

Pruebas Multiplex LightMix® Modular Carbapenemasas

1. Uso previsto

Los productos enumerados en la sección 3 están destinados a ser utilizados para la identificación de portadores de enterobacterias resistentes a Colistina y Carbapenem (**CRE**), mediante el análisis de extractos de ácidos nucleicos obtenidos de heces, hisopos rectales o cultivos. Los productos pueden utilizarse para la detección de genes de resistencia simple o *multiplex*. Los resultados de las pruebas moleculares no deben ser la única base para cualquier decisión terapéutica.

2. Introducción

Este panel se centra en la detección de genes de carbapenemasas, una clase específica de resistencia a antibióticos de amplio espectro. Estas instrucciones describen el uso de los kits modulares LightMix® para la detección mediante PCR simple o *multiplex* de los respectivos genes de resistencia, utilizando los instrumentos Roche 480 (como se detalla en la sección 6).

Información general del kit modular LightMix® (ModularDx). Hasta seis canales se pueden utilizar para conseguir el máximo rendimiento, permitiendo la detección de cinco *targets* y un control en una sola reacción. El canal 660 (Cy5) está reservado para el control de reacción. El panel de prueba puede ser personalizado para las necesidades de pruebas de cada laboratorio; se pueden ejecutar ensayos individuales o los paneles pueden ser contruidos mediante la combinación, omisión o sustitución de los ensayos individuales. Además de la selección del *target*, el laboratorio puede optar por incluir un control interno, un control de extracción o un control Roche Process Control (RPC/DPC) para supervisar todo el proceso desde la extracción, transcripción inversa (cuando corresponda) hasta la amplificación, detección e interpretación del resultado.

3. Componentes de los kits modulares LightMix® e información para pedidos

Order no.	Roche no.	Nombre / Target	canal
50-0633-96	08074283001	VIM CE-IVD	500
53-0627-96	08074356 001	NDM CE-IVD	530
58-0628-96	08074321001	OXA-48 CE-IVD	580
58-0629-96	08074348001	OXA-23 CE-IVD	580
61-0626-96	08074372001	KPC CE-IVD	610
64-0631-96	08074429001	GES CE-IVD	640
64-0636-96	08063257001	MCR-1 Colistin CE-IVD	640
64-0636-96	08074399001	IMP CE-IVD	640
66-0901-96	07093802001	PhHV Control de extracción	660

4. Combinaciones de PCR Multiplex (ejemplos)

Carbapenemasas Multiplex PCR

La compensación de color 40-0320 es obligatoria para PCR Multiplex

500	530	580	610	640	660
VIM					Control: PhHV
VIM	NDM	OXA48	KPC	IMP	
VIM	NDM	OXA48	KPC	GES	
VIM	NDM	OXA48+23	KPC	IMP+GES	
VIM	NDM	OXA48+23	KPC	+ MCR-1	

480 II	z 480			
X	X	Duplex		
X		6plex		
X		6plex		
X		6plex		
X		6plex		

El analizador cobas z 480 no puede discriminar 500 y 530 como canales distintos; seleccione un kit o lea la información para ambos kits en el canal FAM (procedimiento no descrito en este manual).

5. Almacenamiento y estabilidad del Kit modular LightMix®

Los kits son transportados a temperatura ambiente (no en hielo). Los productos han sido evaluados para que sean estables aún después de tres días almacenados a a 45°C con una temperatura máxima de hasta 60°C (estudio de estabilidad de transporte en clima tropical).

A la llegada almacenar los kits completos a temperatura ambiente o refrigerados (4 a 25°C). **NO congelar los reactivos liofilizados.** Almacenar en la oscuridad. Los kits liofilizados son estables durante un año después de la producción. Consulte la fecha de vencimiento específica del lote.

Estabilidad tubos abiertos / Estabilidad

Una vez disueltos los controles positivos deben ser almacenados en el congelador (-15 a -25°C). **Registre la fecha del primer uso.**

Una vez disueltos los reactivos se pueden almacenar refrigerados para uso diario hasta 30 días, para almacenamientos de más tiempo, congelar a -15°C a -25°C hasta la fecha de caducidad. Evitar ciclos de congelado-descongelado (< 10 ciclos). **Registrar el uso.**

Para minimizar el potencial error asociado al uso de tubos marcados por sí mismo, se recomienda no alicuotar reactivos para almacenar en segundos viales.

6. Reactivos adicionales necesarios e información del instrumento

LightCycler® Multiplex DNA Master		Cat.-No. 07 339 585 001
Uracil-DNA Glycosylase (UNG)	(opcional)	Cat.-No. 03 539 806 001
LightCycler® 480 II Instrument		Cat.-No. 05 015 278 001
cobas z 480 Analyzer, UDF software 1.5		Cat.-No. 05 200 881 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 white or		Cat.-No. 04 729 692 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 white		Cat.-No. 04 729 749 001
Color Compensation Kit Hexaplex 40-0320-00		Cat.-No. 06 296 971 001
Bovine Serum Albumin (BSA) 20 µg/µl	(opcional)	Cat.-No. 10 711 454 001

7. Precauciones y advertencias

Requerimientos de manipulación

El producto es una herramienta de diagnóstico *in vitro* y por lo tanto debe ser utilizado únicamente por personal cualificado. Antes de utilizar este producto, lea las instrucciones del operador y de seguridad en el manual del operador del instrumento.

Son necesarias precauciones generales para el manejo de materiales genéricos de laboratorio.

El flujo de trabajo del laboratorio ha de ajustarse a las prácticas estándar. Debido al riesgo de contaminación, la preparación de la PCR y la amplificación de la PCR deben realizarse en zonas separadas físicamente.

No mezclar reactivos de lotes diferentes. No combinar otros ensayos fuera de los descritos en este manual.

No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad. Utilice la versión del manual suministrada con el kit (ver etiqueta del kit).

Procedimientos de laboratorio

Todos los materiales de origen humano y los residuos relacionados deben considerarse potencialmente infecciosos. Limpiar bien y tratar todas las superficies de trabajo con desinfectantes autorizados por las autoridades locales.

No comer, beber o fumar en el área de trabajo de laboratorio. No pipetear con la boca.

Usar guantes protectores desechables, batas de laboratorio y protección ocular adecuada durante la manipulación de las muestras y reactivos. Lavarse bien las manos después de manipular las muestras y reactivos.

Evitar la contaminación de los reactivos, microbiana o por nucleasas. El uso de puntas estériles desechables es esencial.

Manejo de desechos

Deseche los reactivos no utilizados e inactive los materiales de desecho de acuerdo con la legislación local vigente.

Lectura de resultados e informes

El uso de un archivo de compensación de color generado con el kit de compensación de color Hexaplex LightMix® es un requisito previo para realizar la interpretación de resultados de la reacción de PCR *múltiple*. La lectura de resultados incluye el uso general de un software que no ha sido específicamente adaptado para el análisis de estos ensayos. Los resultados "positivo" y "negativo" del software deben ser verificados por el operador para evitar informar resultados falsos.

Los resultados de las pruebas moleculares basados en el genoma indican la presencia de una resistencia. Los resultados de los análisis moleculares no deben ser la única base para una decisión terapéutica. La metodología de PCR es extremadamente sensible y puede reportar más resultados positivos que los métodos clásicos; Los valores de Cp pueden ser de ayuda para clasificar la importancia del gen de resistencia reportado, en particular donde hay múltiples resultados positivos. Los casos de contaminaciones pueden dar lugar a resultados falsos positivos.

8. Antecedentes

8.1. Antecedentes médicos

Los carbapenems (por ejemplo, Imipenem, Meropenem) pertenecen como las cefalosporinas y las penicilinas a los antibióticos β -lactámicos. Los carbapenémicos son uno de los últimos recursos de medicamentos para tratar infecciones bacterianas Gram negativas. Los hospitales son sitios comunes de transmisión para Enterobacterias resistentes a los Carbapenems (CRE). Como la mayoría de los genes de resistencia están codificados por plásmidos, la resistencia se está extendiendo rápidamente.

El número de casos está creciendo sistemáticamente. En Europa central y septentrional, la prevalencia sigue siendo baja, en Italia, Turquía y el Reino Unido son más altas (2011: <5%), seguidas por Israel (<10%) y mucho más altas en Grecia (<50%). En Alemania, la tasa de resistencia para Enterobacterias fue reportada en 2011 como <1%, para *A. baumannii* hasta 15% y para *P. aeruginosa* hasta 25%. En 2015 los genes de resistencia más frecuentes fueron OXA-48, seguidos de VIM, KPC y NDM. Algunos genes de resistencia se originan en India (NDM) o China (MCR); es de esperar que el número de casos aumente debido a los viajes y la migración internacional.

La prueba de resistencia clásica requiere cultivar la bacteria. El cribado basado en PCR puede realizarse directamente a partir de muestras de pacientes y es mucho más rápido, pero está limitado en genes particulares abordados por las pruebas.

En Alemania, se deben informar las bacterias resistentes a 4 clases de antibióticos (4MRGN). Las bacterias resistentes al carbapenem pertenecen más bien al 4MRGN, por lo que las pruebas de PCR son una herramienta poderosa para identificar portadores.

8.2. Metodología y Principios del Ensayo

Durante la etapa de extracción, todas las células y virus contenidos en las muestras son lisados. Los ácidos nucleicos genómicos (ARN y ADN) son extraídos y purificados para la detección utilizando Real-time PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los reactivos de los kits LightCycler® incorporan *dUTP* en los productos de PCR. La Uracil ADN glicosilasa se puede incorporar para evitar arrastrar contaminaciones.

Cada kit contiene *primers* diseñados para amplificar uno o más fragmentos cortos del respectivo gen de resistencia; este fragmento de PCR es detectado con una sonda de hidrólisis marcada en ambos extremos, la cual, es degradada por la polimerasa, emitiendo *una* señal luminosa la cual es detectada por el instrumento PCR. El número de ciclo (Cp) donde la señal excede el umbral de detección, es proporcional al logaritmo negativo de la cantidad de material de partida, lo que permite una estimación de la cantidad de *target* en la muestra.

La sonda de hidrólisis contiene una de las seis posibles etiquetas coloreadas (véase sección 3), lo que permite la detección de hasta seis reacciones *target* diferentes simultáneamente. Una reacción de control en el canal 660 se debe añadir a cada reacción multiplex, para monitorear la lisis (solamente control de proceso de Roche), extracción y amplificación.

8.3. Recogida de muestras y extracción de ácido nucleico

Recoger las muestras en contenedores limpios sin aditivos; las muestras no deben estar contaminadas con orina o papel higiénico. Las muestras de heces deben transportarse y almacenarse entre 4 -10 °C, pero no deben congelarse. Preparar suspensiones fecales al 10% (p/v) agregando (dependiendo de la consistencia) aproximadamente 50-100 mg o 100 μ l de muestra de heces a 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o buffer S.T.A.R. Almacenar las muestras residuales enfriadas a 4-10 °C para su confirmación por cultivo posterior o microscopía si la muestra tuvo un resultado positivo de PCR.

Homogenizar las suspensiones fecales agitando en vórtice durante 1 minuto, incubar a temperatura ambiente (opcional 95 °C) durante 10 minutos, y repita la agitación en vórtex. Centrifugar durante 30 segundos a 1,000 g y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Agregar el *target* de control de extracción (PhHV, no probado: EAV o Roche RPC) para un volumen final de muestra de 200 μ l en un cartucho de procesamiento MagNA Pure o (procedimiento alternativo) agregar el *target* de control al *buffer de lisis* y luego iniciar la extracción.

Pre-procesamiento de la muestra opcional (no requerido para pruebas CRE). Se ha publicado la ruptura física de las células con perlas o ciclos de congelación-descongelación (nitrógeno líquido, -80 °C, y calentamiento a 95 °C) para mejorar el rendimiento de la extracción, particularmente para la detección de parásitos o lombrices (huevos).

Los kits ModularDx han sido evaluados para su uso con ácido nucleico extraído en el instrumento Roche Diagnostics MagNA Pure 96, usando el '*DNA and Viral NA Small Volume Kit*', *Pathogen Universal* o *Viral NA Plasma SV protocol*, 200 μ l de entrada y 50 μ l/100 μ l de volumen de elución, siguiendo las instrucciones del instrumento MagNA Pure. Se espera que la extracción con el instrumento MagNA Pure 24 produzca resultados equivalentes.

Recomendación de Roche: para los extractos derivados de muestras de heces amplificadas con las mezclas Roche LC Multiplex Master, añada 0,2 μ g/ μ l (final) de albúmina de suero bovino (BSA) a la reacción de PCR (sección 13.3.3).

9. Información de Target - Especificidad analítica / Sensibilidad

9.1. VIM

El VIM (Verona Integron–encoded Metallo-β-lactamase) se encuentra en diferentes enterobacterias, p. Ej. *Citrobacter*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*. En España, Italia y Hungría, VIM es la MBL predominante. En Alemania, en 2015 VIM fue después de OXA la segunda carbapenemasa más frecuente; más del 90% de *P. aeruginosa* resistente portaba el gen VIM-2.

Un fragmento de 90 pb de longitud del gen blaVIM se amplifica con primers específicos y se detecta con una sonda de hidrólisis marcada con Cyan500

Especificidad: El kit detecta al menos las variantes 1-36 de VIM (análisis in silico). Otros genes de resistencia o patógenos que pueden estar presentes en los extractos de AN de muestras de heces no mostraron reactividad cruzada.

Sensibilidad: El límite de detección (LOD Probit-95) obtenido con muestras clínicas es de 10 copias por reacción. La sensibilidad en presencia de 100.000 copias de cualquier otro *target* (Cp = 24) de este panel es de al menos 10 copias.

9.2. NMD

El New Delhi Metallo-β-Lactamase (NDM), descrita por primera vez en 2008 en un paciente indio en el Reino Unido y extendida desde 2010 en todo el mundo, excepto en América del Sur (Johnson y Woodford, 2013). En Europa, NDM se encuentra más comúnmente en Rumania, Polonia y Dinamarca. Aproximadamente el 95% de todos los CRE en India son productores de NDM: el gen de resistencia se ha detectado incluso en el agua corriente del grifo. Un signo alarmante es la co-localización de NDM-9 y el gen de resistencia a la colistina *mcr-1* en China para las muestras de pollo (van Duin y Do, 2017). NDM se asocia principalmente con *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Un fragmento de 106 pb de longitud del gen blaNDM se amplifica con primers y se detecta con una sonda de hidrólisis de marca FAM.

Especificidad: Este kit detecta NDM-1 a NDM-13, NDM-16, NDM-17. Otros genes de resistencia o patógenos que pueden estar presentes en los extractos de NA de muestras de heces no mostraron reactividad cruzada.

Sensibilidad: El límite de detección (LOD con Probit-95) obtenido con muestras clínicas es de 2,5 copias / rxn.

9.3. OXA-48

Esta β-lactamasa de clase D 'hidrolizante de oxacilina' codificada por plásmidos proporciona resistencia contra oxacilina y otras penicilinas. OXA-48 está principalmente asociado con *Klebsiella*. OXA-48, descrita por primera vez en 2001 es hoy endémica en Turquía, con el 90% de toda la CRE de OXA-48. En Europa, España, Francia, Bélgica y Rumania se informa que han aumentado.

Un fragmento de 80 pb de longitud del gen blaOXA-48 se amplifica con primers específicos y se detecta con una sonda de hidrólisis marcada con R6G.

Especificidad: el ensayo detecta los miembros principales de OXA-48, en particular OXA-162, 163, 244, 245, 247 y 405 con una coincidencia de secuencia del 100% y 181/232 con emparejamientos erróneos (posiblemente con sensibilidad reducida - se probaron muestras de QCMD positivas). Otros genes de resistencia o patógenos que pueden estar presentes en los extractos de NA de muestras de heces no mostraron reactividad cruzada.

Sensibilidad: El límite de detección (LOD con Probit-95) obtenido con muestras clínicas es de 3,6 copias / reacción.

9.4. OXA-23

La β lactamasa clase D OXA-23 codificada por plásmido, descrita por primera vez en 1985 en el Reino Unido, proporciona resistencia contra la oxacilina y otras penicilinas. En Alemania, más del 90% de los *A.baumannii* resistentes portan el gen OXA-23.

Un fragmento de 80 pb de longitud del gen blaOXA-23 se amplifica con primers específicos y se detecta con una sonda de hidrólisis marcada con R6G.

Especificidad: Otros genes de resistencia o patógenos que pueden estar presentes en los extractos de NA de muestras de heces no mostraron reactividad cruzada.

Sensibilidad: El límite de detección (LOD con Probit-95) obtenido con muestras clínicas es de 6,6 copias / reacción

9.5. KPC

La *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC), codificada por plásmido, Clase A, reportado por primera vez en 2001 en EE.UU, tiene la distribución mundial más extensa de todas las carbapenemasas. En Europa, la incidencia más alta se encuentra en los países mediterráneos, en particular en Italia y Grecia.

Un fragmento de 122 pb de longitud del gen blaKPC (que abarca los tipos 1-11) se amplifica con primers específicos y se detecta con una sonda de hidrólisis marcada con LC610.

Especificidad: Otros genes de resistencia o patógenos que pueden estar presentes en los extractos de NA de muestras de heces no mostraron reactividad cruzada.

Sensibilidad: El límite de detección (LOD con Probit-95) obtenido con muestras clínicas es de 2,3 copias / reacción.

9.6. GES

La β -lactamasa *Guiana Extended Spectrum* (GES) codificada por plásmidos pertenece a las β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), ceftazidina-hidrolizante de clase A (menor medida). Descrita por primera vez en muestras de la Guayana Francesa en *P. aeruginosa*, hoy también se informa que está presente en *Klebsiella*. La prevalencia en Europa es actualmente baja.

Un fragmento de 107 pb de longitud del gen blaGES se amplifica con primers y se detecta con una sonda marcada con LC640.

Especificidad: el ensayo detecta GES 1-11 excepto GES-10. Otros genes de resistencia o patógenos que pueden estar presentes en los extractos de NA de muestras de heces no mostraron reactividad cruzada.

Sensibilidad. El límite de detección (LOD con Probit-95) obtenido con muestras clínicas es 1,6 copias / reacción.

9.7. IMP

IMP, metalo- β -lactamasas clase B, descrita por primera vez en 1998 en Japón, se encuentra en todo el mundo en *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae*.

Un fragmento de 85 pb de longitud del gen blaIMP se amplifica con primers y se detecta con una sonda marcada con LC640.

Especificidad: El kit detectará las variantes de IMP más descritas, pero puede pasar por alto algunos IMP-9,16,18 y 25. Otros genes de resistencia o patógenos que pueden estar presentes en los extractos de NA de muestras de heces no mostraron reactividad cruzada.

Sensibilidad. El límite de detección (LOD con Probit-95) obtenido con muestras clínicas es de 2,9 copias / reacción.

9.8. MCR-1

La enzima transferasa fosfoetanolamina MCR-1 codificada por el plásmido proporciona resistencia a colistina y se ha descrito en China y más recientemente en un paciente en EE. UU.

Un fragmento de 95 (64) pb de longitud del gen MCR-1 se amplifica con primers específicos y se detecta con una sonda de hidrólisis marcada con LC640 (canal 640).

Especificidad: Otros genes de resistencia o patógenos que pueden estar presentes en los extractos de NA de muestras de heces no mostraron reactividad cruzada.

Sensibilidad. El límite de detección (LOD con Probit-95) obtenido con muestras de control positivo diluidas en la muestra clínica es de 5,1 copias / reacción.

9.9. Resumen Especificidad analítica / Reactividad cruzada

Target / Patógeno	VIM	NDM	OXA23	OXA48	KPC	IMP	GES	MCR1
VIM	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
NDM	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
OXA-23	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
OXA-48	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
OXA-56	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
OXA-181	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
KPC	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
IMP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
GES	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
MCR-1	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
MCR-2	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
EHEC, EPEC, ETEC	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>C.difficile</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Yersina</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Campylobacter</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Shigella</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Salmonella</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Aeromonas</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

10. Especificación de la prueba-Certificado de análisis

La sensibilidad analítica se ha determinado para PCR simple y/o múltiplex. Cada lote se verifica para detectar al menos 10 copias *target* por 20 µl de reacción en una reacción de PCR simple (especificación del producto).

Niveles de señal específicos del lote (normalizados a la referencia interna del fabricante) y valores de Cp específicos del lote para cada cantidad de *target* (control positivo del plásmido) con valores de *cut-off* derivados del valor esperado para 2-5 copias, son impresas en el Certificado de análisis (CoA) del lote específico incluido con cada product.

11. Estudios de evaluación

11.1. VIM

En un estudio alemán de 60.000 muestras, la prevalencia fue de solo 0,05%, con una sensibilidad diagnóstica y especificidad del 100%, un VPN del 100% y un VPP del 83,9%. Los resultados negativos se pueden considerar como verdaderos.

En un segundo estudio que incluyó 1.035 muestras de pacientes, enriquecidas con 41 muestras CRE positivas con pruebas de resistencia en cultivo como el *gold standard*, 26 muestras (2,4%) se probaron con VIM positivo. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos fueron del 100%.

En el estudio de Oviaño et al. (2016), solo una de 127 muestras contenía el gen VIM, que estaba en concordancia del 100% con los resultados del GeneXpert Carba-R Kit.

Los paneles de anillos QCMD e INSTAND se probaron con una concordancia del 100%. Todos los participantes de la prueba de anillo INSTAND 2016 y 2017 RV544 informaron resultados 100% correctos.

11.2. NMD

En un estudio alemán que incluyó 60.000 muestras solo se detectaron dos casos. Dado que la PCR finalmente informa resultados que no se pueden verificar en cultivo, solo los resultados negativos deben considerarse verdaderos.

En un segundo estudio que incluyó 1.035 muestras de pacientes enriquecidas con 41 muestras positivas para CRE con pruebas de resistencia en cultivo como el estándar de oro, 5 muestras (0,5%) fueron analizadas con NDM positivo. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos fueron del 100%.

En el estudio de Oviaño et al. (2016), se identificaron correctamente 127 muestras de tres NDM contenidas; los resultados estuvieron en concordancia del 100% con el kit GeneXpert Carba-R.

Los paneles de anillo QCMD e INSTAND se probaron con una concordancia del 100%, incluidas las muestras doblemente positivas. Todos los participantes de la prueba de anillo INSTAND 2016 y 2017 RV544 reportaron resultados 100% correctos.

11.3. OXA-48 (OXA-48 like)

En un estudio alemán de 60.000 muestras, la prevalencia fue del 0,02% solamente, con una sensibilidad diagnóstica y especificidad del 100%, un VPN del 100% y un VPP del 93,3%. Los resultados negativos se pueden considerar como verdaderos.

En un segundo estudio que incluyó 1.035 muestras de pacientes enriquecidas con 41 muestras CRE-positivas con pruebas de resistencia en cultivo como estándar de oro, 16 muestras (1,5%) se analizaron con OXA-48 positivo. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos fueron del 100%.

En el estudio de Oviaño et al. (2016), se identificaron correctamente 127 muestras que contenían 28 OXA-48; los resultados estuvieron en concordancia del 100% con el kit GeneXpert Carba-R.

Los paneles de anillo QCMD e INSTAND se probaron con una concordancia del 100%, incluidas las muestras doblemente positivas. Todos los participantes de la prueba de anillo INSTAND 2016 y 2017 RV544 informaron resultados 100% correctos.

11.4. OXA-23

En un estudio que incluyó 1.035 muestras de pacientes enriquecidas con 41 muestras CRE-positivas con pruebas de resistencia en cultivo como estándar de oro, 6 muestras (0,6%) se analizaron con OXA-23 positivo. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos fueron del 100%.

OXA-23 no estaba contenido en los paneles anulares QCMD e INSTAND.

11.5. KPC

En un estudio alemán que incluyó 60.000 muestras, la prevalencia fue del 0,05%; la sensibilidad y la especificidad fueron del 100%, el VPN fue del 100% y el VPP fue del 79,1%. Los resultados negativos se pueden considerar como verdaderos.

En un segundo estudio que incluyó 1.035 muestras de pacientes enriquecidas con 41 muestras CRE-positivas con pruebas de resistencia en cultivo como estándar de oro, 6 muestras (0,6%) se analizaron con KPC-positivo. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos fueron del 100%.

Los paneles de anillo QCMD e INSTAND se probaron con una concordancia del 100%, incluidas las muestras doblemente positivas. Todos los participantes de la prueba de anillo INSTAND 2016 y 2017 RV544 reportaron resultados 100% correctos.

11.6. GES

En un estudio que incluyó 1.035 muestras de pacientes enriquecidas con 41 muestras CRE-positivas con pruebas de resistencia en cultivo como estándar de oro, 2 muestras (0,2%) se analizaron con GES positivo. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos fueron del 100%.

GES no estaba contenido en los paneles anulares QCMD e INSTAND.

11.7. IMP

En un estudio alemán que incluyó más de 60.000 muestras, no se observó ningún IMP positivo.

En un segundo estudio que incluyó 1.035 muestras de pacientes enriquecidas con 41 muestras CRE-positivas con pruebas de resistencia en cultivo como estándar de oro, 2 muestras (0,2%) fueron evaluadas como IMP-positivas. La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos fueron del 100%.

Los paneles de anillos QCMD e INSTAND se probaron con una concordancia del 100%. Todos los participantes de la prueba de anillo INSTAND 2016 y 2017 RV544 reportaron resultados 100% correctos.

11.8. MCR-1

El ensayo se evaluó con muestras *target* sintéticas.

MCR-1 no estaba en los paneles anulares QCMD e INSTAND.

12. Resumen de datos de evaluación

Canal	500	530	580	580
	VIM	NDM	OXA-48	OXA-23
LOD ^{simple} (copias/rx)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LOD ^{multiplex} (copias/rx)	10	2.5	3.6	6.6
95% CI	4.9-68.9	1.6-7.6	1.8-127	3.3-47.5
Especificidad	pasado	pasado	pasado	pasado
Diag. Sensibilidad	100%	100%	100%	100%
Diag. Especificidad	100%	100%	100%	100%
Prevalencia	0.05%	No observada	0.02%	No observada
VPP	100%	100%	93.1%	100%
VPN	100%	100%	100%	100%
Variación Intra Ensayo	0.17%	0.29%	0.08%	0.19%
Variación entre ensayos	0.19%	0.13%	0.14%	0.28%
Variación entre lote	0.88%	0.28%	0.31%	0.31%

n.d. = no determinado LOD valores para reacciones de 10µl con 5µl de muestra en placas de 384 pocillos estaban en el mismo rango.


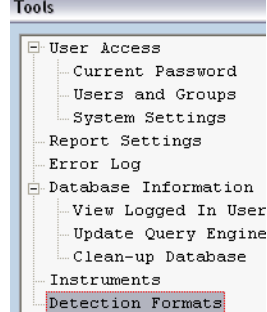
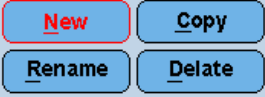
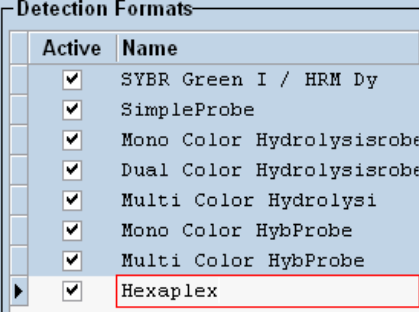
Canal	610	640	640	640
	KPC	GES	IMP	MCR-1
LOD ^{simple} (copias/rx)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LOD ^{multiplex} (copias/rx)	2.3	1.6	2.9	5.1
95% CI	0.9-2.9	1-24	1.1-4.8	1.8-220
Especificidad	pasado	pasado	pasado	pasado
Diag. Sensibilidad	100%	100%	100%	
Diag. Especificidad	100%	100%	100%	
Prevalencia	0.05%	No observada	No observada	No observada
VPP	79.1	100%	100%	
VPN	100%	100%	100%	
Variación Intra Ensayo	0.39%	0.21%	0.17%	0.27%
Variación entre ensayos	0.05%	0.24%	0.31%	0.34%
Variación entre lote	0.38%	0.37%	0.19%	0.26%

n.d. = no determinado LOD valores para reacciones de 10µl con 5µl de muestra en placas de 384 pocillos estaban en el mismo rango.

13. Instrucciones de uso.

Consulte el manual del operador del instrumento para más detalles. Comience a programar antes de preparar las soluciones.

13.1. Canales coloreados y compensación de color

1) Abrir herramientas	2) Seleccionar los formatos de detección	3) New	4) Nombre del set Hexaplex
			

Defina los filtros de Emisión y Excitación para los canales 500, 530, 580, 610, 640 y 660 (el canal 500 no está disponible para el analizador cobas z 480). Asegúrese de que haya disponible un archivo de compensación de color (cc) válido para la aplicación; vea el manual: **LightMix® 40-0320 Compensación de color universal Hexaplex** para obtener instrucciones detalladas sobre el rendimiento de los experimentos de cc. Establezca todos los parámetros como se describe a continuación:

Nombre	500	530	580	610	640	660
LightCycler® 480	450-500	483-533	523-568	558-610	558-640	615-670
LightCycler® 480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
cobas z 480	n.a.	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670
Quant Factor *	10	10	10	10	10	10
Max Integration Time*	1 sec	1 sec	1 sec	2 sec	3 sec	3 sec

*Se permite la adaptación de la configuración del instrumento (bajo la responsabilidad del operador).

13.2. Programación instrumentos Roche '480'

Para usar con los instrumentos Roche '480', software 1.5 y superior. Consulte el manual del operador del instrumento para más detalles. Programe el instrumento antes de la preparación de reactivos.

El protocolo consiste en tres pasos:

- 1: Desnaturalización de la muestra y activación de la enzima
- 2: Cycling: amplificada por PCR
- 3: Enfriamiento del instrumento.

Program Step:	UNG ¹	RT Step ²	Denaturation	Cycling			Cooling
Parameter							
Analysis Mode	None	None	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	1	45			1
Target [°C]	40	55	95	95	60	72	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	None	Single	None	None

¹opcional si se combina UNG ²opcional si se combina 1-Step RT-PCR.
 UNG y LC Multiplex RNA Virus Master no pueden combinarse en la misma reacción..

13.3. Protocolos experimentales

- **Material de muestra:** ácido nucleico extraído (por ejemplo, 'High Pure PCR Template Preparation Kit').
- **Controles positivos:** cada kit ModularDx se entrega con un único *target* de control positivo. Estos controles deben usarse solo en reacciones individuales. Las mezclas de controles no han sido probadas.
- **Controles premezclados:** alternativamente use el control positivo 90-0600 que contiene 2 viales, Mix I para los *targets* detectados en los canales 500, 580 y 640 y Mix II en los canales 530, 610 (660 opcional).
- **Controles Negativos:** Use una muestra negativa extraída que contenga el *target* de la reacción de control. Alternativamente, se puede usar como control negativo el PBS que contiene el *target* de control.

13.3.1. Preparación del reactivo de parámetro específico (PSR):

Agregue 50 µl de agua de grado PCR a cada vial de reactivo, mezcle la solución (vortex) y centrifugue. Para el pipeteo robótico, el volumen puede extenderse a 55 µl (las señales disminuirán en un 10-20%).

► Utilice 0,5 µl de reactivo por cada 20 µl de reacción.

13.3.2. Preparación del control Positivo

Utilice los controles premezclados, Mix I y II o controles positivos simples. Un vial de reactivo contiene 32 reacciones.

Agregue 160 µl de agua de grado PCR al vial con la tapa **negra**. Mezcle pipeteando 10 veces hacia arriba y hacia abajo: mezclar con vortex puede generar aerosol y causar contaminación.

► Utilice 5 µl de control positivo por cada 20 µl de reacción.

13.3.3. Preparación de la mezcla de reacción

La siguiente tabla describe la preparación de la *master mix* para reacciones dúplex a hexaplex de 20 µl de volumen total. Incluya un control positivo (para cada *target*) y al menos un "No Template Control" (NTC) en cada ejecución. La mezcla de controles premezclados I es negativa para los *targets* incluidos en la mezcla II y viceversa. En un tubo refrigerado, prepare la mezcla de reacción multiplicando los volúmenes de reacción individuales (columna izquierda) por el número de reacciones que incluyen los controles más una reacción adicional; el volumen mínimo de pipeteo recomendado es 1 µl; prepare un mínimo de 10 reacciones. Instrucciones para 96 placas en la columna derecha:

Una reacción	Tabla de opciones de pipeteado hasta Reacción Hexaplex	100 reacciones
6.1 µl	Agua, grado-PCR (tapa transparente, kit Roche)	610 µl
0.2 µl	BSA, solución 20 µg/µl (opcional) o Agua	20 µl
0.5 µl	Mezcla de control de reacción PhHV	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos (primers / sondas) primer ensayo target	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos segundo ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos tercer ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos cuarto ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos quinto ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos sexto ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos séptimo ensayo target o Agua	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos octavo ensayo target o Agua	50 µl
4.0 µl	Roche Multiplex Master (ver manual Roche)	400 µl
0.2 µl	UNG (para usar solo con DNA Master) o Agua	20 µl
15.0 µl	Volumen de la mezcla de reacción	1500 µl

Una reacción	Reacción Duplex Multiplex DNA Master (ejemplo)	100 reacciones
9.8 µl	Agua, grado-PCR (tapa transparente, kit Roche)	980 µl
0.2 µl	BSA, solución 20 µg/µl (opcional)	20 µl
0.5 µl	Mezcla de control de reacción PhHV	50 µl
0.5 µl	Mezcla de reactivos (primers / sondas) primer ensayo target	50 µl
4.0 µl	Roche Multiplex Master (ver manual Roche)	400 µl
15.0 µl	Volumen de la mezcla de reacción	1500 µl

Mezclar suavemente, centrifugar y transferir 15 µl de *mezcla master* por cada pocillo en una placa de PCR refrigerada (4 -10 °C).

Agregar 5 µl de muestra o control de ADN a cada pocillo. Sellar la placa y centrifugar. **Start run**

No tocar el film de cubierta sin guantes. Evitar tiempos de espera prolongados antes de iniciar la ejecución.

14. Lectura de los resultados

Realizar el análisis de datos como se describe en el manual del operador. Usar el método “*Second Derivative Maximum*” (Automated (F” max)). El número de ciclo del *Crossing Point* (Cp) de cada muestra se calcula de forma automática. El software del instrumento también informa tentativamente de resultados como **positivos (una curva roja en el gráfico de amplificación del software)**, **negativo (verde)**, o **incierto (azul)**. Repetir el análisis para cada canal de color utilizado: **(1)** Abrir un nuevo análisis, **(2)** Poner nombre al análisis después del canal y del *target*, **(3)** Aplicar el archivo de compensación de color, **(4)** Analizar y guardar.

Los ensayos son válidos si los resultados generados para todos los controles son correctos: Los **controles positivos** son positivos (dentro del rango del Cp), **Controles negativos** son negativos, y las **reacciones de control** (cuando corresponda) son positivas.

14.1. Reacción de control – Validación del ensayo

Iniciar el análisis desde el canal 660. Comprobar las curvas de amplificación y el rango de Cp.

Si las señales de la reacción de control no se observan, el ensayo no es válido y los resultados no se deben utilizar.

- Si se están usando los controles positivos premezclados y la PhHV, se debe observar una curva de amplificación para la mezcla II.
- Si se usan los controles positivos de un solo *target* y la PhHV, comprobar el control negativo extraído para la presencia de una curva de amplificación PhHV con un valor de Cp en el rango de 27-33.
- Si se está usando el Control de Procesos Roche, comprobar que la muestra negativa extraída que contiene el control de Roche muestra una curva de amplificación con un rango de Cp como se indica en el manual de Roche.

Nota: En caso de que el control negativo utilizado no contenga el *target* de control interno (no recomendado), cualquier señal en el canal 660 de las muestras (*target* negativo) se pueden usar para verificar la funcionalidad del control de reacción.

14.2. Resultados del gen de resistencia

14.2.1. Verificación de los resultados específicos de cada canal

Realizar análisis y revisar para cada canal utilizado, compruebe que el resultado de cada canal es válido:

- *Target* específico **Control negativo debe ser negativo**.
- *Target* específico **Control Positivo debe ser positivo** y dentro del rango del Cp registrado en la CoA.
- *Target* específico controles positivos para otros canales en uso deben ser negativos, lo que indica que la compensación de color está encendida y es funcional.

14.2.2. Resultados de muestras *target* positivo y *target* Negativo

Identifique las muestras como *target*-positivo, negativo (por debajo del límite de detección) o dudoso:

- Seleccione los resultados '**Positivos**'.
 - Identifique todas las muestras con una curva de amplificación con un valor de Cp dentro del límite definido de *cut-off*.
 - Identificar muestras denominadas erróneamente falsas-positivas mediante inspección visual y corregir; Se pueden generar las denominadas falsas-positivas como resultado de la interpretación incorrecta de las curvas debido a la línea base o señales residuales de otro canal que no se ha corregido con la compensación de color (verifique la positividad de la muestra en los canales paralelos).
 - Documente todas las muestras "**positivas**" e identifique muestras con resultados corregidos manualmente.
- Para muestras con resultados positivos altos (Cp <24) para un *target* y para muestras positivas con un resultado de control de reacción negativo; se recomienda repetir la prueba con todos los otros *targets* en ensayos individuales para minimizar el potencial de no detectar niveles bajos de *target* en muestras de infección mixta.
- Enumere todas las muestras con un valor Cp más alto que el límite como '**Dudoso**'.

El “*cut-off*” en el CoA se basa en el límite de detección establecido (LOD) de cada ensayo. El LOD describe la cantidad de *target* que se detectará de manera confiable en cada ejecución. Los resultados con un ciclo posterior son probablemente verdaderos resultados positivos, sin embargo, están fuera del rango de reporte. Se recomienda encarecidamente que se repita la prueba para muestras "**dudosas**", preferiblemente utilizando un nuevo extracto de la misma muestra o de una muestra recién recolectada. Si la inhibición no es un problema, use más muestra. Si la prueba no se repite, informe “**Límite por debajo de la detección**”.

- Seleccione los resultados “**Negativos**”.
- Inspeccione visualmente las curvas negativas, identifique cualquier curva de amplificación que se haya denominado falsamente negativa, corrija el resultado y marque las muestras donde los resultados se corrigieron manualmente. Las denominadas falsas-negativas son raras.
- Determinar los resultados de la muestra “**Negativa**” en relación con los resultados de la Reacción de Control (ver 14.2.3)

14.2.3. Determinar los verdaderos resultados "negativos"

- Identificar las muestras que son negativas para todos los canales de targets (curvas de amplificación no visibles).
- Comprobar que estas muestras tienen una curva de amplificación presente en la reacción de control (canal 660).
- Reportar las muestras "negativas" con un resultado positivo para la reacción de control como "**no detectable**" ("**target por debajo del límite de detección definido**") para el *target*.
- Reportar las muestras "negativas" con un resultado positivo para cualquier otro *target* como "**no detectable**".
- Reportar las muestras "negativas" con un resultado negativo para la reacción de control como "**inhibido / ha fallado para generar un resultado**" y solicitar una nueva muestra si es el caso.

14.2.4. Informe de muestras dudosas

Si repetidos los análisis de resultados para muestras "**dudosas**" no se logran resolver como "**positivas**" o "**no detectable**" deben ser reportados como "**potencialmente positivos, por debajo del límite de detección**".

Documentar todos los resultados corregidos manualmente e incluir la razón del ajuste.

14.2.5. Resultados de las muestras

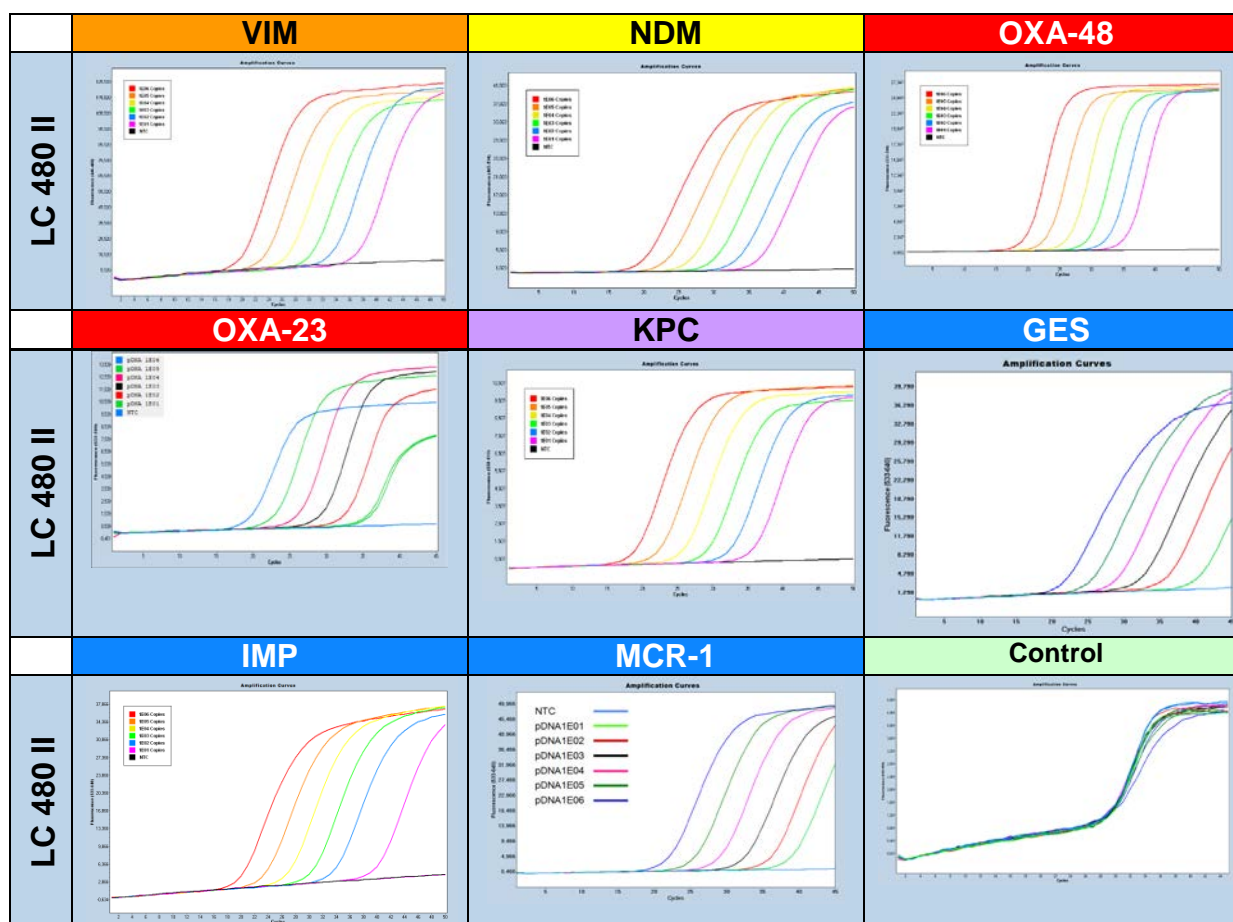


Fig.1. Resultados de la muestra obtenidos con diluciones estándar de plásmidos en un único experimento de PCR.

14.3. Interpretación de los resultados de las muestras:

La reacción de control (canal 660) debe estar en el rango en todos los pocillos (positivo o pasados), si la muestra negativa es inhibida: repetir el procesamiento de muestras desde la extracción. Cualquier NTC positivo en los canales target corresponde a una contaminación: NO reportar los resultados, repetir todo el ensayo de amplificación.

500	530	580	610	640	660 Control	500-640 NTCs	Resultados
negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	En rango (27-33)	negativo	Ninguno de los targets analizados detectables
Cp < corte	negativo	negativo	negativo	negativo	irrelevante*	negativo	VIM-positivo
negativo	Cp < corte	negativo	negativo	negativo	irrelevante*	negativo	NDM-positivo
negativo	negativo	Cp < corte	negativo	negativo	irrelevante*	negativo	OXA-positivo
negativo	negativo	negativo	Cp < corte	negativo	irrelevante*	negativo	KPC-positivo
negativo	negativo	negativo	negativo	Cp < corte	irrelevante*	negativo	IMP, GES, MCR-pos.
negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Fuera de rango	irrelevant	Inhibición/fallo Repetir
irrelevante	irrelevante	irrelevante	irrelevante	irrelevante	irrelevante	positivo	Contaminación Repetir

* * Muestras positivas altas podrían enmascarar la amplificación de la reacción de control y de otros targets presentes en la muestra. (ver 14.2.2).

15. Limitaciones del ensayo

Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional capacitado en conjunto con la historia clínica del paciente, los signos clínicos y síntomas y factores de riesgo epidemiológico. Aunque los resultados positivos bajos sugieren la presencia del organismo respectivo, este organismo puede no ser la causa de los síntomas clínicos. La interpretación de los resultados del ensayo debe tener en cuenta de la posibilidad de resultados falsos. Los resultados negativos no excluyen la presencia del respectivo *target*. Los resultados de las pruebas moleculares no deben ser la única base de un tratamiento del paciente/gestión o decisión de salud pública.

Pueden producirse resultados falsos positivos a partir de la contaminación cruzada por los organismos *target*, ácidos nucleicos o producto amplificado. La recolección, el almacenamiento o el transporte indebidos de las muestras pueden dar resultados falsos negativos. La falta de seguir los procedimientos del ensayo puede conducir a resultados falsos negativos. Inhibidores presentes en las muestras pueden conducir a resultados falsos negativos. Mutaciones potenciales dentro de las regiones *target* cubiertas por el primer y/o sondas de la prueba pueden resultar en una falla para detectar la presencia del patógeno

La prueba no es validada como una prueba cuantitativa para la monitorización del tratamiento.

16. Referencias

8.3

Handbook of Nucleic Acid Purification. Ed. Dongyou Liu (2009)

Utility of the MagNA Pure 96 System Roche MagNA Pure System Application Note No. 6 (2015)

Universal extraction method for gastrointestinal pathogens. Halstead et al., 2013

9.1

Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. Queenan and Bush. Clin. Microbiol. Rev (2007)
Epidemiologisches Bulletin 27. Juni 2016/Nr. 25, Robert-Koch-Institut

9.2

Development of TaqMan real-time polymerase chain reaction for the detection of the newly emerging form of carbapenem resistance gene in clinical isolates of *E. coli*, *Klebsiella pn.*, and *A. baumannii*. Manchanda et al., (2011)

Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. Johnson and Woodford, 2013

9.3

Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. Queenan and Bush. Clin. Microbiol. Rev (2007)
The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. van Duin and Do, 2017

9.4

Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. Queenan and Bush. Clin. Microbiol. Rev (2007)

9.5

Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. Queenan and Bush. Clin. Microbiol. Rev (2007)

Evaluation of a novel procedure for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) using the LightMix modular carbapenemase kits. Oviaño et al., 2016

Molecular detection of carbapenemase-producing genes in referral Enterobacteriaceae in South Africa: A short report. Perovic et al., 2016

9.6

9.7

17. Certificado de origen

El producto no es de origen humano, animal o vegetal. País de origen: Alemania

18. Datos de seguridad (MSDS)

El producto contiene:

99.8% de oligonucleótidos sintéticos (<100 microgramos)

0.1% CAS 77-86-1 Tris (hidroximetil) aminometano

0.1% CAS 60-00-4 ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

El Producto no es peligroso ni tóxico, y no presenta restricciones IATA

Según la directiva OSHA 29CFR1910.1200, Commonwealth of Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] y las directivas de la Unión Europea 67/548/EC y 1999/45/EC cualquiera de los productos que no contengan más del 1% de componentes clasificados como peligrosos o carcinogénicos no requieren una ficha de seguridad (MSDS).

Número de Arancel Aduanero (HS code) 2934 9990 o 3822 0000 (Kit)

19. Historial de versiones

Notas en **rojo**: eventos que requieren cambios en los procedimientos

V170717	Primera versión	2017-07-17

20. Fabricante y detalles de contacto

Reportar las observaciones, desviaciones y problemas del dispositivo IVD a service@tib-molbiol.de y a su representante local de Roche. Por favor informar los números de lote y una breve descripción.

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Germany
Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAX +49 78 79 94 99 | dna@tib-molbiol.de | WWW.TIB-MOLBIOL.COM
Geschäftsführer (CEO): Olfert Landt | Register HRB 93163 B | Registergericht Berlin Charlottenburg

Distributed by Roche - www.lifescience.roche.com



Notice to Purchaser – Patents and Trademarks

The purchase of the present product grants the right to use it in order to perform the amplification and detection of nucleic acid sequences for in-vitro diagnostic purpose on human origin samples. No other kind of license is transferred except the right to use the present product derived from its purchase. Other than expressly stated licenses, TIB MOLBIOL makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.

LIGHTMIX is a trademark of TIB MOLBIOL. LIGHTCYCLER, MAGNA PURE, HIGH PURE and COBAS Z are trademarks of Roche.
All other product names and trademarks are the property of their respective owners.