

## MAST ISOPLEX® CRE-ART

### PER LA RICERCA E L'USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

#### DNA/LYO5 10 tests

#### Usso Previsto

MAST ISOPLEX® CRE-ART è un kit per la diagnosi *in vitro* ad uso professionale. Si basa sulla tecnologia di amplificazione isotermica mediate da loop (LAMP) per identificare la presenza di ceppi di Enterobacteriales resistenti ai Carbapenami (CRE) e altri ceppi batterici resistenti ai Carbapenami, isolati da una cultura batterica overnight di un campione clinico.

#### Principii del test

Il kit MAST ISOPLEX® CRE-ART discrimina e identifica qualitativamente il DNA dei geni target OXA-48, OXA-23, OXA-24/OXA-40, KPC, VIM, NDM and IMP. Il saggio comprende una strip di 8 tubi, ognuna delle quali è adibita al riconoscimento di solo uno dei DNA target (sette tubi su otto). Un DNA di controllo di inibizione è provvisto dal kit e va aggiunto prima di allestire il saggio. Il saggio di controllo dell'inibizione viene condotto nel tubo numero 8 della strip di 8 tubi per identificare eventuali inibizioni dell'amplificazione del DNA nel campione e per confermare l'integrità dei reagenti del saggio.

Il saggio LAMP prevede l'uso di specifici primers per 8 regioni distinte del DNA target, una DNA polimerasi in grado di dislocare il filamento di DNA, i substrati e un fluorocromo intercalante a una temperatura costante (63°C per il MAST ISOPLEX® CRE-ART).

Grazie all'elevata specificità della reazione LAMP i prodotti di amplificazione possono indicare la presenza di DNA target in 30 minuti.

#### Componenti

##### Tabella 1: Componenti del kit

Codice del kit	Contenuto	Numero	Volume	Colore del tappo	Informazioni aggiuntive sull'imballaggio
IC DNA	DNA di controllo dell'inibizione	1 tubo	Pellet trasparente essiccato	Verde	Racchiuso in un sacchetto singolo richiudibile con 2 bustine disidratanti
RB3	Buffer di ricostituzione	1 tubo	1,5mL	Arancione	Il tubo alloggia in un inserto su misura
WTR	Acqua di grado molecolare	1 tubo	1,5mL	Nero	Il tubo alloggia in un inserto su misura
CRE STRIP	Pellet con i reagenti per il saggio LAMP sui target specifici	10 x strip di 8-tubi. Ogni tubo è numerato individualmente (da 1 a 8)	Pellet bianco	Trasparente	Le CRE STRIP sono racchiuse individualmente in sacchetti singoli richiudibili con 2 bustine disidratanti

Ogni numero sui tubi della CRE STRIP indica lo specifico target che sarà amplificato, come riportato nella tabella 2.

##### Tabella 2: caratterizzazione dei tubi della CRE STRIP:

Numero del tubo	Target
1	OXA-48
2	OXA-23
3	OXA-24/OXA-40
4	KPC
5	VIM
6	NDM
7	IMP
8	Controllo dell'inibizione

## Materiale aggiuntivo richiesto

1. Uno strumento per real-time PCR o in grado di effettuare una amplificazione del DNA isoterma e di rilevare il prodotto di amplificazione tramite fluorescenza (vedi Tabella 3 per gli strumenti da usare col kit MAST ISOPLEX® CRE-ART).
2. Un mezzo di coltura microbiologica per l'isolamento di singole colonie da campioni clinici (vedi Tabella 3 per i mezzi di crescita usati per l'isolamento di colonie da campioni durante lo sviluppo del MAST ISOPLEX® CRE-ART).
3. Tubi di reazione da 1,5mL nuclease-free per la risospensione delle colonie isolate (vedi Procedura del test).
4. Centrifuga da bancone con un rotore per l'alloggio di tubi di reazione da 1,5mL.
5. Centrifuga per piastre con un inserto per strip di 8 tubi (strip 4Ti).
6. Plasticherie standard DNase-free quali tubi di reazione, pipette e puntali.
7. Guanti monouso senza polvere.
8. Pipette calibrate adattabili a dispensare volumi da 10µL a 200µL.
9. Stuzzicadenti o puntali nuclease-free.
10. Un contenitore con ghiaccio o un rack refrigerante.
11. Termoblocco con alloggio per tubi di reazione da 1,5mL in grado di tenere una temperatura di 95°C per cinque minuti.
12. Dispositivi di protezione personale (camice da laboratorio, guanti e occhiali di protezione per la preparazione del campione clinico).
13. A seconda dello strumento usato per l'amplificazione, un adattatore per le strip di 8 tubi (nelle CRE STRIP viene usato un 4Ti strip di tubi) potrebbe essere richiesto (vedi le istruzioni della casa produttrice per l'uso).

Tabella 3: Strumentazione per real-time PCR e piastre per colture microbiologiche

Produttore per strumentazione per real-time PCR	Modello
MAST - Qiagen	TS 2.4
Applied Biosystems	ABI 7500 FAST, ABI 7500
Fornitore piastre per microbiologia	Mezzo di coltura
E&O Laboratories Ltd	Columbia Agar, Mueller Hinton
Mast Diagnostica GmbH	CHROMagar™ KPC/CHROMagar™ ESBL, CHROMagar mSuperCARBA

## Preparazione del reagente

Preparare il DNA di controllo dell'inibizione (ICDNA) come segue:

1. Centrifugare brevemente il tubo in una microcentrifuga per assicurarsi che il DNA liofilizzato sia in fondo al tubo.
2. Aggiungere 200µl di acqua di grado molecolare (WTR) e lasciar dissolvere per 5 minuti.
3. Pipettare delicatamente su e giù diverse volte.
4. Lasciare in ghiaccio o su un rack refrigerante fino all'uso o aliquotare in piccoli volumi (sono richiesti 10µL per test) per conservare a lungo termine.

L'isolamento di colonie batteriche da campioni clinici deve essere condotto seguendo le linee guida sulla sicurezza in laboratorio e le pratiche standard di microbiologia.

## Conservazione e validità dopo il primo uso

1. I kit MAST ISOPLEX® CRE-ART sono spediti a temperature ambiente.
  2. Conservare i kit non aperti da 2°C a 30°C.
  3. Proteggere i kit dalla luce diretta del sole.
  4. I reagenti possono essere usati fino alla data di scadenza riportata. Non si garantisce la qualità del prodotto scaduto.
  5. Una volta risospesa, la soluzione di ICDNA può essere conservata da 2°C a 8°C se usata lo stesso giorno. Per lunghe conservazioni dopo la ricostituzione tenere piccole aliquote (un volume di 10µL è richiesto per test) a meno 20°C per prevenire numerosi cicli di congelamento-scongelo.
  6. RB3 e WTR sono mantenuti da 2°C a 30°C dopo l'apertura fino alla data di scadenza riportata.
- Mantenere le CRE-STRIP da 2°C a 8°C durante l'allestimento del saggio nel giorno in cui si conduce il test.



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



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

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



## Avvertenze e Precauzioni

1. I test dovrebbero essere condotti da personale qualificato nella pratica del saggio molecolare diagnostico e nell'uso della strumentazione richiesta.
2. Chi utilizza il prodotto deve assicurarsi dell'integrità dell'imballaggio, delle etichette e dei contenuti prima dell'uso (qualsiasi problema va riportato al produttore).
3. Non usare il kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* oltre la data di scadenza.
4. I campioni clinici da cui isolare le colonie devono essere trattati come materiale infettivo e/o a rischio biologico in accordo con le linee guida locali/nazionali.
5. Appropriati dispositivi di protezione personale devono essere indossati.
6. Usare precauzioni per prevenire contaminazioni microbiologiche e da nucleasi dei reagenti MAST ISOPLEX® *CRE-ART* e dei campioni clinici da testare.
7. Usare tubi di reazione, puntali e stuzzicadenti nuclease-free.
8. I tubi di reazione devono essere mantenuti chiusi durante tutto il tempo dopo l'aggiunta dei reagenti e scartati chiusi dopo l'uso, in accordo con le linee guida locali sulla salute e sulla sicurezza.
9. Per evitare la contaminazione con i prodotti di amplificazione, non aprire mai i tubi delle CRE-STRIP dopo l'amplificazione.
10. Non vortexare i tubi di reazione poiché lo stress meccanico risultante può danneggiare l'enzima e formare bolle che interferiscono con la lettura della fluorescenza.
11. Assicurarsi che tutti i tubi di reazione non presentino graffi o crepe prima dell'uso.
12. Lavorare in aree dedicate con la strumentazione richiesta disponibile in ogni area per separare a) l'isolamento della colonia/l'uso del campione clinico; b) l'allestimento del test; c) l'amplificazione e il rilevamento della real-time.
13. Assicurarsi che il tubo di reazione sia messo in ghiaccio (o in un rack refrigerante) dopo l'incubazione a 95°C per 5 minuti per evitare l'inattivazione dei componenti delle CRE STRIP in seguito all'aggiunta del contenuto del tubo di reazione.
14. Assicurarsi che il tubo di reazione contenente il campione, il buffer RB3 e l'ICDNA sia ben chiuso prima dell'incubazione a 95°C.
15. Prestare attenzione quando si opera con strumentazione e materiale ad elevate temperature e seguire le linee guida sulla sicurezza locali e/o nazionali.
16. Assicurarsi che tutti gli strumenti siano correttamente installati, calibrati e mantenuti in accordo con le linee guida della casa produttrice.

## Raccolta, uso e conservazione del campione primario

Il campione primario da usare con MAST ISOPLEX® *CRE-ART* è una colonia batterica isolata derivata da un campione clinico. I test vanno condotti dopo aver messo in coltura overnight il campione clinico per ottenere una colonia isolata.

## Procedura del test

1. Pipettare 90µL del buffer RB3 in un tubo di reazione da 1,5mL.
2. Usando uno stuzzicadenti o un puntale per pipette, toccare la superficie di una colonia isolata (~0.2 McFarland; 10<sup>8</sup>cfu/mL) da una coltura overnight su piastra batterica, immergerla in un tubo di reazione da 1,5mL (passaggio 1) e mescolare delicatamente.
3. Aggiungere nel tubo di reazione del saggio 10µL dell'ICDNA ricostituito. Miscelare pipettando su e giù almeno cinque volte.
4. Assicurarsi che il tubo di reazione del saggio sia ben chiuso e incubarlo per 5 minuti a 95°C.
5. Dopo l'incubazione, rimuovere subito il tubo di reazione del saggio e metterlo in ghiaccio o in un rack refrigerante per 5 minuti.
6. Dopo averla raffreddata in ghiaccio, centrifugare brevemente la miscela di reazione per ~5 secondi a ~6000rpm.
7. Aggiungere 10µL della miscela di reazione a ogni tubo delle CRE STRIP.
8. Centrifugare la CRE STRIP in una piastra da centrifuga per 5 seconds a ~2500rpm.
9. Collocare la CRE STRIP nello strumento scelto per l'amplificazione isoterma (se necessario, assicurarsi che l'adattatore appropriato per le strip di 8 tubi sia in uso).
10. Settare lo strumento per effettuare un saggio LAMP.  
Fare riferimento al manuale d'uso fornito dal produttore per settare e programmare lo strumento.
  - a. Settare i parametri del saggio, questi dipenderanno dallo strumento usato.

Tabella 4: Parametri del saggio

Strumento	Parametri			
ABI 7500 FAST ABI 7500	Temperatura: 63°C	Tempo: 30minuti	Durata del ciclo: 1 minuto	Riferimento di background: Nessuno
TS2.4	Selezionare il protocollo CreArt_Eng_3			

Nota: per gli strumenti non in lista, seguire i parametri di temperature e tempo previsti per l'ABI7500/FAST  
b. Selezionare il canale di lettura del FAM.

### Procedura di controllo

I kit MAST ISOPLEX®CRE-ART (ciascun lotto) sono testati secondo specifiche predefinite per assicurare l'affidabilità della qualità del prodotto in accordo con Mast Group Limited EN ISO13485:2016 'Medical devices – Quality Management Systems – Requirements for regulatory purposes' e con IVDD 98/79/EC 'In vitro diagnostic medical devices'.

Il tubo 8 di ogni CRE STRIP funge da controllo di qualità per ogni CRE STRIP poiché deve produrre sempre un risultato positivo. Questo saggio amplifica l'ICDNA aggiunto al campione appena prima dell'incubazione a caldo. Un risultato positivo nel tubo 8 indica che l'elevata temperatura non ha denaturato il DNA, che i componenti della CRE STRIP funzionano come previsto e che l'ICDNA è stato aggiunto prima dell'incubazione a caldo. Un risultato negativo nel tubo 8 della CRE STRIP indica la degradazione del DNA o che l'ICDNA non è stato aggiunto al campione o che i reagenti della CRE STRIP non stanno funzionando correttamente. Nel caso di un risultato negativo, prima di ripetere il saggio ricontrollare il settaggio dello strumento, assicurarsi che la procedura del test sia stata eseguita correttamente e che i reagenti non siano scaduti.

Per assicurarsi che non ci siano state contaminazioni durante la procedura, un saggio può essere condotto in assenza dell'ICDNA o del campione. Sostituire il volume dell'ICDNA o del campione con l'acqua (WTR) fornita nel kit MAST ISOPLEX® CRE-ART. Tutti i tubi dovranno dare un risultato negativo. Un risultato positivo indica la presenza di DNA non specifico. Assicurarsi che tutto il materiale e le aree di lavoro siano libere da ogni contaminazione prima di ripetere il saggio. Se viene osservato ancora lo stesso risultato contattare il Supporto Tecnico della Mast Group Limited.

Per assicurarsi che i tubi CRE STRIP stiano funzionando correttamente, un controllo positivo di DNA specifico per ogni target di ogni tubo può essere usato al posto del campione da testare. Un risultato positivo dovrebbe essere osservato in ogni tubo dove sia stato aggiunto il controllo positivo. Se si osserva un risultato negativo il saggio LAMP è stato inibito o il DNA del controllo positivo non è stato aggiunto. Ripetere il saggio. Contattare il Supporto Tecnico della Mast Group Limited per maggiori informazioni sul DNA di controllo positivo.

Tabella 5: Interpretazione dei controlli

	CRE STRIP (numero del tubo)								Interpretazione del risultato	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
<b>Campione di controllo</b>										
Nessun controllo specifico (aggiunto solo l'ICDNA)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Risultato valido.
Nessun controllo specifico (aggiunto solo l'ICDNA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Risultato non valido. Ripetere il test assicurandosi che il materiale usato sia DNA free.
Controllo positivo specifico DNA +ICDNA	- In ogni tubo (dal tubo 1 al tubo 7)								+	Risultato non valido: Ripetere il test assicurandosi che il DNA di controllo positivo specifico venga aggiunto

+ denota amplificazione positiva e Ct < 30; - denota amplificazione negativa e valore di Ct non determinato

## Interpretazione dei risultati

L'analisi di ogni test è condotta dal software dello strumento. In generale, un risultato positivo è indicato da una netta differenza di intensità rispetto al controllo negativo, data in un determinato momento. Affinché un risultato sia ritenuto valido, un risultato positivo deve essere osservato nel tubo 8 (ICDNA). Se il tubo 8 della CRE STRIP dà un risultato negativo, il test deve essere ripetuto in presenza dell'ICDNA

Tabella 6: interpretazione dei risultati del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART

CRE STRIP (numero del tubo)								Interpretazione dei risultati
1	2	3	4	5	6	7	8	
+	-	-	-	-	-	-	+	Risultato valido: Positivo per OXA-48
-	+	-	-	-	-	-	+	Risultato valido: Positivo per OXA-23
-	-	+	-	-	-	-	+	Risultato valido: Positivo per OXA-24/OXA40
-	-	-	+	-	-	-	+	Risultato valido: Positivo per KPC
-	-	-	-	+	-	-	+	Risultato valido: Positivo per VIM
-	-	-	-	-	+	-	+	Risultato valido: Positivo per NDM
-	-	-	-	-	-	+	+	Risultato valido: Positivo per IMP
-	-	-	-	-	-	-	+	Risultato valido: Campione negativo (Nessun DNA target nel campione)
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	Risultato non valido. Ripetere il test assicurandosi di aggiungere l'ICDNA al campione prima dell'incubazione a 95°C.
+ in più di un tubo (tubi dall'1 al 7)							+	Risultato valido: Positivo per più di un DNA target

+ denota amplificazione positiva e Ct < 30; - denota amplificazione negativa e valore di Ct non determinato

In caso di risultato incerto si raccomanda di ripetere l'esperimento per testare di nuovo il campione (in duplicato per confermare il risultato) o di confermare il risultato usando un metodo alternativo.

Un risultato positivo è indicato dal rapido incremento di intensità della fluorescenza in un lasso di tempo relativamente piccolo ed entro i 30 minuti della durata del saggio, mentre un risultato negativo non mostra alcun rapido incremento di intensità nello stesso lasso di tempo (far riferimento alle figure 1-2).

Figure 1: Figura 1: Tipico plot di amplificazione osservato con TS2.4 *Klebsiella pneumoniae* portatore del gene OXA48 usando il kit MAST ISOPLEX® CRE-ART kit.

Nota: L'unità dell'intervallo di tempo è 0.5 minuti, il plot di amplificazione è generato su 30 minuti di saggio

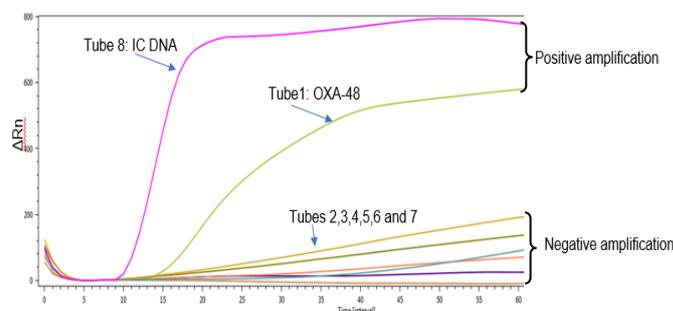
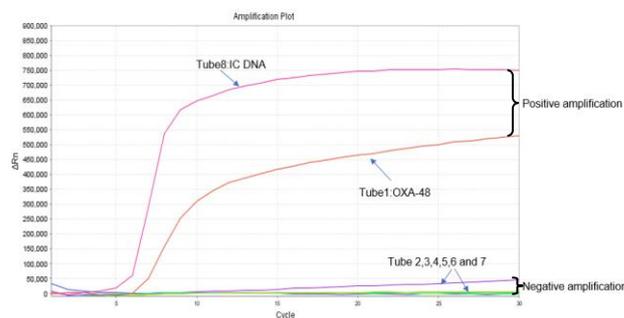


Figura 2: Tipico plot di amplificazione dato da ABI 7500 FAST con *Klebsiella pneumoniae* portatore del gene OXA48 usando il kit MAST ISOPLEX® CRE-ART kit.



### Caratteristiche della performance

#### Tracciabilità e valori assegnati ai calibratori e materiali usati per la veridicità del controllo.

La calibrazione, il servizio e il mantenimento dei materiali usati nel kit MAST ISOPLEX®CRE-ART sono condotti in accordo con le guide locali e nazionali. Il controllo qualità di tutti i componenti sono testati e validati in accordo con le linee guida locali e nazionali.

#### Sensibilità analitica.

La sensibilità analitica del kit MAST ISOPLEX®CRE-ART è stata determinata usando il plasmide pEX-A218 che porta un DNA target come inserto. I test sono stati condotti su diluizioni 1:10 seriali del plasmide con un range che va da 10pg a 0.001fg. Un totale di 8 replicati sono stati condotti per ogni plasmide a ogni concentrazione e i dati sono stati analizzati usando l'analisi Probit.

Tabella 7: Sensibilità analitica (sulla base di un plasmide contenente un sequenze target specifiche)

Gene target	Valore Probit Femtogrammi/μL (intervallo di confidenza del 95%)	Valore Probit Numero di copie di DNA/μL (intervallo di confidenza del 95%)
OXA-48	0,13fg/μL (0,07 to 0,75)	44 copies/μL (22,5 to 244,2)
OXA-23	0,28 fg/μL (0,15 to 1,19)	92 copies/μL (49,7 to 386,7)
OXA-24/OXA-40	2,1 fg/μL (1,05 to 2,02)	683 copies/μL (344 to 6576)
KPC	0,1 fg/μL (0,05 to 0,58)	35 copies/μL (17,4 to 187,4)
VIM	0,1 fg/μL (0,05 to 0,62)	35 copies/μL (16,6 to 195,7)
NDM	0,2 fg/μL (0,08 to 1,36)	53 copies/μL (27,6 to 442,7)
IMP	2,7 fg/μL (1,12 to 27,8)	879 copies/μL (364,8 to 9035,3)

Tabella 8: Sensibilità analitica (sulla base di ceppi batterici che producono Carbapenamasi)

Ceppo	Numero ACTC/ATCC	Famiglia del gene target	Valore Probit cfu/μL (intervallo di confidenza del 95%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13422	OXA-48	4 cfu/μL (2,7 to 10,9)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NCTC 13424	OXA-23	57 cfu/μL (16,71 to 925)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NCTC 13302	OXA-24/OXA-40	43 cfu/μL (18,4 to 1043,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13438	KPC	12 cfu/μL (7,0 to 53,2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13439	VIM	12 cfu/μL (5,5 to 72,6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2472	NDM	15 cfu/μL (9,8 to 140,3)
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13476	IMP	5 cfu/μL (2,7 to 25,5)

### Specificità analitica

MAST ISOPLEX® CRE-ART fornisce il 100% di specificità analitica se testato con il plasmide target specifico usato nel test di sensibilità analitica e non dà reazioni incrociate con nessuna delle specie (con B-lattamasi note) in lista (vedi la Tabella 9).

Tabella 9: Test di reattività incrociata

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

### Precisione

La precisione del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART è stata determinata in termini di ripetibilità (variazione interna ai batches usando un singolo batch e sei test condotti in un singolo giorno, vedi Tabella 10a e 10b) e di riproducibilità (variazione tra i batches – 3 batches testati, vedi Tabella 11a e 11b)

Dal momento che il saggio LAMP non è un test quantitativo, il calcolo della precisione non è una misura assoluta della performance del test in termini del tempo impiegato per ottenere un risultato positivo. I dati prodotti sulla ripetibilità mostrano un intervallo di deviazione standard tra 0,35 e 1,94 per diversi target con un intervallo del valore percentuale % CV fra 2,29 e 12,31, mentre per la riproducibilità l'intervallo di deviazione standard è compreso tra 0,21 e 3,02 e quello del valore percentuale % CV è tra 2,1 e 17,96. Un valore percentuale % CV <10 è considerato molto buono, da 10 a 20 è buono, da 20 a 30 è accettabile e >30 è considerato non accettabile, perciò i valori ottenuti sono buoni.

Tabella 10a: Ripetibilità del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART per target specifici

Target	Valore di Ct medio	Deviazione Standard	Coefficiente di variazione (%CV)
OXA-48	15,13	1,12	7,67
OXA-23	15,18	1,87	12,31
OXA-24/OXA-40	19,21	1,94	10,07
KPC	15,34	0,35	2,29
VIM	12,10	1,08	8,88
NDM	10,66	0,47	4,43
IMP	14,23	1,27	8,91

Tabella 10b: Ripetibilità per il DNA di controllo dell'inibizione (ICDNA)

Target	Valore di Ct medio	Deviazione Standard	Coefficiente di variazione (%CV)
ICDNA	11,59	1.35	11,61

Tabella 11a: Riproducibilità del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART

Target	Valore di Ct medio	Deviazione Standard	Coefficiente di variazione (%CV)
OXA-48	13,2	1,17	8,86
OXA-23	12,99	1,05	8,03
OXA-24/OXA-40	17,98	3,02	17,96
KPC	14,52	0,57	3,92
VIM	10,34	1,44	13,93
NDM	9,99	0,21	2,1
IMP	13,03	0,58	4,43

Tabella 11b: Riproducibilità del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART kit per il DNA di controllo dell'inibizione (ICDNA)

Target	Valore di Ct medio	Deviazione Standard	Coefficiente di variazione (%CV)
ICDNA	10,63	0,27	2,52

### Caratteristiche di performance diagnostica

Le caratteristiche della performance diagnostica del kit del MAST ISOPLEX® CRE-ART (vedi Tabella 12a e 12b) sono state determinate su 248 isolati clinici, di cui Enterobacterales (n=203), *Acinetobacter* species (n=37) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=8). Isolati clinici che hanno carbapenamasi non target del saggio e che non sono rilevate dallo stesso, sono stati classificati come veri negativi. Il lavoro è stato condotto dal dipartimento di Microbiologia di Newcastle Upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust.

Tabella 12a: Rilevamento delle Carbapenamasi in 240 batteri Gram-negativi usando il kit MAST ISOPLEX® CRE-ART

Tipo di batteri/ Gene target	Numero di batteri testati	Numero rilevato dal kit MAST ISOPLEX® CRE-ART
<b>Enterobacterales che producono Carbapenamasi</b>		
KPC	16	16
VIM	13	13
IMP	12	12
OXA-48-like	61	61
NDM	52	52
NCM-A	1	0
<b>Pseudomonas aeruginosa che producono Carbapenamasi</b>		
VIM	2	2
NDM	2	2
<b>Acinetobacter spp che producono Carbapenamasi</b>		
OXA-23-like	23	23
OXA-24-like/ OXA-40-like	2	2
NDM	3	3
OXA-51-like	12	0
OXA-58-like	5	0
OXA-69-like	1	0
<b>Isolati batterici senza Carbapenamasi</b>	53	2

**Nota:** il kit MAST ISOPLEX® CRE-ART non riconosce il DNA di NCM-A, OXA-51-like, OXA-58-like o OXA-69-like e i risultati dei test condotti su questi ceppi sono considerati veri negativi.

In accordo con i dati su riportati, le caratteristiche della performance diagnostica del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART sono mostrate nella Tabella 12b.

Tabella 12b: Caratteristiche della performance diagnostica del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART

Diagnostic characteristic	
Sensitivity	100%
Specificity	97%
Positive predictive value	99%
Negative predictive value	100%

### Intervallo di misurazione

MAST ISOPLEX® CRE-ART è un test qualitativo anche se il kit è stato testato con l'intento di determinare la sensibilità analitica con un range di DNA target specifico che va da 100fg a 1pg per reazione.

### Intervallo di riferimento biologico

MAST ISOPLEX® CRE-ART è un test qualitativo e non quantitativo perciò gli intervalli di riferimento biologico non sono rilevanti.

### Limiti della procedura del test

1. I risultati ottenuti dall'uso del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART devono essere usati in combinazione con altri fattori clinici e non da soli per la diagnosi di una condizione clinica.
2. Il kit MAST ISOPLEX® CRE-ART kit è validato per il test di una colonia batterica isolata da una coltura proveniente da un campione clinico.
3. La quantità di batteri inoculati (vedi il punto 2 della Procedura del test) dovrebbe essere equivalente a ~0.2 McFarland o 10\*cfu/mL.
4. Il kit MAST ISOPLEX® CRE-ART kit è stato validato con gli strumenti e i mezzi microbiologici riportati in questo documento. L'uso di altri strumenti o di altri mezzi di coltura microbiologica devono essere validati da chi utilizza il kit prima del suo uso diagnostico.



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



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

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



5. La presenza di DNasi o proteasi può condurre a risultati non validi, chi utilizza il kit deve assicurarsi che tutti gli strumenti e i materiali siano DNA free.
6. Livelli molto alti di DNA possono causare un alto background e quindi falsi negativi dovuti alla soglia massima raggiunta dallo strumento durante il saggio di amplificazione. Attenersi alle istruzioni d'uso, in particolare prendendo una piccola quantità di colonia, per prevenire questa eventualità.
7. Anche se la amplificazione LAMP può produrre falsi positivi da una quantità molto piccolo di DNA target, tali falsi positivi non dovrebbero essere riproducibili essendo al di sotto di un dato limite di rilevamento. Attenersi alle istruzioni d'uso, in particolare prendendo una piccola quantità di colonia, per prevenire questa eventualità.
8. Il kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* è progettato per amplificare in maniera specifica alcune classi e sottogruppi di  $\beta$ -lattamasi. Il test amplifica le classi/sottogruppi riportati nella Tabella 13.

Tabella 13: Famiglie target e membri delle Famiglie riconosciute dal kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART*

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

9. Il kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* potrebbe non amplificare OXA-535, OXA-436, OXA-54, VIM-7, VIM 61, NDM-25 e NDM-26.
10. Chi utilizza il kit deve sempre far riferimento al plot di amplificazione (dati crudi) generati dal test per assicurarsi che il risultato positivo sia dovuto all'amplificazione del target specifico e non alla conseguenza dell'effetto di "ramping" che si può osservare negli strumenti in cui la soglia di background non può essere cambiata manualmente.
11. Ogni CRE STRIP nel kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* deve essere usata su un singolo campione da testare. Per accertarsi della validità dell'amplificazione positiva, usare una CRE STRIP per un controllo negativo senza DNA e una CRE STRIP per un controllo positivo con DNA.

## Bibliografia

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