

# Manual do utilizador

## Check-Direct CPE Screen for BD MAX™

Para a deteção e diferenciação dos genes de carbapenemases das *Enterobacteriaceae* em esfregaços retais

Versão 1.5

Data de publicação: 20.07.2017

REF

18-0051



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 frequentes (FAQ) e Resolução de problemas .....	6
Limitações .....	7
Legenda dos símbolos utilizados .....	8
Assistência técnica .....	8
Anexo 1: Criação do programa de teste do Check-Direct CPE Screen v.4.30B ou superior.....	9
Anexo 2: Características do desempenho.....	10

## Utilização pretendida

O Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ é um teste de diagnóstico qualitativo *in vitro* para a rápida deteção e diferenciação dos genes de carbapenemases das *Enterobacteriaceae* em esfregaços retais. O Check-Direct CPE Screen 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 Screen for BD MAX™ pode ser usado como meio auxiliar para identificar, prevenir e controlar as *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases que colonizam pacientes em instalações de cuidados de saúde. O Check-Direct CPE Screen 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 e OXA-48 como variantes). 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 Screen for BD MAX™ 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. Existem muitas variantes de genes para os KPC, VIM, OXA-48 e NDM e o Check-Direct CPE Screen foi concebido para detetar com fiabilidade a maioria dessas variantes. As variantes detetadas e de deteção prevista para cada gene de resistência são apresentadas no parágrafo de especificidade *in silico* no Anexo 2. Check-Direct CPE Screen 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 do CPE Screen (9-0121)	24 tubos selados (selo azul)
Controlo positivo de CPE (9-0061)	1 tubo (tampa roxa) 100 µl
CP Mastermix (Mistura principal de CP) (9-0122)	1 tubo (tampa verde) de 330 µl
Manual do utilizador (9-0124)	Folheto informativo – transferir do website

## Materiais necessários mas não fornecidos com o kit

Consumíveis	Equipamento
<ul style="list-style-type: none"> <li>BD MAX™ ExK DNA-1 Extraction Kit (ref.: 442818)</li> <li>BD MAX™ PCR Cartridges (ref: 437519)</li> <li>Luvas (sem pó) descartáveis de laboratório</li> <li>Pipetas e pontas (com filtro) descartáveis para volumes de 10 e 25 µl</li> <li>Água graduada para PCR (por ex., Milli-Q ou água bidestilada)</li> <li>Esfregaços e meio de transporte compatíveis com a colheita de amostras retais. Dispositivo recomendado de colheita de esfregaços: Copan ESwab, n.º de cat. 480CE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Instrumento de PCR em tempo real: Sistema BD MAX™, versão do software 4.30B ou superior</li> <li>Misturador Vortex</li> </ul>

## Armazenamento e estabilidade

O kit de Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ é enviado à temperatura ambiente, deve ser armazenado no escuro e entre 2 e 8 °C após a receção. Os reagentes são estáveis a 2-8 °C até à data de validade indicada. Não utilize componentes após o prazo de validade.

Os tubos de reagentes do Check-Direct CPE Screen for BD MAX™, PCR Mastermix 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 2-8 °C após a abertura inicial e re-selagem da bolsa.

## Advertências e precauções

- O ensaio Check-Direct CPE Screen 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 compromisso dos 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 Check-Direct CPE Screen 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 Check-Direct CPE Screen 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 (Segurança biológica em laboratórios de microbiologia e biomedicina).
- 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 esfregaços retais

**Nota:** o procedimento de colheita e armazenamento de amostras deve ser rigorosamente cumprido utilizando dispositivos adequados de colheita de amostras (consulte a secção *Materiais necessários mas não fornecidos com o kit*). Os esfregaços retais irão conter quantidades variáveis de matéria fecal, dependendo do procedimento de colheita de amostras. A Check-Points aconselha a validar a sua colheita de amostras e método de processamento com o Check-Direct CPE Screen antes de utilizar o sistema rotineiramente para o teste.

1. Proceda à colheita da amostra retal de acordo com as diretrizes locais e as recomendações do fabricante do esfregaço.
2. Transfira os esfregaços para os tubos que contêm o meio de transporte líquido.
3. Transfira as amostras dos esfregaços retais para análise para a sala de PCR ou armazene para utilização futura de acordo com a recomendação do fabricante do esfregaço e/ou regulamentos locais.
4. Misture brevemente cada tubo com a amostra retal e pipete 25 µL do meio de transporte para um Tubo de tampão de amostras de ADN SB-1 .
5. Feche o Tubos de tampão de amostras com uma tampa de septo e agite-o no Vortex durante 10 segundos a velocidade média.

### 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 Screen. O controlo positivo é fornecido com o kit.

- **Controlo positivo:**  
Pipete 10 µL de controlo positivo num Tubo de tampão de amostras. Agite no Vortex durante 10 segundos.
- **Controlo negativo:**  
Pipete 10 µL de água graduada para PCR para um 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 "C-D CPE Screen", conforme descrito no Anexo 1.

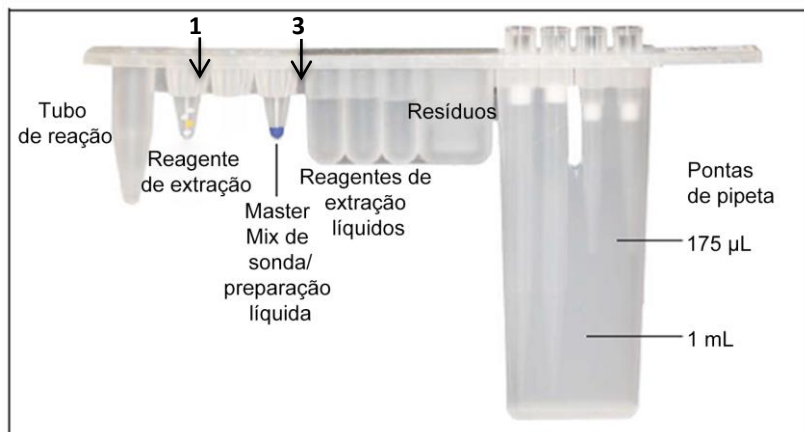
### 2. Configuração do Suporte do BD MAX™

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. Coloque as tiras de reagente unificado nas suas posições no suporte do BD MAX™. Irá ouvir um "clique" ao introduzir as tiras, mas não o faça ainda.

- 2.2.b. 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.c. Encaixe um tubo de reagente do CPE Screen (selo azul) na posição **3** da tira de ADN (consulte a Figura 1).
- 2.2.d. Perfure o selo azul do tubo de reagente do CPE Screen na posição **3**, *por exemplo*, com uma ponta de pipeta descartável. Em seguida, dispense cuidadosamente 12,5 µL da Mistura de reação de CP para o fundo do tubo, tendo cuidado para não criar bolhas de ar.
- 2.2.e. Introduza as tiras de reagente unificado nas suas posições do suporte até ouvir um "clique", quando terminar a preparação das tiras.



**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 "C-D CPE Screen"**. Consulte o Anexo 1 para criar o teste "C-D CPE Screen", 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 amostras 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 linha **Acesso** da Lista de trabalho. Verifique se todas as informações do paciente ou amostra correspondem aos seus Tubos de tampão de amostras 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™*.

**Inspeção 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 as diretrizes de interpretação descritas nos Quadros 2 e 3.

## 2. Interpretação

### 2.1 Validação da execução

Confirme que a execução da 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 do Check-Direct CPE Screen 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 de Check-Direct CPE Screen.

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	29 ± 3	28 ± 3	31 ± 3	28 ± 3
Amostra negativa	-1	-1	-1	-1	28 ± 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. Por favor, verifique sempre que a curva de amplificação de cada amostra está de acordo com os valores de  $C_T$  e interpretação dos resultados fornecida pelo software. As execuções não resolvidas devem ser testadas novamente.

**Quadro 3:** Diretrizes de interpretação de dados para esfregaços retais.

KPC, VIM, OXA, NDM Valores de $C_T$	SPC Valores de $C_T$	Interpretação
SIM	SIM	Amostra positiva
-1	28 ± 3	Amostra negativa
-1	< 25 ou > 32	Não resolvida
-1 ou SIM	-1	Não resolvida

#### NOTAS IMPORTANTES:

- SIM significa que um valor de  $C_T$  foi observado e apresentado na tabela de resultados.
- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de organismos viáveis na amostra testada.
- Os valores de  $C_T$  de esfregaços retais podem apresentar grandes variações devido a diferenças na matéria fecal e "carga bacteriana" das mesmas no meio de transporte.
- 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 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 reagente do CPE Screen ou a CP Mistura de reação podem estar fora da 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 reagente do CPE Screen ou a CP Mistura de reação podem 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 do CPE Screen que contêm as sondas fluorescentes e os iniciadores poderão estar degradados. Verifique a data de validade e certifique-se de que os tubos do CPE Screen 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 ensaio do Check-Direct CPE Screen 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 Screen for BD MAX™ 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 apenas a ser utilizado com esfregaços retais em meio de transporte como material de entrada.


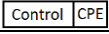








A qualidade do ADN de entrada é um fator importante para a obtenção de resultados fiáveis com o Check-Direct CPE Screen for BD MAX™. O ADN tem de ser extraído a partir de esfregaços retais utilizando os dispositivos e os procedimentos descritos neste manual. O ensaio foi testado extensivamente com ADN 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 Screen 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.

Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de organismos viáveis na amostra testada. O ADN da carbapenemase pode ter sido detetado a partir de organismos não viáveis.

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
	Mistura de reação de CP)
	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 Screen*.

### 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 Screen 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:** *C-D CPE Screen*.
  - Tipo de extração:** selecione *Exk DNA-1 (plasma/soro)*.
  - Formato da Mistura de reação:** selecione *Type 3: Liquid MM with Primers and Probes* (Tipo 3: MM líquido com iniciadores e sondas).
  - Parâmetros de extração da amostra:** selecione *Definidos pelo utilizador* e ajuste o *volume da amostra* para 600 µL (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
Lysis Heat Time (Tempo de aquecimento de lise)	10
Lysis Temperature (Temperatura de lise)	37
Sample Tip Height (Altura de ponta de amostra)	1600
<b>Sample Volume (Volume de amostra)</b>	<b>600</b>
Wash Volume (Volume de lavagem)	500
Neutralization Volume (Volume de neutralização)	----
DNase Heat Time (Tempo de aquecimento de DNase)	----

**Quadro B:** Parâmetros de Nome alternativo, Ganho de PCR e Limiar.

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

**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.

Step Name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Hora (s))	Temp. (°C)	Detect (Detetar)
Desnaturação	Hold (Espera)	1	600	98	NÃO
Amplificação e deteção	2 - temperatura	50	15	98	NÃO
			62	60	SIM

## Anexo 2: Características do desempenho

### Limite de detecção com esfregaços retais

O limite de detecção (LdD) analítico do Check-Direct CPE Screen for BD MAX™ foi determinado utilizando esfregaços retais inoculados com quantidades bem definidas de bactérias alvo. O meio de transporte E-swab Amies (Copan) foi "inoculado" com aproximadamente 10 mg/mL de fezes humanas, à semelhança de uma amostra de esfregaço retal típica. Procedeu-se ao crescimento, de um dia para o outro, de estirpes que contêm os genes de carbapenemase alvo e foram preparadas suspensões de células em água Milli-Q com uma densidade de 0,5 McFarland. Estas suspensões de células foram usadas para inocular os esfregaços retais artificiais para criar amostras com uma quantidade bem definida de matéria fecal e bactérias alvo.

Foi utilizada uma grande coleção de amostras criadas conforme descrito anteriormente para avaliar o limite de detecção (LdD) analítico, seguindo o protocolo descrito nas páginas 4 e 5 deste Manual do utilizador. Os resultados estão apresentados no Quadro a seguir. SBT refere-se ao Tubo de tampão de amostras do BD MAX™.

Alvo	UFC por SBT	UFC/PCR	Taxa de sucesso
KPC	116	13	100%
KPC	12	1	0%
VIM	104	13	100%
VIM	8	1	67%
OXA-48	176	22	100%
OXA-48	23	3	67%
NDM	119	14	100%
NDM	12	1	43%

### Especificidade *In silico*

A especificidade do teste de diagnóstico em tempo real do Check-Direct CPE Screen 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 homologias 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 do Check-Direct CPE Screen foi determinada ao testar a reatividade cruzada com amostras que contêm uma grande quantidade de organismos não-alvo. 103 estirpes carbapenemases-negativas foram utilizadas para testar a especificidade do teste em tempo real do Check-Direct CPE Screen. É apresentada uma descrição geral destas estirpes no Quadro a seguir. Todos os isolados apresentaram resultados negativos com o ensaio do Check-Direct CPE Screen 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>Campylobacter jejuni</i>	2
<i>Citrobacter freundii</i>	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	23
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	42
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Salmonella typhimurium</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1

## 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 carbapenemase 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 Screen
19	KPC	KPC
16	NDM	NDM
33	VIM	VIM
23	OXA-48	OXA-48
1	NDM + OXA-48	NDM + OXA-48
1	VIM + OXA-48	VIM + OXA-48

## Desempenho clínico

O desempenho clínico do Check-Direct CPE Screen para o ensaio BD MAX™ foi avaliado em três estudos prospectivos separados envolvendo quatro centros clínicos europeus. A prevalência de CPE (*Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases) na ausência de um surto é baixa e é difícil de obter amostras frescas contendo CPE. Portanto, as amostras prospectivas foram suplementadas com amostras produzidas (isolados bem caracterizados, inoculados numa matriz de esfregaço retal negativo) para compensar a baixa quantidade de amostras positivas. Amostras de esfregaços retais colhidas no âmbito dos cuidados de rotina a pacientes foram testadas com o Check-Direct CPE Screen para o ensaio BD MAX™ e em comparação com um método de cultura de referência (meios de cultura seletivos ChromID Carba Smart ou ChromID ESBL). Foram confirmadas amostras clínicas de cultura-positiva prospectivas através de PCR específicas do gene.

Foi testado um total de 1203 amostras de esfregaço retais, das quais 30 (2,5%) amostras produziram resultados inconclusivos e, como tal, foram excluídas dos resultados apresentados a seguir. 41 das 1173 amostras incluídas nos resultados eram amostras produzidas contendo estirpes bacterianas positivas de KPC, VIM, OXA-48 ou NDM bem caracterizadas. O desempenho global e os desempenhos por alvo do Check-Direct CPE Screen para o ensaio BD MAX™ estão apresentados a seguir.

Em relação ao método de referência, o ensaio do Check-Direct CPE Screen demonstrou sensibilidade geral e especificidade de 98,5% e 96,8%, respetivamente, sobre o conjunto combinado de amostras produzidas e amostras prospectivas (consulte o Quadro a seguir).

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

CPE		Cultura		Total
		+	-	
PCR do CPE Screen do BD MAX	+	67	35	102
	-	1	1070	1071
Total		68	1105	1173

Sensibilidade: 98,5% (67/68)

Especificidade: 96,8% (1070/1105)

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

KPC		Cultura		Total
		+	-	
PCR do CPE Screen do BD MAX	+	28	8	36
	-	1	1136	1137
Total		29	1144	1173

Sensibilidade: 96,6% (28/29)

Especificidade: 99,3% (1136/1144)

### Desempenho do Check-Direct CPE Screen versus o método de referência para OXA48

OXA-48		Cultura		Total
		+	-	
PCR do CPE Screen do BD MAX	+	13	8	21
	-	0	1152	1152
Total		13	1160	1173

Sensibilidade: 100% (13/13)

Especificidade: 99,3% (1152/1160)

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

VIM		Cultura		Total
		+	-	
PCR do CPE Screen do BD MAX	+	15	19	34
	-	0	1139	1139
Total		15	1158	1173

Sensibilidade: 100% (15/15)

Especificidade: 98,4% (1139/1158)

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

NDM		Cultura		Total
		+	-	
PCR do CPE Screen do BD MAX	+	11	0	11
	-	0	1162	1162
Total		11	1162	1173

Sensibilidade: 100% (11/11)

Especificidade: 100% (1162/1162)