NDM, VIM, IMP ou OXA ou este é inferior ao LdD). Neste caso, não pode excluir-se que o ADN do gene de resistência está presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "Características de desempenho").

Nota: Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

Os resultados da execução da amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Result Display) por pessoal qualificado como "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Result Display" é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como "Sample Report" e "Track Report".

C. Elaboração do relatório do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser exportados como "Sample Report" e "Track Report".

O "Sample Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho ordenada pela amostra selecionada (SID).

O "Track Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho pelo Rastreo selecionado.

O "Sample Report" e o "Track Report" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Limite de deteção (LdD)

O Limite de Deteção (LdD) do CRE ELITE MGB® Kit usado em associação com amostras de esfregaços retais ressuspensos e o sistema ELITE InGenius® foi verificado pelo teste de 6 estirpes de CRE, uma de cada um dos seguintes tipos de genes: KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48 e OXA-181. Foi feito o crescimento da cultura dos organismos CRE, tendo sido quantificados por deposição e contagem da colónia. Foram preparados pelo menos 6 níveis de diluições de cada estirpe, a começar com a concentração acima do LdD esperado, na matriz retal negativa. Foram processadas réplicas de cada nível de diluição no sistema ELITE InGenius® no modo Extração + PCR. O LdD para cada uma das estirpes de CRE foi estimada por análise de regressão logística binária dos dados com a concentração a corresponder a 95% de probabilidade de um resultado positivo. O LdD estimado foi confirmado através da análise de 20 réplicas de diluições de cada organismo à concentração correspondente.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Limite de deteção para amostras de esfregaços retais ressuspensos e o ELITE InGenius® (CFU / mL)				
Alvo	Isolado bacteriano	LdD (CFU / mL)	Intervalo de confiança de 95% (CFU / mL)	
			limite inferior	limite superior
KPC	<i>C. freundii</i> , UCLA 14-13-A2	99	69	217
NDM	<i>E. coli</i> , ATCC BAA-2469	144	110	228
VIM	<i>K. pneumoniae</i> , NCTC 13439	399	338	579
IMP	<i>E. coli</i> , NCTC 13476	273	234	351
OXA-48	<i>E. coli</i> , ATCC BAA-2523	300	241	456
OXA-181	<i>K. pneumoniae</i> , JMI 18	179	139	287

Eficiência da deteção (inclusividade)

A eficiência de deteção em diferentes variantes de genes de resistência à carbapenema foi avaliada por comparação *in silico* das sequências de sonda e primer do ensaio com as sequências disponíveis na base de dados de nucleótidos NCBI.

A análise demonstrou a conservação da sequência e a ausência de mutações significativas para as variantes indicadas na tabela a seguir.

CRE ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do
ADN

REF RTS200ING

Alvo	Variantes cuja detecção é esperada pelo produto CRE ELITE MGB® Kit
KPC	KPC-01, KPC-02, KPC-03, KPC-04, KPC-05, KPC-06, KPC-07, KPC-08, KPC-09, KPC-10, KPC-11, KPC-12, KPC-13, KPC-14, KPC-15, KPC-16, KPC-17, KPC-18, KPC-19, KPC-21, KPC-22, KPC-25, KPC-33, KPC-47e, KPC-56a, KPC-63d, KPC-272, KPC-484, KPC-629, KPC-727, KPC-860.
NDM	NDM-01, NDM-02, NDM-03, NDM-04, NDM-05, NDM-06, NDM-07, NDM-08, NDM-09, NDM-10, NDM-12, NDM-13, NDM-15, NDM-16, NDM-17, NDM-32, NDM-40, NDM-221, NDM-255, NDM-264, NDM-265
VIM	VIM-01, VIM-02, VIM-03, VIM-04, VIM-05, VIM-06, VIM-07, VIM-08, VIM-09, VIM-10, VIM-11, VIM-12, VIM-13, VIM-14, VIM-15, VIM-16, VIM-17, VIM-18, VIM-19, VIM-20, VIM-23, VIM-24, VIM-25, VIM-26, VIM-27, VIM-28, VIM-31, VIM-33, VIM-34, VIM-35, VIM-36, VIM-37, VIM-38, VIM-39, VIM-40, VIM-42, VIM-43, VIM-44, VIM-45, VIM-46, VIM-47, VIM-49, VIM-50, VIM-51
IMP	IMP-01, IMP-02, IMP-03, IMP-04, IMP-05, IMP-06, IMP-07, IMP-08, IMP-09, IMP-10, IMP-11, IMP-13, IMP-14, IMP-15, IMP-16, IMP-18, IMP-19, IMP-20, IMP-21, IMP-22, IMP-24, IMP-25, IMP-26, IMP-28, IMP-29, IMP-32, IMP-33, IMP-34, IMP-37, IMP-38, IMP-40, IMP-41, IMP-42, IMP-45, IMP-48, IMP-49, IMP-51, IMP-54, IMP-56, IMP-58
OXA	OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-370, OXA-405, OXA-416, OXA-439, OXA-484

A eficiência de detecção de diferentes variantes de genes de resistência à carbapenema também foi também verificada para um conjunto de 18 isolados de CRE bem caracterizados. Amostras artificiais foram preparadas através do reforço de isolados de teste numa matriz retal negativa a concentrações próximas do LdD. Foram testados dois a três isolados de cada tipo de gene KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Eficiência de detecção (inclusividade) do produto CRE ELITE MGB® Kit				
Organismo	Isolado	Marcador CRE	Concentração (CFU/mL)	Resultado
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0034	IMP	798	Inclusivo
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0103	IMP-1	762	Inclusivo
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0092	IMP-14	762	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC	297	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-1898	KPC-2	297	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-1904	KPC-3	347	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-2146	NDM1	294	Inclusivo
<i>E. coli</i>	CDC-ARIB-0150	NDM-5	294	Inclusivo
<i>E. coli</i>	CDC-ARIB-0137	NDM-6	294	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	ST-14 (também denominado R20)	OXA-181	537	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0140	OXA-181	537	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0066	OXA-232	900	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0075	OXA-232	900	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	BAA-2524	OXA-48	900	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0160	OXA-48	900	Inclusivo
<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 13440	VIM-1	843	Inclusivo
<i>P. aeruginosa</i>	NCTC 13437	VIM-10	843	Inclusivo
<i>P. aeruginosa</i>	CDC-ARIB-0054	VIM-4	843	Inclusivo

Todos os isolados de CRE testados foram detetados e considerados inclusivos pelo CRE ELITE MGB® Kit a concentrações de cerca de 300 - 900 CFU / mL.

CRE ELITE MGB® Kit
reagente para amplificação em tempo real do
ADN

REF RTS200ING

A eficiência de detecção de diferentes variantes de genes de resistência à carbapenema também foi verificada para um conjunto de 114 isolados de cultura de CRE caracterizados. Cada amostra foi diluída no eNAT™ kit e depois testada com CRE ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius® no modo Extração + PCR. Os isolados de cultura foram representativos dos diferentes géneros de Enterobacteriaceae (por ex., *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *C. koseri*).

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo	inválido
Isolados de cultura positivos para KPC	22	22	0	0
Isolados de cultura positivos para OXA-48	35	35	0	0
Isolados de cultura positivos para NDM	23	23	0	0
Isolados de cultura positivos para IMP	11	11	0	0
Isolados de cultura positivos para VIM	17	17	0	0
Isolados de cultura positivos para OXA-48 e NDM	6	6	0	0

Todos os isolados de CRE testados foram detetados e considerados inclusivos pelo CRE ELITE MGB® Kit.

Marcadores potencialmente interferentes

A reatividade cruzada potencial do ensaio com outros alvos não pretendidos foi primeiro avaliada através da análise *in silico* de sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos NCBI.

Um alinhamento das sequências de primer e sonda com as sequências disponíveis na base de dados, incluindo os organismos que se poderia razoavelmente esperar que estivessem presentes nas amostras clínicas, tais como flora comum de organismos oportunistas retais, vírus, células, parasitas intestinais e organismos produtores de beta-lactamase estreitamente relacionados demonstrou a ausência de homologies significativas e não indicou uma interferência potencial.

A ausência de reatividade cruzada com outros organismos estreitamente relacionados (resistência relacionada) também foi verificada através do teste das amostras de isolados indicadas na tabela abaixo a concentração de 10⁶ CFU / mL em triplicado.

Marcadores potencialmente interferentes do produto CRE ELITE MGB® Kit				
Organismo	Isolado	Marcador de resistência a antibiótico	Concentração (CFU/mL)	Resultado
<i>K. pneumoniae</i>	700603	SHV	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	BAA-202	SHV	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	BAA-201	TEM	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>S. marcescens</i>	14-13-A11	SME	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>S. marcescens</i>	14-13-A12	SME	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13301	OXA-23	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13302	OXA-25	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13303	OXA-26	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13304	OXA-27	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13305	OXA-58	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>A. baumannii</i>	13420	Clone SE de OXA-51-like	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-185	CTX-M-1	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	DICON-003	CTX-M-1	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	DICON-178	CTX-M-9	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>K. pneumoniae</i>	DICON-005	CTX-M-9	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. cloacae</i>	NCTC 13464	CTX-M-9	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>E. coli</i>	13353	CTX-M-15	10 ⁶	Sem reatividade cruzada
<i>K. pneumoniae</i>	CDC-ARIB-0044	CTX-M-15	10 ⁶	Sem reatividade cruzada

Todos à exceção dos isolados de DICON185 de *K. pneumoniae* foram determinados como sendo negativos em 3 de 3 réplicas quando testados com o CRE ELITe MGB® Kit. O isolado de DICON185 de *K. pneumoniae* apresentou sinal positivo em uma de 3 réplicas. Quando retestado com 5 réplicas, o isolado apresentou 5 de 5 negativos e foi considerado como sem reação cruzada.

Substâncias interferentes

Substâncias potencialmente interferentes às mais altas concentrações clinicamente relevantes foram individualmente reforçadas nos isolados de CRE contendo matriz retal negativa ao nível de concentração de cerca de 3 vezes o LdD. As substâncias testadas foram: enemas (óleo de vaselina), lubrificante espermicida (Nonoxynol-9), medicamentos anti-diarreicos (subsalicilato de bismuto), laxantes (Senósido), antibiótico (Vancomicina), antiácidos (ácido algínico / hidróxido de alumínio / trissilicato de magnésio, carbonato de cálcio, cimetidina, omeprazol), componentes fecais (ácido palmítico, ácido esteárico, mucina, ADN genômico humano, leucócitos humanos, sangue total humano). Foram testados em triplicado um isolado de cada tipo de gene KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48 e OXA-181 com o CRE ELITe MGB® Kit e o sistema ELITe InGenius.

Verificou-se que nenhuma das substâncias testada interferiu com o CRE ELITe MGB® Kit.

A possível interferência durante a reação de amplificação de 2-propanol, usado no processo de extração, foi avaliada testando ADN extraído da matriz retal negativa contendo isolados de CRE a um nível de concentração de cerca de 400 CFU/mL. Foram testados em triplicado um isolado de cada tipo de gene KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48 e OXA-181 com o CRE ELITe MGB® Kit e o sistema ELITe InGenius.

O teste demonstrou que até à concentração de 2 propanol a 10%, o produto CRE ELITe MGB® Kit não apresentou nenhum resultado falso negativo.

Repetibilidade

A Repetibilidade, sob a forma de imprecisão intra-execução, do CRE ELITe MGB® Kit em associação com o sistema ELITe InGenius foi testada realizando 3 execuções/dia durante 5 dias com dois painéis de 4 membros em 3 réplicas/execução. O primeiro painel incluiu três amostras positivas (estirpes CRE de KPC + NDM + OXA, VIM e IMP a baixa concentração) e uma amostra negativa. Foram testados analogamente um segundo painel dos mesmos organismos a concentração moderada e uma amostra negativa.

Os resultados sob a forma de valores de Ct para cada gene-alvo de CRE (e controlo interno) e cada concentração foram analisados individualmente usando o procedimento ANOVA.

Determinou-se que a imprecisão intra-execução é o principal componente dentro da imprecisão laboratorial. No entanto, a variabilidade do CRE ELITe MGB® Kit para cada gene-alvo de CRE não ultrapassou um Coeficiente de Variabilidade percentual (%CV) de 2,0%.

É apresentado a seguir um resumo dos resultados.

Repetibilidade do CRE ELITe MGB® Kit				
Alvo	Tipo de amostra	Ct média	SD	%CV
KPC	Positivo baixo	34,82	0,48	1,4%
	Positivo moderado	33,84	0,49	1,4%
NDM	Positivo baixo	36,87	0,51	1,4%
	Positivo moderado	35,21	0,24	0,7%
OXA	Positivo baixo	34,80	0,32	0,9%
	Positivo moderado	33,17	0,32	1,0%
VIM	Positivo baixo	35,26	0,19	0,5%
	Positivo moderado	33,47	0,20	0,6%
IMP	Positivo baixo	35,72	0,73	2,0%
	Positivo moderado	33,90	0,43	1,3%
CI	n.a.	29,56	0,43	1,5%
	n.a.	29,81	0,61	2,0%

Reprodutibilidade

A Reprodutibilidade, enquanto variabilidade “entre lotes” e “entre instrumentos” do CRE ELITe MGB® Kit em associação com o sistema ELITe InGenius foi testada por 2 operadores realizando 2 execuções/dia durante 8 dias em 3 instrumentos com 3 lotes de produto e com dois painéis de 3 membros em 2 réplicas/execução. O primeiro painel incluiu três amostras positivas (estirpes CRE de KPC + NDM + OXA, VIM e IMP a baixa concentração). Foi testado analogamente um segundo painel dos mesmos organismos a concentração moderada.

Foi realizado um segundo estudo por 2 operadores de 3 execuções/dia durante 1 dia em 3 instrumentos com 3 lotes de produto e com uma amostra negativa em 4 réplicas/execução.

Os resultados sob a forma de valores de Ct para cada gene-alvo de CRE (e controlo interno) e cada concentração foram analisados individualmente usando o procedimento ANOVA.

Determinou-se que os efeitos do instrumento e do lote de produto foram consistentemente significativos do ponto de vista estatístico. No entanto, a variabilidade do CRE ELITe MGB® Kit para cada gene-alvo de CRE não ultrapassou um %CV de 2,3%.

É apresentado a seguir um resumo dos resultados.

Reprodutibilidade do CRE ELITe MGB® Kit						
Alvo	Tipo de amostra	Ct média	Entre instrumentos		Entre lotes	
			SD	%CV	SD	%CV
KPC	Positivo baixo	35,00	0,289	0,83%	0,214	0,61%
	Positivo moderado	34,53	0,428	1,24%	0,312	0,90%
NDM	Positivo baixo	36,44	0,223	0,61%	0,000	0,00%
	Positivo moderado	35,32	0,317	0,90%	0,000	0,00%
OXA	Positivo baixo	33,65	0,140	0,42%	0,089	0,26%
	Positivo moderado	33,16	0,169	0,51%	0,207	0,62%
VIM	Positivo baixo	36,02	0,444	1,23%	0,489	1,36%
	Positivo moderado	34,50	0,289	0,84%	0,412	1,19%
IMP	Positivo baixo	37,18	0,291	0,78%	0,549	1,48%
	Positivo moderado	35,21	0,575	1,63%	0,783	2,22%
CI	n.a.	29,17	0,397	1,36%	0,911	3,12%

Ausência de contaminação cruzada

A ausência de contaminação cruzada de amostras positivas a negativas ou a transferência entre execuções foi verificada pela realização de 3 execuções integradas (extração de ADN do tubo primário seguida de PCR) com 6 amostras positivas para KPC altas a 10⁶ CFU / mL em meio eNAT alternadas com 6 amostras negativas de meio eNAT.

Determinou-se não ter havido contaminação cruzada entre calhas ou a transferência entre execuções após o teste de 18 amostras negativas e 18 amostras negativas numa configuração em xadrez com o sistema ELITe InGenius.

Falha de todo o sistema

A taxa de falha geral do sistema, que origina resultados falsos negativos, foi verificada analisando 50 amostras reforçadas com IMP preparadas a partir de isolados na matriz retal negativa e foi equivalente a 0%.

As 50 amostras de matriz retal negativa foram reforçadas com um isolado de IMP a uma concentração final de cerca de 400 CFU/mL. Cada amostra do painel foi testada através da realização de todo o procedimento de análise a começar pelo tubo primário com o sistema ELITe InGenius.

Todas as amostras testadas apresentaram um resultado positivo com o CRE ELITe MGB® Kit.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, bem como a confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de algumas amostras de esfregaço retal positivas para CRE e de algumas amostras de esfregaço retal reforçadas com isolados de CRE, dada a dificuldade de encontrar um número significativo de amostras clínicas positivas para cada um dos genes-alvo de CRE.

As 30 amostras de esfregaço retal positivas foram identificadas por método de cultura (meio Carba Smart, bioMérieux) e caracterizadas por um ensaio MALDI-TOF artesanal validado e um ensaio de PCR em tempo real.

As outras 120 amostras de esfregaço retal foram identificadas como negativas pelo método de cultura e depois reforçadas com 10 estirpes de CRE, duas de cada um dos seguintes tipos de genes: KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48-like. Para cada estirpe, foram analisadas 12 amostras.

As amostras foram colhidas em FecalSWAB™, diluídas no eNAT™ kit e depois testadas com CRE ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo Extração + PCR.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo	inválido
Esfregaço retal positivo para KPC	25	25	0	0
Esfregaço retal positivo para VIM	4	4	0	0
Esfregaço retal positivo para OXA-48	1	1	0	0
Esfregaço retal reforçado com KPC (isolado 207-1 KPC-3)	12	12	0	0
Esfregaço retal reforçado com KPC (isolado B1 KPC-2)	12	11	1	0
Esfregaço retal reforçado com NDM (isolado NDM-1)	12	12	0	0
Esfregaço retal reforçado com NDM (isolado NDM-5)	12	12	0	0
Esfregaço retal reforçado com VIM (isolado VIM-1)	12	12	0	0
Esfregaço retal reforçado com VIM (isolado VIM-4)	12	12	0	0
Esfregaço retal reforçado com IMP (isolado <i>K. pneumoniae</i> AR-Bank 0034)	12	12	0	0
Esfregaço retal reforçado com IMP (isolado <i>E. Coli</i> NCTC 13476)	12	12	0	0
Esfregaço retal reforçado com OXA-48-like (isolado OXA-48)	12	12	0	0
Esfregaço retal reforçado com OXA-48 (isolado OXA-232)	12	12	0	0

Todas à exceção de duas amostras testadas apresentaram um resultado positivo com o CRE ELITE MGB® Kit. As duas amostras (CAR.50 e CAR.84) apresentaram um resultado inválido e demonstraram turvação elevada. A repetição do teste de amostras diluídas apresentou um resultado negativo para CAR.50 (reforçado com isolado B1 KPC-2) e um resultado positivo para CAR.84 (reforçado com isolado VIM-4). Neste teste, a sensibilidade foi igual a 99,3%.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, bem como a confirmação de amostras clínicas positivas, também foi avaliada através da análise de algumas amostras de hemocultura positivas para CRE e de algumas amostras de hemocultura reforçadas com isolados de CRE, dada a dificuldade de encontrar um número significativo de amostras clínicas positivas para cada um dos genes-alvo de CRE.

As 29 amostras de cultura foram identificadas por microscópico e método de cultura e caracterizadas pelo ensaio MALDI-TOF.

As outras 20 amostras de hemocultura foram identificadas como negativas pelo método de cultura e depois reforçadas com 4 estirpes de CRE dos seguintes tipos de genes: OXA-48, NDM, VIM e IMP. Para cada estirpe, foram analisadas 5 amostras.

As amostras foram diluídas em água ultrapurificada e em seguida foram testadas com o CRE ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo Extração + PCR.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo	inválido
Hemocultura positiva para KPC	16	16	0	0
Hemocultura positiva para OXA-48	5	5	0	0
Hemocultura positiva para NDM	4	4	0	0
Hemocultura positiva para IMP	2	2	0	0
Hemocultura positiva para VIM	2	2	0	0
Hemocultura reforçada com OXA-48	5	5	0	0
Hemocultura reforçada com NDM	5	5	0	0
Hemocultura reforçada com VIM	5	5	0	0
Hemocultura reforçada com IMP	5	5	0	0

Todas as amostras apresentaram um resultado positivo com o CRE ELITE MGB® Kit. Neste teste, a sensibilidade foi igual a 100%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de algumas amostras de esfregaços retais e hemoculturas negativas para CRE.

52 amostras de esfregaços retais negativas foram identificadas pelo método de cultura (meio Carba Smart, bioMérieux).

As 45 hemoculturas foram negativas para crescimento após 36 horas.

As amostras de esfregaços retais foram colhidas em FecalSWAB™, diluídas no eNAT™ kit e depois testadas com CRE ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo Extração + PCR.

As amostras de hemocultura foram diluídas em água ultrapurificada e em seguida foram testadas com o CRE ELITE MGB® Kit e o sistema ELITE InGenius no modo Extração + PCR.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo	inválido
Esfregaços retais negativos para CRE	52	0	52	0
Hemoculturas negativas para MTB	45	2	43	0

Na primeira análise, 51 amostras de esfregaços retais foram negativas com o CRE ELITE MGB® Kit. Uma amostra foi considerada inválida (CAR.31) e apresentou turvação elevada. Esta amostra diluída e novamente testada apresentou resultado negativo. Neste teste, a especificidade do ensaio foi igual a 100%.

Todas as amostras de hemocultura testadas foram válidas com o CRE ELITE MGB® Kit. Quarenta e três (43) de 45 amostras foram confirmadas como negativas, duas amostras apresentaram resultado positivo com um Ct próximo do limite de detecção do método. Neste teste, a especificidade foi igual a 96%.

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e o instrumento estão registados no Ficheiro técnico do produto "CRE ELITE MGB® Kit", FTP RTS200ING.

REFERÊNCIAS

L. S. Tzouvelekis et al. (2012) *Clin. Microbiol. Rev.* 25(4): 682 - 707.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: esfregaços retais e hemoculturas.

Não use amostras com turvação elevada com este produto: a matriz fecal inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e pode originar resultados inválidos.

Não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com ADN extraído das seguintes amostras clínicas: cultura de sangue, sobrenadante fecal.

Os resultados obtidos com este produto dependem de uma identificação, uma recolha, um armazenamento de transporte e um processamento adequados das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com os produtos para extração de ácido nucleico.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras positivas, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar contaminações cruzadas. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário e áreas de trabalho que sejam adequados para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário especial e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN alvo não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

No caso de co-infecção, a sensibilidade de um alvo pode ser influenciada pela amplificação de um segundo alvo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada, começando pela extração, o que pode originar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos na região do ADN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção do ADN alvo.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e outros testes laboratoriais efetuados ao doente.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos obtidos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Nalguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Reação de Positive Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Positive Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Positive Control.
Degradação do Positive Control.	Utilize uma nova alíquota de Positive Control.
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e do Negative Control. Verifique os volumes da PCR Mix e do Negative Control.
Contaminação do Negative Control	Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Contaminação da área de extração, de Racks ou do "Inventory Block" (Gestor do reagente) .	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da PCR Mix e da amostra. Verifique os volumes da PCR Mix e da amostra.
Degradação da PCR Mix.	Use uma nova alíquota de PCR Mix e de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias que interferem na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" (Apenas PCR). Repita a extração com uma diluição de 1:2 da amostra clínica em meio eNAT™ fresco e numa sessão "Extract + PCR" (Extrair+ PCR). + PCR).
Degradação da PCR Mix.	Utilize uma nova alíquota da PCR Mix.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Erro 30103	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - seleccione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado. Se for necessário um valor de Ct: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" (Apenas PCR) ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra numa sessão "Extract + PCR" (Extrair+PCR).

Elevada taxa anômala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores de Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação amostra-para-amostra durante as etapas pré-analíticas	Evitar qualquer contacto entre a micropipeta e a parede do tubo. Limpar a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo após usar a pipeta em cada amostra. Não use pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. Introduzir as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI do ELITE InGenius. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software
Contaminação pelo ambiente laboratorial	Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Utilize um novo tubo da PCR Mix e/ou CPE.

SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código de lote.



Prazo de validade (último dia do mês).



Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos diagnóstico *in vitro*.



Contém suficiente para "N" testes.



Atenção, consulte as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Os reagentes de deteção ELITE MGB® são abrangidos por um ou mais números de patente dos EUA 6.127.121, 6.485.906, 6.660.845, 6.699.975, 6.727.356, 6.790.945, 6.949.367, 6.972.328, 7.045.610, 7.319.022, 7.368.549, 7.381.818, 7.662.942, 7.671.218, 7.715.989, 7.723.038, 7.759.126, 7.767.834, 7.897.736, 8.008.522, 8.067.177, 8.163.910, 8.389.745, 8.969.003, 8.980.855, 9.056.887, 9.085.800, 9.169.256 e números de patente EP 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 bem como os pedidos que estejam atualmente pendentes.

Esta licença limitada permite à pessoa, ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, apenas para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

ELITE MGB®, ELITE InGenius® e o logotipo ELITE MGB® estão registados pelo ELITechGroup como marcas comerciais na União Europeia.

TaqMan™ é uma marca comercial da Roche Molecular Systems, Inc

eNAT™ e FecalSWAB™ são marcas comerciais da COPAN Italia S.p.A.