

Manual de usuario

Check-Direct CPE for BD MAX™

Para la detección e identificación de genes de carbapenemasas en colonias puras de *Enterobacterias*

Versión 2.0

Fecha de publicación: 22.01.2019

REF 18-0082

 24

CE **IVD**

Contenido

Uso previsto	2
Introducción y principio del método	2
Contenido del kit (para 24 reacciones)	2
Materiales necesarios no suministrados con el kit	2
Almacenamiento y estabilidad	2
Advertencias y precauciones	3
Instrucciones de uso	4
Procedimientos de preparación de muestras	4
Uso de sistema BD MAX™	4
Interpretación de los resultados	5
Preguntas más frecuentes (FAQ) y solución de problemas	6
Limitaciones	7
Leyenda de los símbolos utilizados	7
Asistencia técnica	7
Anexo1: Programación de la prueba Check-Direct CPE v.4.70 o superior	8
Anexo2: Características de rendimiento	9

Uso previsto

Check-Direct CPE for BD MAX™ es una prueba cualitativa de diagnóstico *in vitro* para la detección rápida de genes de carbapenemasas en *Enterobacterias*. La prueba está diseñada para ser utilizada con cultivos de bacterias obtenidos a partir de muestras clínicas. Check-Direct CPE detecta la presencia de los genes de carbapenemasas KPC, NDM, VIM y OXA-48, principales causas actuales de la producción de carbapenemasas en *Enterobacterias*. La prueba utiliza el sistema BD MAX™ para la extracción del ADN y posterior PCR en tiempo real utilizando los reactivos proporcionados en combinación con reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. Check-Direct CPE for BD MAX™ puede utilizarse como ayuda para identificar, prevenir y controlar *Enterobacterias* productoras de carbapenemasas que colonizan pacientes en centros asistenciales. Check-Direct CPE for BD MAX™ no está indicado en el diagnóstico de infecciones con *Enterobacterias* productoras de carbapenemasas ni en la orientación o seguimiento del tratamiento de estas infecciones. Para la tipificación epidemiológica, pruebas de sensibilidad y para la confirmación adicional de la identificación es necesario realizar cultivos en paralelo para recuperar microorganismos.

Introducción y principio del método

La aparición y difusión a nivel mundial de la resistencia a carbapenems entre *Enterobacterias* representa una grave amenaza para la salud pública. Estos organismos están asociados con altas tasas de mortalidad y tienen el potencial de extenderse ampliamente. La causa más común de resistencia a carbapenems en *Enterobacterias* es la expresión de carbapenemasas, es decir, *Enterobacterias* productoras de carbapenemasas o CPE, por sus siglas en inglés. Las CPE tienen una resistencia elevada o completa a carbapenems y a la mayoría de otros antibióticos β -lactámicos. En la actualidad, la gran mayoría de CPE están asociadas con la presencia de una de las siguientes carbapenemasas codificadas por plásmidos: KPC (carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae*), VIM (metallobetá-lactamasas codificadas por el integrón Verona), NDM (metallobetá-lactamasas Nueva Delhi) o OXA-48 (Oxacilinasas-48 y otras variantes OXA-48). Por otra parte, las CPE tienen a menudo otros determinantes de resistencia a antibióticos no- β -lactámicos, confiriendo multi-resistencia o pan-resistencia a estos aislados.

Check-Direct CPE es una prueba multiplex de PCR en tiempo real para la detección de los genes de carbapenemasas KPC, OXA-48, NDM y VIM. La prueba está basada en el reconocimiento específico y la amplificación de secuencias diana mediante PCR, y la detección simultánea de los productos de amplificación acumulados mediante sondas fluorescentes de ADN. Existen muchas variantes de genes para KPC, VIM, OXA-48 y NDM; Check-Direct CPE ha sido diseñado para detectar de forma fiable todas las variantes. Check-Direct CPE for BD MAX™ utiliza cinco sondas fluorescentes diferentes y permite la detección y diferenciación de los cuatro genes de carbapenemasas más un control interno SPC, que controla la extracción del ADN y la amplificación por PCR.

Contenido del kit (para 24 reacciones)

Componentes (nº. mat.)	Descripción
Tubos de reactivos CPE (9-0062)	24 tubos sellados (film morado)
Control positivo CPE (9-0060)	1 tubo (tapón morado) 100 μ l
Manual de usuario (9-0079)	Folleto – descargar del sitio web

Materiales necesarios no suministrados con el kit

Suministros	Equipo
<ul style="list-style-type: none"> Kit de extracción BD MAX™ ExK™ DNA-1 (ref. 442818) Master mix BD MAX™ DNA MMK (ref. 442848) Tarjetas de PCR BD MAX™ (ref. 437519) Guantes de laboratorio (sin talco) desechables y bata de laboratorio Pipetas y puntas (con filtro) desechables para volúmenes de 10 a 1000 μl Solución salina (NaCl 150 mM o NaCl 0,9 %, p/v) Agua Milli-Q o agua bidestilada 	<ul style="list-style-type: none"> Instrumento de PCR en tiempo real: sistema BD MAX™, versión de software 4.70 y superior Densitómetro adecuado para suspensiones bacterianas Agitador vórtex

Almacenamiento y estabilidad

Los componentes de la prueba Check-Direct CPE for BD MAX™ son estables a una temperatura de entre 2 y 25°C hasta la fecha de caducidad indicada. No utilice componentes caducados.

Los tubos de reactivos Check-Direct CPE for BD MAX™ y el control positivo se suministran en una bolsa sellada. Para proteger los reactivos de la humedad, cierre de inmediato la bolsa después de abrirla. Los tubos de reactivos son estables durante un máximo de 14 días a una temperatura de entre 2 y 25°C después de la apertura inicial de la bolsa y su cerrado posterior.

Advertencias y precauciones

- La prueba Check-Direct CPE for BD MAX™ es para uso diagnóstico *in vitro*.
- Este producto sólo se puede utilizar en el sistema BD MAX™.
- No utilice el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota.
- No utilice los reactivos si en su recepción las bolsas protectoras están abiertas o rotas.
- Cierre las bolsas protectoras de los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso. Antes de cerrar las bolsas quite el exceso de aire.
- Compruebe que las tiras de reactivo tengan la cantidad de líquido suficiente (asegúrese de que el líquido se encuentre en el fondo de los tubos).
- Compruebe las tiras de reactivo para asegurarse de que no falta ninguna punta de pipeta.
- No retire el desecante de las bolsas de reactivos.
- No utilice los reactivos si el desecante no está o está roto dentro de las bolsas de reactivos.
- No utilice los reactivos si el film está roto o dañado.
- No mezcle reactivos de diferentes bolsas y/o kits y/o lotes.
- No intercambie ni reutilice los tapones, ya que se puede producir contaminación y se pueden comprometer los resultados de la prueba.
- Actúe con cautela al utilizar soluciones químicas ya que se puede alterar la legibilidad del código de barras del tubo de extracción y del Master Mix.
- No utilice reactivos ni materiales caducados.
- Es fundamental una buena técnica de laboratorio para realizar correctamente esta prueba. Debido a la alta sensibilidad analítica de esta prueba, se debe tener extremo cuidado para conservar la pureza de todos los materiales y reactivos.
- Para evitar la contaminación por amplicones, no rompa la tarjeta de PCR BD MAX™ después de su uso. Los films de las tarjetas de PCR BD MAX™ están diseñados para impedir la contaminación.
- Se pueden producir resultados no válidos si no se respetan los intervalos de tiempo recomendados para la prueba Check-Direct CPE for BD MAX™. Las pruebas no realizadas dentro de los intervalos de tiempo especificados se deberán repetir con una nueva muestra.
- Pueden realizarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de los reglamentos locales, estatales, provinciales y/o federales o de los organismos acreditados.
- Cuando selleven a cabo en el laboratorio cultivos u otras pruebas de PCR, se debe tener cuidado para asegurar que los componentes de la prueba Check-Direct CPE for BD MAX™, los reactivos adicionales necesarios para la prueba y el sistema BD MAX™ no se contaminen. Evite en todo momento la contaminación microbiana y por desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Deb cambiarse de guantes antes de manipular reactivos y tarjetas.
- Siempre manipule las muestras como si fueran infecciosas y siguiendo procedimientos de seguridad del laboratorio, como los descritos en el Documento CLSI M2911o en Biosafety in Microbial and Biomedical Laboratories.
- Utilice ropa protectora y guantes desechables cuando manipule los reactivos.
- Lávese completamente las manos después de realizar la prueba.
- No fume, beba, mastique ni coma en zonas en las que se manipulan muestras o los reactivos del kit.
- Elimine los reactivos no utilizados en conformidad con los reglamentos locales, estatales, provinciales y/o federales.
- Consulte el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.

Por favor, lea el protocolo completo antes de iniciar la prueba

Instrucciones de uso

Procedimientos de preparación de muestras

Preparación de la prueba usando bacterias procedentes del cultivo

1. Inocule las placas de agar nutritivo con las muestras clínicas o las cepas bacterianas a analizar e incúbelas durante toda la noche a una temperatura de 37^o C. Entre los medios de cultivo típicos se encuentran agar sangre, agar MacConkey o agar tripticasa de soya.
2. Prepare una suspensión celular bacteriana en solución salina con una turbidez de entre 0,5 – 1,0 ($\approx 1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml) en la escala de McFarland procedente de una o más colonias de cada placa utilizando un asa de siembra de 1 o 10 μ l.
3. Pipetee 10 μ l de la suspensión celular bacteriana ($\approx 1 - 2 \times 10^6$ CFU/ml) y 500 μ l de agua Milli-Q o agua bidestilada en un tubo de tampón de muestras de ADN SB-1. (suministrado con el kit de extracción de ADN BD MAX™ ExK DNA-1, consulte la sección *Materiales necesarios no suministrados con el kit*).
4. Tape el tubo de tampón de muestras con un tapón consepto y agite en el vórtex durante 10 segundos a velocidad baja.
5. Traslade los tubos de tampón de muestra con las suspensiones celulares bacterianas a la sala de PCR para su análisis.

Preparación de los controles

Para validar la prueba, realice un control positivo y un control negativo para cada serie de análisis por PCR con la prueba Check-Direct CPE. El control positivo se suministra con el kit.

- **Control positivo:**
Pipetee 10 μ l del control positivo y 500 μ l de agua Milli-Q o agua bidestilada en un tubo de tampón de muestras. Agite en vórtex durante 10 segundos.
- **Control negativo:**
Pipetee 500 μ l de agua Milli-Q o agua bidestilada en un tubo de tampón de muestras. Agite en vórtex durante 10 segundos.

Uso de del sistema BD MAX™

1. Configuración de la prueba multiplex de PCR en tiempo real

La Tabla 1 muestra la configuración de la prueba multiplex de PCR en tiempo real con las dianas detectadas en cada canal de detección del sistema BD MAX™.

Tabla 1: Configuración de la prueba multiplex qPCR

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

*SPC: Sample Processing Control, control de procesamiento de muestras

Cuando lleve a cabo la prueba por primera vez deberá programarla prueba por PCR "Check-Direct CPE 4" tal como se explica en el Anexo 1.

2. Configuración de la gradilla BD MAX™

- 2.1. Cargue las gradillas del sistema BD MAX™ con el número de tiras de reactivo de ADN necesarias para el número de muestras para analizar. Golpee suavemente cada tira para asegurarse de que los líquidos estén en el fondo de su recipiente.
- 2.2. Preparación de las tiras de reactivos individuales:
 - 2.2.a. Inserte un tubo de reactivo de extracción BD ExK-1 (film blanco) en la posición 1 de la tira de reactivos, véase Figura 1.
 - 2.2.b. Inserte un tubo de Master Mix DNAMMK (film verde/amarillo) en la posición 2 de la tira de ADN, véase la Figura 1.
 - 2.2.c. Inserte un tubo de reactivo CPE (film azul/púrpura) en la posición 3 de la tira de ADN, véase la Figura 1.

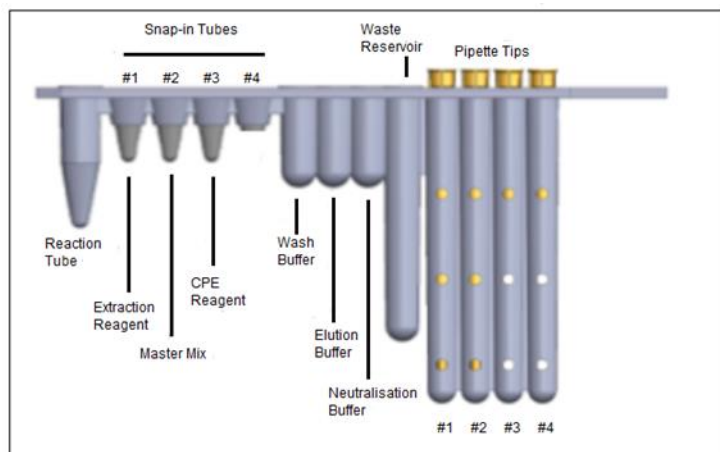


Figura 1: Configuración de la tira de reactivos individual de DNA

3. Configuración del instrumento BD MAX™

3.1 Abra la pestaña **Serie** del **software v4.70** o posterior del sistema BD MAX™ y rellene la **Lista de trabajo**.

3.2 Seleccione **Test "Check-Direct CPE 4"**. Consulte el Anexo 1 para crear la prueba "Check-Direct CPE 4" si todavía no está en el menú Test.

3.3 Introduzca el código de barras del **tubo de tampón de muestras** utilizando el escáner de códigos de barras (también puede introducir el código de barras manualmente). Comience con la posición 1 de la gradilla A. Coloque cada uno de los tubos de tampón de muestra (con el tapón de septo) en su posición correspondiente de la gradilla BD MAX™.

3.4 Introduzca la información de identificación de la muestra o paciente en la en cuadro **Número de acceso**. Compruebe que la información de cada muestra o paciente corresponde a sus tubos de tampón de muestra en la gradilla.

3.5 Cargue las gradillas en el sistema BD MAX™. (La gradilla A está situada a la izquierda del instrumento y la gradilla B a la derecha).

3.6 Cargue las tarjetas de PCR BD MAX™.

3.7 Cierre la puerta del instrumento y seleccione **Iniciar**.

Interpretación de los resultados

Puntos importantes antes de empezar: Para obtener una descripción detallada sobre cómo analizar los datos, consulte el *Manual de usuario del sistema BD MAX™*.

Realizar una inspección visual de las curvas de amplificación de cada muestra analizada frente a los valores C_T obtenidos mediante el software.

1. Resultados informados

El software BD MAX™ informa los valores C_T y las curvas de amplificación de cada canal de detección para cada muestra analizada de la siguiente forma:

- Un valor C_T de **0** indica que el software no calculó ningún valor C_T con el umbral especificado (véase Anexo 1). Si la curva de amplificación muestra un valor de C_T "0", la curva debe analizarse manualmente.
- Un valor C_T de **-1** indica que no se ha obtenido un proceso de amplificación válido. Compruebe en los resultados gráficos que no haya ninguna curva de amplificación para la muestra con un valor C_T de -1
- Cualquier otro valor C_T debe ser interpretado en relación con la curva de amplificación y según los métodos de interpretación descritos en las Tablas 2 y 3.

2. Interpretación

2.1 Validación de la serie

Compruebe que la serie de PCR en tiempo real es válida antes de interpretar los datos de los resultados. Compruebe que no haya ningún informe de fallo del sistema BD MAX™. Si procede, compruebe las curvas de amplificación del control positivo y negativo. La Tabla 2 muestra los criterios para una serie válida de la prueba Check-Direct CPE en el sistema BD MAX™. Si los valores C_T de los controles no son los previstos, consulte Preguntas Frecuentes y Solución de Problemas "3".

Tabla 2: Criterios para una serie válida con la prueba Check-Direct CPE. (NR = no relevante)

Tipo de muestra*	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
Controles positivos	32 ±3	30 ± 3	29 ±3	31 ±3	N.R.
Muestra negativa	-1	-1	-1	-1	29 ±3

2.2 Interpretación de los resultados

Si la serie ha sido validada, intérprete los resultados como positivo, negativo o sin resolver según los valores C_T obtenidos para las muestras, siguiéndolas pautas resumidas en la Tabla 3. Las series sin resolver deben ser analizadas de nuevo.

Los valores C_T obtenidos con células bacterianas estarán generalmente dentro de una ventana C_T específica para cada diana debido a que se utilizó una cantidad bien definida de células como material de entrada para la prueba. Sin embargo, tenga en cuenta que los valores C_T pueden variar considerablemente entre las cepas individuales. La **Tabla 3** especifica el umbral superior de esta ventana de C_T, un valor C_T más elevado sugiere que la muestra está contaminada o que la cepa no es pura. Por lo tanto, este resultado se considerará como "sin resolver".

Tabla 3: Pautas para la interpretación de datos de las células bacterianas (N.R. = no relevante).

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

NOTAS IMPORTANTES:

- Si el sistema BD MAX™ produce un resultado Indeterminado o Incompleto (IND o INC) debido a un fallo del sistema, deberá ponerse en contacto con su representante local de BD.

Preguntas más Frecuentes (FAQ) y Solución de Problemas

Consulte la sección "Solución de problemas" del manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información adicional.

1. Los resultados en tiempo real no muestran valores C_T o la interpretación indica que la muestra está sin resolver.

Posibles causas y solución del problema:

- La reacción PCR ha sido inhibida por sustancias exógenas o endógenas. Vuelva a analizar la muestra. Cuando continúa inhibida, una cantidad menor de la muestra añadida puede mejorar el resultado.
- La extracción de ADN falló debido a que no se pudo detectar el SPC.
- La Master Mix BD DNA MMK puede estar caducada.
- Se produjo un error en el manejo del líquido: compruebe las tiras de reactivo y las tarjetas de PCR para determinar dónde se produjo el problema de manejo del líquido (por ejemplo: burbuja de aire en el cartucho) y vuelva a analizar la muestra. Si el problema persiste, póngase en contacto con su representante local de BD.

2. Solución de problemas para resultados sin resolver.

Para resultados sin resolver: repita la prueba con la muestra original preparando un nuevo tubo de tampón de muestras. Como alternativa, analice una muestra recién recogida o utilice una cantidad menor de la muestra.

3. ¿Los resultados en tiempo real no muestran valores C_T para el control positivo o la interpretación indica que la muestra está sin resolver?

Posibles causas y solución del problema:

- No se añadió la solución de control positivo.
- La Master Mix BD DNA MMK puede estar caducada.
- Se han producido burbujas de aire en la cámara de reacción de PCR del control positivo.

4. Los resultados en tiempo real muestran señales fluorescentes muy bajas en todas las muestras y canales de detección incluyendo la señal SPC.

Posibles causas y solución del problema:

- Los tubos de reactivo CPE que contienen las sondas fluorescentes y primers pueden haberse degradado. Compruebe la fecha de caducidad y asegúrese de que los tubos CPE estaban almacenados correctamente.
- El sistema BD MAX™ puede ser el responsable de estos resultados. Consulte el manual de usuario de BD MAX™ o póngase en contacto con su representante local de BD.

5. El sistema BD MAX™ indica un error o fallo.

Consulte el manual de usuario del instrumento BD MAX™ o póngase en contacto con su representante local de BD.

6. Las muestras duplicadas analizadas con la prueba Check-Direct CPE no producen resultados idénticos.

Los valores C_T de muestras idénticas pueden variar entre las reacciones individuales. Grandes variaciones, $> 2 C_T$, sugieren errores de pipeteo o la existencia de otras diferencias entre las muestras duplicadas.

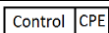








Limitaciones

Check-Direct CPE utiliza un rango de marcadores específicos de ADN para detectar la presencia de los genes de carbapenemasas KPC, NDM, OXA-48 y VIM, que en la actualidad representan las carbapenemasas clínicamente más frecuentes. La prueba detecta todas las variantes conocidas actualmente de KPC, NDM, OXA-48 y VIM, salvo VIM-7, una variante rara que únicamente se encuentra en *Pseudomonas aeruginosa*. Debe señalarse que otras familias de genes de carbapenemasas no se detectan. La prueba está diseñada para ser utilizada con células bacterianas puras como material de entrada.

La calidad del ADN de entrada es un factor importante para obtener unos resultados fiables con Check-Direct CPE. Para las suspensiones celulares, las densidades celulares correctas son un factor importante para obtener resultados fiables. El procedimiento descrito en este manual debe seguirse estrictamente. La prueba ha sido analizada extensamente con ADN purificado procedente de bacterias Gram negativas tales como *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Pseudomonas* con excelentes resultados. Sin embargo, nunca debe descartarse que otras bacterias o determinadas cepas de bacterias Gram negativas de las especies anteriormente mencionadas arrojen unos resultados deficientes. Check-Direct CPE no puede ni hace ninguna declaración o garantía de que sea capaz de detectar correctamente los genes de carbapenemasas en todas las especies, subespecies o tipos de bacterias Gram negativas o en todas las muestras clínicas. En casos específicos, los resultados pueden necesitar ser confirmados mediante metodologías adicionales (por ejemplo, para las muestras normativas). Debido a la alta variabilidad de los genomas bacterianos, podrían no detectarse determinados subtipos. La prueba refleja el estado del conocimiento de Check-Points Health B.V.

La presencia de múltiples especies de bacterias en una muestra puede dificultar la interpretación de la prueba. Al igual que con otras pruebas de diagnóstico, los resultados de esta prueba sólo pueden ser interpretados en combinación con los datos clínicos y de laboratorio que la persona responsable tenga a su disposición. El uso de esta prueba está restringido a personal debidamente cualificado y capacitado en la utilización de métodos de detección molecular basados en ADN.

Leyenda de los símbolos utilizados

Símbolo	Definición
	Control CPE
	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Código de lote
	Usar antes de AAAA-MM
	Consulte las instrucciones de uso
	Fabricante
	Limitación de temperatura
	Contenido suficiente para <n> pruebas

Asistencia técnica

support@check-points.com

+31 317 453 908

A pesar de que se utilizó muchísimo cuidado en el desarrollo y preparación del protocolo, Check-Points no se hace responsable por los errores, omisiones y/o modificaciones futuras en este documento.

Citas para publicación: Cuando describa un procedimiento para su publicación utilizando este producto, refiérase a éste como *Check-Direct CPE*.

Aviso al comprador:

Este producto se vende bajo licencia de PHRI Properties y puede ser utilizado bajo los derechos de patente de PHRI Properties únicamente para diagnósticos *in vitro*, análisis de alimentos, pruebas veterinarias o investigación.

Los fluoróforos y quencher usados en este producto se venden bajo licencia de Biosearch Technologies, Inc. y están protegidos por patentes estadounidenses y mundiales expedidas o solicitadas. La licencia concedida cubre las aplicaciones de diagnóstico *in vitro* (IVD, por sus siglas en inglés).

Marcas comerciales

BD, BD MAX™ son marcas comerciales de Becton Dickinson GmbH

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

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



Anexo 1: Programación de la prueba Check-Direct CPEv.4.70 o superior

Puntos importantes antes de empezar: Consulte el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones detalladas sobre cómo manejar el sistema BD MAX™ y la versión de software **4.70 o superior**.

Para crear una nueva prueba, en la pestaña **Editor de test**, seleccione **Crear** y siga las siguientes instrucciones:

- En la pestaña **Información básica** introduzca los siguientes parámetros:
 - Nombre de la prueba:** *Check-Direct CPE 4.*
 - Tipo de extracción:** Seleccione *Exk DNA-1 (Plasma/Serum)[4-snap]*.
 - Formato de mezcla maestra:** seleccione *Tipo 1: BD MMK o MMK(SPC) y sondas y primers desecados*
 - Ejemplo de parámetros de extracción:** Seleccione *Configuración predeterminada*, véase la Tabla A.
 - Cálculo C_t:** Seleccione *Cálculo de C_t en punto de inflexión*.

Guárdelos parámetros

- En la pestaña **Configuración de PCR** introduzca los siguientes parámetros:
 - Alias, Ganancia y Umbral (Threshold):** Para cada canal de detección introduzca los parámetros correctos especificados en la Tabla B.
 - Compensación de color:** Introduzca los parámetros correctos especificados en la Tabla C.

Guárdelos parámetros

- En las **Etapas del test** introduzca las etapas de PCR tal como están especificadas en la Tabla D.

Guárdelos parámetros

Tabla A: Parámetros de extracción de muestra.

Parámetros	Valor
Tiempo de calentamiento	10
Temperatura de lisis	37
Altura de punta de	1600
Volumen de muestra	937,5
Volumen de lavado	500
Volumen de neutralización	12,5
Tiempo de	----

Tabla B: Parámetros de ganancia.

Detector	Alias	Ganancia	Umbral
475/520	KPC	40	100
530/565	VIM	80	150
585/630	OXA-48	30	150
630/665	NDM	80	150
680/715	SPC	40	150

Tabla C: Parámetros de compensación.

	Canal de recepción falsa					
	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715	
Canal de excitación	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	

Tabla D: Parámetros para las etapas de PCR.

Nombre de la etapa	Tipo de perfil	Ciclos	Tiempo (s)	Temperatura (°)	Detección
Desnaturalización	Mantener	1	600	98	NO
Amplificación y detección	2 - temperatura	45	15	98	NO
			62	60	SI

Anexo 2: Características de rendimiento

Especificidad *in silico*

La especificidad de la prueba de diagnóstico en tiempo real Check-Direct CPE for BD MAX™ está garantizada por la selección de los primers y sondas correctas, así como por la selección de condiciones de reacción rigurosas. Tanto las secuencias de primers como de sondas fueron diseñadas para identificar específicamente las variantes de genes enumeradas en la siguiente Tabla. Se asumió una coincidencia de secuencia del 100 % con los primers y sondas mediante análisis *in silico* para asegurarla detección fiable de cada una de las variantes presentadas. Si en algunas variantes existe un desfase puntual con los primers y sondas, esperamos que la detección no se vea afectada por éstos. Esto se confirmó mediante el análisis de dichas variantes en comparación con las variantes que eran homólogas al 100 %.

El 1 de abril de 2014, las secuencias de primers y sondas fueron examinadas para determinar posibles homologías con genes de otros organismos utilizando todas las secuencias de genes presentes en el banco genético internacional. (GenBank®, base de datos de secuencia genética de los NIH). utilizando el análisis de comparación de secuencias. No se encontró homología cruzada con otros organismos con los primers y sondas seleccionados.

Gen de carbapenemasas	Variantes detectadas
KPC	1 - 17
NDM	1 -10
VIM	1 - 6 y 8 -38
OXA-48	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 247, 370

Especificidad analítica

La especificidad analítica de la prueba de diagnóstico en tiempo real Check-Direct CPE for BD MAX™ se determinó analizando la reactividad cruzada con muestras que contenían una alta cantidad de organismos no diana. En la siguiente tabla se presenta un resumen de estas cepas. Se realizó un estudio retrospectivo con 100 cepas bacterianas de 9 especies Gram negativas, que habían sido identificadas previamente como positivas a las carbapenemasas con la prueba de diagnóstico de microarray Check_MDR CT103 de Check-Points (Check-Points Health).

Todas las bacterias aisladas analizadas dieron negativo con la prueba Check-Direct CPE for BD MAX™ y el control interno se detectó en todas las muestras de forma fiable. La especificidad se basó al 100 % en las cepas de referencia analizadas.

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

Inclusividad analítica

Se realizó un estudio retrospectivo con 94 cepas bacterianas de 14 especies Gram negativas, que habían sido identificadas previamente como positivas a las carbapenemasas con la prueba de diagnóstico de microarray Check_MDR CT103 de Check-Points (Check-Points Health). Las 94 cepas bacterianas fueron identificadas correctamente para los genes de carbapenemasas. Los resultados se presentan en la siguiente tabla. La inclusividad fue del 100 % para las cepas analizadas.

Número de cepas analizadas	Resultado Check-MDR CT103	Resultado Check-Direct CPE	Inclusividad de los resultados
19	KPC	KPC	100%
14	NDM	NDM	100%
36	VIM	VIM	100%
23	OXA-48	OXA-48	100%
1	NDM + OXA-48	NDM + OXA-48	100%
1	VIM + OXA-48	VIM + OXA-48	100%

Rendimiento clínico

El rendimiento clínico de la prueba Check-Direct CPE for BD MAX™ fue evaluado en un laboratorio central de referencia utilizando bacterias aisladas no susceptibles a las carbapenemasas procedentes de centros clínicos de diferente distribución geográfica. Se seleccionaron 450 bacterias aisladas, 438 Enterobacterias y 12 *Pseudomonas spp.* Como referencia, la presencia e identidad de los genes de carbapenemasas en estas bacterias aisladas se analizaron mediante pruebas de PCR específicas de gen y/o mediante un análisis con la prueba Check-Points Check-MDR CT102 Assay. Las bacterias aisladas fueron cultivadas en placas de agar MacConkey con un disco de Ertapenem de 10 mg y fueron procesadas utilizando el procedimiento descrito en este Manual.

En relación con el método de referencia, la prueba Check-Direct CPE demostró sensibilidad y especificidad generales del 100 % y 100 % respectivamente.

Especies y genes de carbapenemasas del panel de bacterias aisladas

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

*23 bacterias aisladas incluyendo *Citrobacter spp.* (n = 15), *Raoultella spp.* (n=3), *Leclercia adecarboxylata* (n=2), *Serratia marcescens* (n=2) y *Kluyvera georgiana* (n=1).

Rendimiento general Check-Direct CPE frente al método de referencia

	CPE	Referencia		Total
		+	-	
BD MAX™	+	402	0	402
CPE PCR	-	0	48	48
Total		402	48	450

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 100%

Rendimiento Check-Direct CPE frente al método de referencia para KPC

KPC		Referencia		Total
		+	-	
BD MAX™	+	100	0	100
CPE PCR	-	0	350	350
Total		100	350	450

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 100%

Rendimiento Check-Direct CPE frente al método de referencia para OXA-48

OXA-48		Referencia		Total
		+	-	
BD MAX™	+	102	0	102
CPE PCR	-	0	348	348
Total		102	348	450

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 100%

Rendimiento Check-Direct CPE frente al método de referencia para VIM

VIM		Referencia		Total
		+	-	
BD MAX™	+	100	0	100
CPE PCR	-	0	350	350
Total		100	350	450

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 100%

Rendimiento Check-Direct CPE frente al método de referencia para NDM

NDM		Referencia		Total
		+	-	
BD MAX™	+	102	0	102
CPE PCR	-	0	348	348
Total		102	348	450

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 100%

Referencias:

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