

Finalidade:

Teste rápido para a detecção da enzima MCR-1 em uma colônia bacteriana de cultura.

Registro ANVISA:

10097010-174

Apresentação:

646003 - NG-TEST MCR-1 -KIT 20T

LB 172312

Rev. 02 – 09/2024

1. INTRODUÇÃO

A presença de estirpes bacterianas multirresistentes Gram-negativas representa uma ameaça crescente e global. Estas constituem um aumento de infecções nosocomiais em meio hospitalar. A Polimixina E (colistina) é um antibiótico considerado como última linha de defesa contra infecções causadas por estirpes resistentes.

O aparecimento do gene MCR-1 (resistência à colistina mobilizada) no genoma de plasmídeos bacterianos coloca em questão o uso da colistina. Este gene foi descoberto pela primeira vez na China em 2011. E está presente até hoje em cerca de 18 países. A disseminação global é um desafio em termos de segurança sanitária. De fato, o gene MCR-1 que codifica a enzima MCR-1 confere resistência antimicrobiana à colistina. Permite a adição de um resíduo de fosfoetanolamina às bactérias de lipopolissacarídeos (LPS), afetando assim o seu mecanismo de funcionamento. Esta enzima de resistência a antibióticos coexiste entre outras, como as carbapenemases e as β -lactamases de espectro estendido, causando um problema difícil de prever.

2. COMPOSIÇÃO

Composição	Quantidade
Solução tampão de extração em frasco de 4,5 mL	1
Cassetes de teste em bolsas de alumínio com dessecante contendo tiras de nitrocelulose impregnadas com anticorpo monoclonal dirigido contra a enzima MCR-1	20
Pipetas descartáveis	20
Tubos <i>ependorf</i>	20

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho do produto.

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

- Colônias recém-obtidas de bacilos gram negativos, fermentadores e não fermentadores da glicose, provenientes de meios de isolamento adequados.
- As colônias a serem identificadas devem ser recentes (no máximo de 24h). Caso o teste tenha de ser protelado, deve-se proceder ao repique do material em meio apropriado e a uma nova incubação a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas, para então realizar a análise.
- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.
- Sempre considerar as necessidades específicas dos microrganismos alvo das análises, microrganismos com necessidades especiais (suplementos específicos ou ambiente controlados) podem não apresentar crescimento adequado se semeados em meio de cultura que não apresente os requisitos mínimos.
- Rejeitar as colônias provenientes de culturas com mais de 24 horas de semeadura.

Meios de cultura validados:

- Trypticase soja agar (TSA)
- Mueller Hinton agar (MH)

b- Precauções e cuidados especiais

- Produto destinado para uso diagnóstico *in vitro*;
- Manuseie todas as amostras como se fossem potencialmente infecciosas;

- Antes de descartar o material usado, invariavelmente, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Para acondicionamento do material usado, recomendamos o uso do Detrilab.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Princípio

O NG – Test MCR-1 é um imunoensaio rápido pronto a utilizar, para a detecção da enzima MCR-1 em uma colônia bacteriana recente, retirada de um ágar, após incubação *overnight* e processada em um tampão de extração.

O ensaio é realizado distribuindo a amostra no poço do cassete. A amostra migra em direção ao bloco conjugado e, se presente, as MCR-1 enzimas reagem com anticorpos monoclonais marcados de camundongo anti MCR-1. O complexo migra através da membrana de nitrocelulose por capilaridade e interage com os anticorpos monoclonais de camundongo anti MCR-1 imobilizados na membrana, na região de teste “T”.

A linha de controle “C”, é formada por estreptavidina marcada e anticorpos monoclonais que reagem com biotina-BSA e anticorpos policlonais de cabra anti camundongo imobilizados na membrana. Se a amostra for positiva para MCR-1, irá aparecer uma linha vermelha na região de teste “T” e na região de controle “C” da membrana. Caso contrário, apenas irá aparecer uma linha vermelha na região de controle “C”.

b- Armazenamento e estabilidade

- Os componentes do conjunto podem permanecer em temperatura de 4 a 30°C permanecendo estável até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação química, biológica ou umidade e mantidas nas suas embalagens individuais seladas.
- O produto não deve ser congelado.

c- Precauções e cuidados especiais

- O produto destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais de análises clínicas;
- O produto deve ser mantido na sua embalagem individual selada, até o momento da utilização;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não congelar;
- Não armazenar em temperaturas superiores a 30°C , pois temperaturas superiores podem alterar a sensibilidade do teste.
- Não inalar ou ingerir;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para “Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A” para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos Detrilab.
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Agitador tipo vórtex;
- Alça;
- Cronômetro;

- Luva.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- Aguardar que os reagentes e as amostras atinjam a temperatura ambiente, durante pelo menos 10 minutos;
- Adicionar 5 gotas (150 µL) do tampão de extração a um dos microtubos fornecidos no kit;
- Da cultura semeada em ágar, recolher uma colônia pura com a alça e suspender no microtubo com 150 µL do tampão de extração;
- Fechar o microtubo;
- Homogeneizar em vórtex antes de utilizar.
- Abrir a embalagem e retirar o conteúdo. Uma vez aberta, utilize o teste imediatamente.
- Utilizar a pipeta fornecida, adicionar 100 µL da mistura preparada (a amostra deve atingir a linha preta indicada na pipeta, para aspirar 100 µL de forma precisa) no poço de amostra com "S".
- Realizar a leitura dos resultados em 15 minutos.

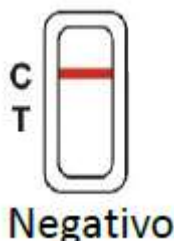
NOTA: Não interpretar os resultados do teste após 20 minutos, uma vez que estes podem possivelmente variar e causar resultados falsos positivos.

i- Interpretar conforme indicado abaixo.

7. RESULTADOS

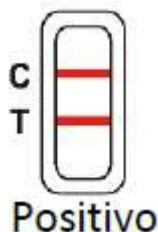
Resultado Negativo:

Caso apareça apenas uma linha vermelha na região do controle (C): a amostra não contém a enzima MCR-1 ou nível não detectável desta e deve ser interpretado como um resultado negativo.



Resultado Positivo:

Caso apareça m duas linhas vermelhas: uma na região do controle (C) e outra na região do teste (T): a amostra contém a enzima MCR-1 e deve ser interpretada como um resultado positivo.



NOTA: a intensidade da linha de teste vermelha pode variar, dependendo da concentração do nível da enzima MCR-1 presente na amostra. Uma linha fraca deve ser considerada com um resultado positivo.

Resultado Inválido:

Caso não apareça uma linha de controle (C), o resultado do teste é inválido. Um volume de amostra insuficiente ou um procedimento incorreto são as razões mais prováveis para a falha na linha de controle. Pode ter ocorrido uma deterioração do kit do teste. Deve-se repetir o procedimento. Caso o problema persista, não reutilizar o kit e contatar o fabricante.



8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

- Não considerar nenhum resultado obtido após os 20 minutos, pois eventualmente podem ser detectados resultados falso-positivos.
- Este é um ensaio qualitativo, portanto não pode gerar um resultado quantitativo.
- Este teste deve ser utilizado como um auxiliar para a detecção rápida de pacientes com uma resistência ao antibiótico colistina.
- Os resultados obtidos devem ser confirmados com metodologias alternativas ou complementares.
- Um resultado positivo ou negativo não exclui a presença de outros mecanismos de resistência a antibióticos.

9. CONTROLE DA QUALIDADE

Por se tratar de uma prova imunocromatográfica, a certeza de que a tira está apresentando pleno funcionamento é obtida pela verificação do desenvolvimento da linha de controle. Os surgimentos de resultados falsos negativos ou falsos positivos estão correlacionados com fatores diversos ligados a limitação da metodologia.

- Periodicidade

A cada novo lote de reagentes e em períodos determinados pelo próprio laboratório, testar o material com as amostras de referência.

- Interpretação e avaliação

A função do controle de qualidade é verificar que os materiais empregados na técnica forneçam os resultados esperados e apresentem desempenho compatível com o esperado. Resultados anormais devem ser verificados, e enquanto a verificação é feita, o produto não deverá ser utilizado e os resultados não poderão ser validados.

- Limites de detecção

O limite de detecção foi determinado utilizando uma enzima MCR-1 recombinante purificada e avaliada a 300 pg/mL.

- Validação em um banco de cepas de referência:

O NG-Test MCR-1 foi avaliado em 44 cepas clínicas de NRC Kremlin Bicêtre Paris (Centro de Referência Nacional), 123 cepas clínicas na ANSES (Agência Nacional de Segurança em Saúde) Lyon e 117 cepas clínicas no NRC Clermont Ferrand.

- Reatividade Cruzada

Todos os resultados cruzados foram correlacionados com o genótipo das cepas determinadas pela análise de PCR. O NG-Test MCR-1 detecta algumas variantes do MCR-2.

Tabela 1: Resultados obtidos no NRC Kremlin Bicêtre

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	25	0	25
NEGATIVO	3 (MCR-2)	16	19
TOTAL	28 (3 MCR- 2 detectados)	16	44

Sensibilidade: 100% Intervalo de confiança 95%: 86,7% a 100%.

Especificidade: 81,25% Intervalo de confiança 95%: 62,4% a 94,5%

Tabela 2: Resultados obtidos no NRC Clermont-Ferrand

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	17	0	17
NEGATIVO	0	100	100
TOTAL	17	100	117

Sensibilidade: 100% Intervalo de confiança 95%: 81,6% a 100%.

Especificidade: 100% Intervalo de confiança 95%: 96,3% a 100%

Tabela 3: Resultados obtidos na ANSES Lyon

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	59	0	59
NEGATIVO	0	64	64

TOTAL	59	64	123
-------	----	----	-----

Sensibilidade: 100% Intervalo de confiança 95%: 93,9% a 100%.
Especificidade: 100% Intervalo de confiança 95%: 94,3% a 100%

Tabela 4: Resultados gerais obtidos nos três locais para o MCR-1

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	101	0	101
NEGATIVO	3 (MCR-2)	180	183
TOTAL	104	180	284

Sensibilidade: 100% Intervalo de confiança 95%: 96,3% a 100%.
Especificidade: 98,3% Intervalo de confiança 95%: 95,3% a 99,4%

10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- Os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;

Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

11. REFERÊNCIAS

- Centers for Disease Control and Prevention. Newly Reported Gene, MCR-1, Threatens Last-Resort Antibiotics. Antibiotic/Antimicrobial Resistance: AR Solutions in Action., 2016.
- Gao R et al. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. PLoS Pathogens, 2016.
- Hu Y et al. Dissemination of the MCR-1 colistin resistance gene. Lancet Infect. Dis. 2016
- Liu YY et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect. Dis. 2016.
- Paterson DL et al. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. Lancet Infect Dis. 2016
- Ye H et al. Diversified MCR-1-harboring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. MBio, 2016

Fabricado por:



NG-Biotech

Z.A. Courbouton, Secteur 1, 35480 Guipry, France.

Importado e distribuído por:



Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

CNPJ 76.619.113/0001-31

Insc. Estadual 1370012926

Rua Casimiro de Abreu, 521

Pinhais/PR CEP 83.321-210

Telefone (41) 3661-9000

www.laborclin.com.br

Responsável Técnico:

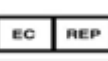
Maire Wakamori – CRF/PR-20176

Serviço de Assessoria ao Cliente

SAC 0800-0410027

sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico in vitro.
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)