

## MAST ISOPLEX® CRE-ART

### PARA USO DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO IN VITRO

#### DNA/LYO5 10 tests.

#### Uso Previsto

El kit MAST ISOPLEX® CRE-ART es un kit de diagnóstico *in vitro* para uso profesional. Está basado en tecnología de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección cualitativa y diferenciación de Enterobacterales Carbapenem-resistentes (CRE) y otras bacterias Carbapenem resistentes aisladas vía cultivo de un espécimen clínico durante la noche.

#### Principios del método de examen

El kit MAST ISOPLEX® CRE-ART sirve para la detección cualitativa y diferenciación de OXA-48, OXA-23, OXA-24/OXA-40, KPC, VIM, NDM e IMP ADN. El ensayo consta de una tira de 8 tubos donde cada tubo individual está dirigido a un ADN objetivo específico (siete de los ocho tubos). Un ADN de control de inhibición es suministrado en el kit y se debe añadir antes del comienzo del ensayo. El ensayo de control de inhibición se realiza en el tubo 8 de la tira de 8-tubos para identificar posible inhibición de la amplificación del ADN en la muestra y para confirmar la integridad de los reactivos del ensayo. El ensayo LAMP involucra el uso específico de primers específicos de 8 regiones distintas del ADN objetivo, un ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hilo, substratos y un colorante de fluorocromo intercalado a temperatura constante (63°C para MAST ISOPLEX® CRE-ART. Debido a la alta especificidad del LAMP la presencia del producto amplificado puede indicar la presencia del ADN objetivo en 30 minutos.

#### Componentes

Tabla 1: Componentes del kit

Código del kit	Contenido	Número	Volumen	Color de tapa	Información adicional del estuche
IC DNA	Control de inhibición de ADN	1 tubo	Píldora transparente y seca	Verde	Contenida en una bolsa individual resellable con 2 bolsas desecantes
RB3	Búfer de reconstitución	1 tubo	1,5mL	Naranja	El tubo es sostenido con firmeza en un inserto hecho a medida
WTR	Agua de Grado Molecular	1 tubo	1,5mL	Negro	El tubo es sostenido con firmeza en un inserto hecho a medida
CRE STRIP	Píldora reactiva de ensayo LAMP de objetivo específico	10 x Tira de 8-tubos. Cada tubo numerado individualmente (1 al 8)	Píldora blanca	Transparente	CRE STRIP están empaquetados en una bolsa resellable junto con 2 bolsas desecantes

Cada número de tubo de CRE STRIP indica el objetivo específico siendo detectado como se describe en la Tabla 2

Tabla 2: definición de los tubos CRE STRIP:

Número de Tubo	Objetivo detectado
1	OXA-48
2	OXA-23
3	OXA-24/OXA-40
4	KPC
5	VIM
6	NDM
7	IMP
8	Inhibition control



**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



## Equipamiento adicional requerido

- Equipo apropiado para Real-time PCR o equipamiento capacitado para la amplificación isotérmica de ADN y detección del producto amplificado usando fluorescencia (ver tabla 3 para equipos adecuados para el uso de MAST ISOPLEX® CRE-ART).
- Medios de cultivo microbiológico para aislamiento de crecimiento de colonias único de una muestra del paciente (ver tabla 3 para medios de crecimiento usados para aislamiento de colonias de una muestra durante el desarrollo de MAST ISOPLEX® CRE-ART).
- Tubos de ensayo libres de nucleasa de 1.5mL para el uso de resuspensión de las colonias aisladas (ver Procedimiento de examen).
- Centrifugadora de laboratorio con un rotor para colocar tubos de ensayo de 1,5mL.
- Centrifugadora de placas o microcentrifugadora con inserto para tiras de 8-tubos (tira de tubos 4Ti).
- Suministros estándar libres de DNasa tales como tubos de ensayo, pipetas y puntas de pipeta.
- Guantes libres de talco desechables.
- Pipetas ajustables calibradas, capaces de dispensar volúmenes desde 10µL hasta 200µL.
- Punta de pipeta o palillo libre de nucleasa.
- Cubo con hielo o bloque frío.
- Unidad calentadora con bloque calefactor para contener 1,5mL tubos de ensayo y mantener la temperatura a 95°C por cinco minutos.
- Equipo de protección personal como bata de laboratorio, guantes y protección para los ojos (para preparación de la muestra).
- Dependiendo del equipo de amplificación usado, un soporte para tiras de 8-tubos (tira de tubos 4Ti es utilizado en CRE STRIP) puede ser requerido (ver las instrucciones de uso del respectivo fabricante).

Tabla 3: Equipamiento para Real-time PCR y placas de medio microbiológico

Fabricante de Real-time PCR	Modelo
MAST - Qiagen	TS 2.4
Applied Biosystems	ABI 7500 FAST, ABI 7500
Proveedor de medio microbiológico	Medio
E&O Laboratories Ltd	Columbia Agar, Mueller Hinton
Mast Diagnostica GmbH	CHROMagar™ KPC/CHROMagar™ ESBL, CHROMagar mSuperCARBA

## Preparación de Reactivos

Preparar Control de inhibición de ADN (ICDNA) como sigue:

- Girar el tubo brevemente en una microcentrifugadora para asegurar que el ADN liofilizado se encuentra al fondo del tubo.
- Añadir 200µL de agua de grado molecular (WTR) y dejar disolver por 5 minutos.
- Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo varias veces.
- Poner en hielo o en bloque frío hasta ser usado o dividir en volúmenes más pequeños (10µL requeridos por cada muestra a testear) almacenamiento a largo plazo.

El aislamiento de colonias bacterianas de una muestra clínica debe ser realizada siguiendo las reglas de seguridad en el laboratorio y las prácticas microbiológicas estándar.

## Almacenamiento y vida útil después de la primera apertura

- Los kits MAST ISOPLEX® CRE-ART son enviados a temperatura ambiente.
- Almacenar el kit sin abrir entre 2°C hasta 30°C.
- Resguardar los reactivos de la luz solar directa.
- Los reactivos pueden ser usados hasta la fecha de vencimiento. Después de la fecha de vencimiento no se garantiza la calidad del producto.
- Después de la resuspensión de la solución ICDNA puede ser almacenada entre 2°C y 8°C si va a ser utilizada el mismo día. Para largo plazo después de la reconstitución, guardar en pequeñas dosis (10µL volumen requerido por cada muestra a testear) a menos 20°C para prevenir múltiples ciclos de congelar-descongelar.
- RB3 y WTR se deben mantener entre 2°C y 30°C una vez abiertos hasta la fecha de vencimiento.
- El día en el que se realicen los test, la CRE-STRIP reconstituida debe mantenerse entre 2°C y 8°C durante la preparación del ensayo.



**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



## Advertencias y Precauciones

1. Los test deben ser llevados a cabo por profesionales entrenados en el manejo del equipamiento requerido y ensayos de diagnóstico molecular.
2. El usuario debe asegurarse de la integridad del envase, etiquetas y contenido componente antes del primer uso (cualquier problema debe ser comunicado al fabricante).
3. No usar MAST ISOPLEX® *CRE-ART* después de la fecha de vencimiento.
4. Las muestras que serán derivadas del aislamiento de colonia deben ser tratadas como infecciosas y/o de riesgo biológico de acuerdo con las regulaciones locales/nacionales.
5. Se debe llevar equipamiento de protección personal apropiado.
6. Se deben tomar precauciones para prevenir contaminación de nucleasa y microbiana de los reactivos MAST ISOPLEX® *CRE-ART* y las muestras a testear.
7. Usar tubos de ensayo libres de nucleasa, puntas de pipeta y palillo(s).
8. Los tubos de reacción deben mantenerse cerrados todo el tiempo después de añadir los reactivos y desecharlos sin abrir después de usarlos, de acuerdo con las normas de salud y seguridad locales.
9. Para evitar cualquier contaminación con el producto amplificado, no abrir nunca los tubos CRE STRIP después de la amplificación.
10. No vortear los tubos de reacción ya que esto puede provocar esfuerzos cortantes causando daños a la enzima y formación de burbujas que pueden interferir con la detección de fluorescencia.
11. Asegurar que todos los tubos de reacción están libres de rasguño(s) o roturas antes de usar.
12. Deben estar disponibles áreas de trabajo dedicadas con el equipamiento necesario y segregadas para a) aislamiento de colonias/manejo de muestras; b) procedimiento de examen y c) amplificación en tiempo real y detección.
13. Asegurarse de que los tubos de ensayo están colocados en hielo (o bloque de hielo) después de la incubación a 95°C durante 5 minutos para prevenir la inactivación de los componentes de CRE STRIP al añadir el contenido del tubo de ensayo.
14. Revisar que los tubos de ensayo que contienen la muestra, RB3 y ICDNA están cerrados herméticamente antes de la incubación a 95°C.
15. Se debe tener cuidado cuando se maneje equipamiento de calefacción, seguir las normas de seguridad locales/nacionales.
16. Asegurar que todos los equipos están totalmente instalados, calibrados y mantenidos de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

## Recolección de la muestra primaria, manipulación y almacenamiento

La muestra primaria utilizada con MAST ISOPLEX® *CRE-ART* es una colonia bacteriana aislada cultivada de una muestra clínica.

Se deben realizar test después del cultivo de la muestra clínica durante la noche para obtener una colonia aislada.

## Procedimiento de examen

1. Usar una pipeta para poner 90µL del búfer RB3 en un tubo de ensayo de 1,5mL.
2. Usando un palillo o punta de pipeta, tocar la superficie de una colonia aislada (~0.2 McFarland; 10<sup>8</sup>cfu/mL) de una placa de cultivo durante la noche, sumergirlo en el tubo de ensayo de 1,5mL del paso 1 y mezclar suavemente.
3. Añadir 10µL del ICDNA reconstituido a la mezcla en el tubo de ensayo. Mezclar pipeteando suavemente arriba y abajo al menos cinco veces.
4. Asegurarse que el tubo de reacción está cerrado, poner el tubo de ensayo a 95°C por 5 minutos.
5. Después de calentar, quitar el tubo de ensayo inmediatamente y ponerlo en hielo o bloque frío por 5 minutos.
6. Después de enfriar, girar la mezcla en una centrifugadora por ~5 segundos a ~6000rpm.
7. Añadir 10µL de la mezcla en cada tubo de la tira CRE STRIP.
8. Girar la CRE STRIP en una centrifugadora de placas por 5 segundos a ~2500rpm.
9. Colocar la CRE STRIP en el instrumento elegido para la amplificación isotérmica (si es necesario, asegurarse de que se utiliza el soporte para tira de 8 tubos adecuado).
10. Ajustar el equipo para ejecutar el ensayo LAMP.  
Consultar el manual de usuario del correspondiente equipo para ajustar y programar el equipo.
  - a. Ajustar los parámetros del ensayo, éstos serán diferentes dependiendo del equipo usado.

Tabla 4: Parámetros del ensayo

Equipo	Parámetros			
ABI 7500 FAST ABI 7500	Temperatura: 63°C	Tiempo de ensayo: 30 minutos	Tiempo de ciclo: 1 minuto	Reference del background: Ninguna
TS2.4	Seleccionar protocolo CreArt_Eng_3			

Observar que para los equipos no listados el usuario debe seguir la temperatura y tiempo de ensayo de ABI7500/FAST

- b. Seleccionar detección FAM canal de detección.

### Procedimiento de control

El kit MAST ISOPLEX®@CRE-ART (cada lote) son testeados para especificaciones predefinidas para asegurar la consistencia de la calidad del producto de acuerdo con Mast Group Limited EN ISO13485:2016 'Medical devices – Quality Management Systems – Requirements for regulatory purposes' and IVDD 98/79/EC 'In vitro diagnostic medical devices'.

El tubo 8 de CRE STRIP actúa como indicador del control de la calidad para cada ejecución de CRE STRIP ya que este ensayo debe producir siempre un resultado positivo. Este ensayo elige como objetivo el ICDNA añadido a la muestra del test antes del tratamiento térmico. Un resultado negativo en el tubo 8 de CRE STRIP indica degradación de ADN durante el tratamiento térmico, que el ICDNA no ha sido añadido a la muestra o que los reactivos de CRE STRIP no están funcionando correctamente. En caso de tener un resultado negativo, asegurar que el equipo esté ajustado correctamente, que se siga el procedimiento del test de manera adecuada y que los reactivos no hayan pasado la fecha de vencimiento antes de repetir el ensayo.

Para asegurar que no se introduce contaminación durante el procedimiento de examen, un ensayo puede ser realizado en la ausencia de ICDNA o muestra. Reemplazar el volumen de ICDNA o muestra con WTR proporcionado en el kit MAST ISOPLEX®@CRE-ART. Todos los tubos deben dar un resultado negativo. Un resultado positivo indica la presencia de ADN no específico, asegurar que todo el equipamiento y áreas de trabajo están libres de contaminación antes de repetir el ensayo. Si se observa un resultado similar contactar al Soporte Técnico de Mast Group Limited.

Para asegurar que los tubos CRE STRIP están funcionando correctamente se puede usar un control positivo de ADN específico en cada tubo objetivo en lugar de la muestra del test. Un resultado positivo debe ser detectado en cada tubo donde el control positivo es añadido. Si se observa un resultado negativo esto indica que hay inhibición del ensayo LAMP o fallo al añadir el ADN control positivo. Repetir en ensayo. Contactar Soporte Técnico de Mast Group Limited para más información sobre ADN control positivo.

Tabla 5: Interpretación de los controles

	CRE STRIP (número de tubo)								Interpretación del resultado	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
<b>Muestra de control</b>										
Sin plantilla de control (ICDNA sólo añadido)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Resultado válido.
Sin plantilla de control (ICDNA sólo añadido)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Resultado inválido: Repetir test asegurando que todo el equipamiento está libre de ADN
ADN control positivo +ICDNA	- En cualquier tubo (tubos 1 al 7)								+	Resultado inválido: Repetir test asegurando que el ADN control es añadido

+ denota una amplificación positiva y Ct < 30; - denota una amplificación negativa y Ct sin valo

## Interpretación de los resultados

El análisis de cada test es realizado por el software del equipo. En general, un resultado positivo es indicado por la clara diferencia en intensidad de emisión a un punto dado en el tiempo cuando es comparado con un control sin plantilla. Para que un resultado sea válido se debe detectar un resultado positivo en el tubo 8 (ICDNA). Si el tubo 8 de CRE STRIP da un resultado negativo, el test debería ser repetido con la presencia de ICDNA.

Tabla 6: MAST ISOPLEX® CRE-ART interpretación de los resultados

CRE STRIP (número de tubo)								Interpretación de los resultados
1	2	3	4	5	6	7	8	
+	-	-	-	-	-	-	+	Resultado válido: Positivo para OXA-48
-	+	-	-	-	-	-	+	Resultado válido: Positivo para OXA-23
-	-	+	-	-	-	-	+	Resultado válido: Positivo para OXA-24/OXA40
-	-	-	+	-	-	-	+	Resultado válido: Positivo para KPC
-	-	-	-	+	-	-	+	Resultado válido: Positivo para VIM
-	-	-	-	-	+	-	+	Resultado válido: Positivo para NDM
-	-	-	-	-	-	+	+	Resultado válido: Positivo para IMP
-	-	-	-	-	-	-	+	Resultado válido: Muestra negativa (No hay ADN objetivo en la muestra)
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	Resultado inválido. Repetir test asegurando que ICDNA es añadido a la muestra antes del tratamiento térmico
+ en más de un tubo (tubos 1 al 7)							+	Resultado válido: Positivo para más de un ADN objetivo

+ denota una amplificación positiva y Ct < 30; - denota una amplificación negativa y Ct sin valor

En caso de duda sobre un resultado se recomienda testear la muestra de nuevo (de forma duplicada para confirmar el resultado) o los resultados pueden ser confirmados usando un método alternativo.

Un resultado positivo es indicado por un incremento rápido en la intensidad de fluorescencia en un periodo de tiempo relativamente corto y dentro del margen de 30 minutos del tiempo de ensayo mientras que un resultado negativo no muestra un incremento rápido en la intensidad de fluorescencia dentro del mismo margen de tiempo (ver Figura 1 a 2).

Figura 1: Gráfica de amplificación típica usando TS2.4 *Klebsiella pneumoniae* que contiene gen OXA48 testeado usando el kit MAST ISOPLEX® CRE-ART.

Nota: El primer intervalo es equivalente a 0.5 minutos. gráfico de amplificación generado sobre tiempo de ensayo de 30 minutos

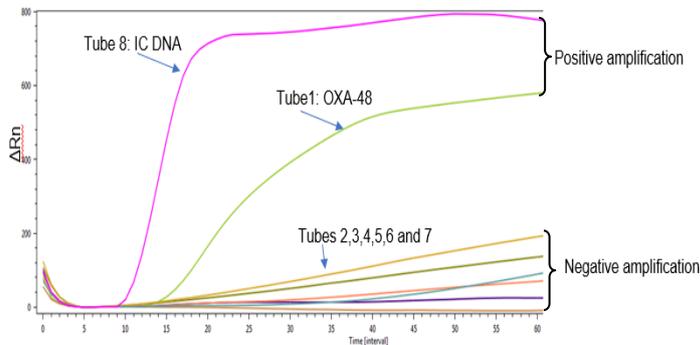
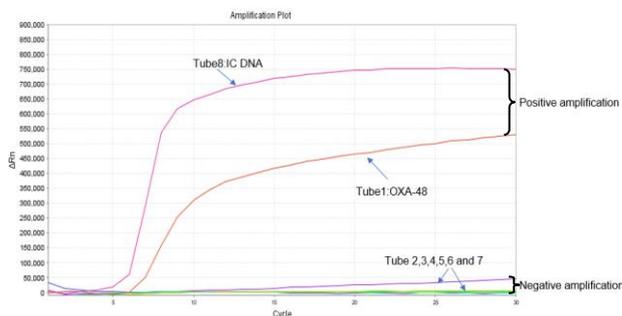


Figura 2: Gráfica de amplificación típica usando ABI 7500 FAST *Klebsiella pneumoniae* que contiene gen OXA48 testado usando el kit MAST ISOPLEX® CRE-ART.



### Características de funcionamiento

#### Trazabilidad y valores asignados a calibradores y materiales de control de veracidad

La Calibración, servicio y mantenimiento del equipamiento usado en MAST ISOPLEX® CRE-ART es realizado de acuerdo con las normativas locales y nacionales. Los controles de calidad de todos los componentes constituyentes son testeados y validados de acuerdo con las normativas locales y nacionales.

#### Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART fue determinada utilizando plásmido pEX-A218 con gen ADN objetivo insertado. Los test fueron realizados en 10-piegues en una serie de diluciones de ADN plásmido en un rango de 10pg a 0.001fg. Un total de 8 réplicas fueron realizadas para cada plásmido en cada rango de concentración y los datos analizados usando análisis Probit.

Tabla 7: Sensibilidad analítica (basada en plásmido que contiene la secuencia diana específica)

Gen objetivo	Valor Probit Femtogramos/ $\mu$ L (95% intervalo de confianza)	Valor Probit Número de copias de ADN/ $\mu$ L (95% intervalo de confianza)
OXA-48	0,13fg/ $\mu$ L (0,07 to 0,75)	44 copias/ $\mu$ L (22,5 to 244,2)
OXA-23	0,28 fg/ $\mu$ L (0,15 to 1,19)	92 copias/ $\mu$ L (49,7 to 386,7)
OXA-24/OXA-40	2,1 fg/ $\mu$ L (1,05 to 2,02)	683 copias/ $\mu$ L (344 to 6576)
KPC	0,1 fg/ $\mu$ L (0,05 to 0,58)	35 copias/ $\mu$ L (17,4 to 18,4)
VIM	0,1 fg/ $\mu$ L (0,05 to 0,62)	35 copias/ $\mu$ L (16,6 to 195,7)
NDM	0,2 fg/ $\mu$ L (0,08 to 1,36)	53 copias/ $\mu$ L (27,6 to 442,7)
IMP	2,7 fg/ $\mu$ L (1,12 to 27,8)	879 copias/ $\mu$ L (364,8 to 9035,3)

Tabla 8: Sensibilidad analítica (basada en Carbapenemasa produciendo cepas bacterianas)

Cepa	Identificador ACTC/ATCC	Familia de genes objetivo	Valor Probit cfu/μL (95% intervalo de confianza)
<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)

### Especificidad Analítica

MAST ISOPLEX<sup>®</sup> CRE-ART proporciona 100% especificidad analítica cuando se testea usando el plásmido objetivo específico usado en el test de sensibilidad analítica y que no reaccionó de forma cruzada con ninguna de las especies (con β-lactamasa conocida) listada (ver Tabla 9).

Tabla 9: Testeo de reacción cruzada

Especies	β-lactamasa conocida	Especies	β-lactamasa conocida
<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 no carbapenemasa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10662	No carbapenemasa	<i>Acinetobacter baumannii</i>	No carbapenemasa
<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		

## Precisión

La precisión del kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* ha sido determinada en términos de repetibilidad (variación dentro del lote usando un solo lote y seis test realizados en el mismo día, ver Tabla 10a y 10b) y reproducibilidad (variación entre lotes – tres lotes testeados, ver Tabla 11a y 11b).

Como LAMP no es un test cuantitativo, la medida de precisión no es una medida absoluta del test de rendimiento en términos de tiempo de positividad. Los datos generados muestran para repetitividad que el rango de desviación estándar es desde 0,35 a 1,94 para los distintos objetivos con rango de %CV desde 2,29 hasta 12,31; y reproducibilidad el rango de desviación estándar es de 0,21 a 3,02 y %CV de 2,1 a 17,96. Un valor de %CV <10 es considerado muy bueno, 10-20 es bueno, 20-30 es aceptable y >30 es considerado no aceptable, entonces los valores obtenidos son bueno.

Tabla 10a: Repetibilidad del kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* para objetivos específicos

Objetivo	Valor Ct medio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%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

Tabla 10b: Repetibilidad para el control de inhibición de ADN (ICDNA)

Objetivo	Valor Ct medio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%CV)
ICDNA	11,59	1,35	11,61

Tabla 11a: Reproducibilidad del kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART*

Objetivo	Valor Ct medio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%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

Tabla 11b Reproducibilidad del kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* para el control de inhibición de ADN (ICDNA)

Objetivo	Valor Ct medio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%CV)
ICDNA	10,63	0,27	2,52

## Características de funcionamiento del diagnóstico

Las características de funcionamiento del diagnóstico del kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* (ver Tabla 12a y 12b) fueron determinadas en 248 aislados clínicos, abarcando Enterobacteriales (n=203), *Acinetobacter* especies (n=37) y *Pseudomonas aeruginosa* (n=8). Aislados albergando carbapenemasas no marcadas como objetivo por el ensayo que no han sido detectadas son clasificadas como realmente negativos. La tarea fue realizada por el departamento de Microbiología, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust.

Tabla 12a: Detección de carbapenemasas en 248 bacterias gramnegativas con el kit MAST ISOPLEX® CRE-ART

Tipo de aislado/ gen objetivo	Cantidad testada	Cantidad detectada por el kit MAST ISOPLEX® CRE-ART
<b>Carbapenemasa Produciendo Enterobacteriales</b>		
KPC	16	16
VIM	13	13
IMP	12	12
OXA-48 like	61	61
NDM	52	52
NCM-A	1	0
<b>Carbapenemasa Produciendo <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>		
VIM	2	2
NDM	2	2
<b>Carbapenemasa Produciendo <i>Acinetobacter</i> species</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>Aislados sin carbapenemasa</b>	53	2

**Nota:** El kit MAST ISOPLEX® CRE-ART no marca como objetivo ADN de NCM-A, OXA-51-similares, OXA-58-similares u OXA-69-similares y los resultados del test realizado en estas cepas son considerados resultados realmente negativos.

Las características de funcionamiento del diagnóstico de los datos anteriores se muestran en la Tabla 12b.

Tabla 12b: Características de funcionamiento del diagnóstico del kit MAST ISOPLEX® CRE-ART

Características de diagnóstico	
Sensibilidad	100%
Especificidad	97%
Valor predictivo positivo	99%
Valor predictivo negativo	100%

### Intervalo de medición

MAST ISOPLEX® CRE-ART es un test cualitativo sin embargo, el kit ha sido testado con el propósito de determinar la sensibilidad analítica usando un rango de ADN objetivo específico entre 100fg y 1pg por reacción.

### Intervalo de referencia biológica

MAST ISOPLEX® CRE-ART es un test cualitativo y no cuantitativo con lo cual los intervalos de referencia biológica no son relevantes.

### Limitaciones del procedimiento de examen

- Los resultados obtenidos utilizando MAST ISOPLEX® CRE-ART no deberían usarse como único diagnóstico de una condición clínica sino para usarse junto con otros factores clínicos.
- El kit MAST ISOPLEX® CRE-ART está validado para testear un cultivo de colonia bacteriana aislada de un espécimen clínico.
- La cantidad de bacterias (ver paso 2 del Procedimiento de examen) inoculadas debe ser equivalente a ~0.2 McFarland, 10\*cfu/mL.
- El kit MAST ISOPLEX® CRE-ART ha sido validado con los equipos y medios microbiológicos listados en este documento. El uso de equipos alternativos o medios microbiológicos deben ser validados por el usuario final antes de su uso para diagnóstico.

5. La presencia de ADNasa y proteasa puede provocar resultados inválidos, el usuario debe asegurarse que los equipos y accesorios están libres de ADNasa.
6. Extremadamente altos niveles de ADN objetivo puede provocar un background alto y en consecuencia, un resultado falso negativo debido a que el ensayo de amplificación alcanza el máximo umbral del equipo. Seguir las instrucciones de uso, en particular la recolección de una pequeña cantidad de la colonia, debería prevenir este incidente.
7. La amplificación LAMP puede producir un resultado positivo de un nivel muy bajo de ADN objetivo sin embargo, por debajo de los límites de detección esto puede no ser reproducible. Seguir las instrucciones de uso, en particular la recolección de una pequeña cantidad de la colonia, debería prevenir este incidente.
8. El kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* está diseñado para amplificar específicamente ciertas clases y subgrupos de  $\beta$ -lactamasa. El test amplificará las clases/subgrupos identificados en la Tabla 13.

Tabla 13: Familia objetivo y miembros identificados por MAST ISOPLEX® *CRE-ART*

Target	Family members
<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. MAST ISOPLEX® *CRE-ART* puede no amplificar OXA-535, OXA-436, OXA-54, VIM-7, VIM 61, NDM-25 y NDM-26.
10. El usuario debe siempre referirse a la gráfica de amplificación (datos en bruto) generada durante el test para asegurarse de que un resultado positivo se debe a la amplificación de un objetivo específico y no una consecuencia del efecto rampa que puede apreciarse en equipos donde el umbral del background no puede ajustarse manualmente.
11. Cada tira CRE STRIP en el kit MAST ISOPLEX® *CRE-ART* es para ser usada en una sola muestra para testear. Para asegurar la validez de amplificación positiva el usuario debe realizar un control sin plantilla CRE STRIP y un control positivo CRE STRIP.

## Referencia bibliográfica

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