

## Finalidade:

Kit para preparação de amostra a partir de uma cultura de sangue positiva, a ser inoculada em teste rápido para a detecção de carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP.

## Registro ANVISA:

10097010-171

## Apresentação:

646004 - NG-TEST BLOOD CULTURE PREP – KIT 20T

LB 172316  
Rev. 02 – 09/2024

## 1. INTRODUÇÃO

O sangue humano circulante é estéril, mas no transcorrer de algumas doenças infecciosas, eventualmente, o sangue pode ser invadido por microrganismos. Uma invasão passageira da corrente sanguínea é denominada bacteremia, ao passo que, a situação em que o microrganismo além de invadir se multiplica na corrente circulatória denomina-se septicemia. As causas de bacteremia ou septicemia são variáveis. O sistema automatizado fornece condições nutricionais e ambientais adequadas para detecção de microrganismos comumente encontrados em infecções do sangue e de líquidos estéreis. Os frascos são inoculados e inseridos no equipamento que os monitora continuamente.

A realização da hemocultura automatizada é importante principalmente em casos graves onde há persistência de febre, sinais hematológicos e/ou clínicos de infecção, porém, com resultados de exames microbiológicos tradicionais inconclusivos. Sabe-se que a partir do sangue, um microrganismo pode se difundir para qualquer sítio do hospedeiro, produzindo o que se chama de focos infecciosos, cuja ocorrência contribui para agravar o quadro clínico, sendo frequentemente a causa de óbitos.

A verificação de hemoculturas positivas e a identificação rápida de enzimas multirresistentes como as carbapenemases presentes nestas amostras são de suma importância para melhorar a conduta terapêutica do paciente, como também o controle da propagação desta resistência aos antibióticos nos hospitais.

Os  $\beta$ -lactâmicos são antibióticos de primeira linha para o tratamento de infecções causadas por *Enterobacterales*. Contudo, desde o início da sua utilização maciça nos anos 40, a sua eficácia tem vindo a ser desafiada pela produção de enzimas que os inativam: as  $\beta$ -lactamases. Dentre essas, as carbapenemases são capazes de hidrolisar os antibióticos carbapenêmicos.

Antes dos anos 90, a maior parte de resistências a antibióticos eram associadas à produção de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL), que pertencem às classes A, B, C e D da classificação de Ambler. Mais tarde, os estudos demonstraram um aumento de carbapenemases nas *Enterobacterales*.

Dentre essas carbapenemases, a  $\beta$ -lactamase KPC (classe A) espalhou-se pelo mundo na década de 2000. Depois disto, também se tem observado a expansão das metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) do tipo IMP, VIM e NDM (Classe B), bem como das OXA-48 (Classe D). Estas são principalmente detectadas em hospitais e são responsáveis pela maior parte das infecções nosocomiais e causam um grande problema em termos de saúde global, especialmente pelo fato da sua presença ser difícil de detectar.

## 2. COMPOSIÇÃO

Composição	Quantidade
Solução tampão de lise em frasco plástico identificado R1 com tampa vermelha com 25 mL (volume suficiente para 20 testes)	1
Solução tampão de lavagem em frasco plástico identificado R2 com tampa branca com 25 mL (volume suficiente para 20 testes)	1

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

## 3. AMOSTRA

### a- Tipos de amostras

As amostras requeridas são sangue periférico, transferidas imediatamente para o frasco de hemocultura após sua coleta.

### - Preparo do paciente

Apesar de ser um exame relativamente de urgência, é importante coletar as amostras antes do início de qualquer terapia antimicrobiana, ou a critério médico.

O uso de antitérmicos não interferem no resultado da análise.

A correta assepsia do sítio de punção é determinante para o resultado.

Na suspeita de infecção de corrente sanguínea relacionada a cateter central, podem ser coletados três de pares frascos de amostras periféricas e ser executada cultura da ponta de cateter. Quando se optar pela permanência do cateter pode ser coletada uma amostra, ou quantidade à critério médico, de hemocultura do cateter e duas amostras periféricas.

Deve-se ter total atenção as amostras coletadas de dispositivos médicos de infusão, devido ao alto índice de contaminação destes, a orientação é de coletar amostras de dispositivos de infusão apenas se houver suspeita de que o foco da infecção parta deste. Coletas de amostras durante o pico febril não trazem benefícios a recuperação de microrganismos e devem ser evitadas, salvo por orientação médica.

Para pacientes em antibioticoterapia, recomenda-se a execução do processo de coleta no minuto anterior a aplicação da próxima dose.

A coleta de sangue arterial não está associada com aumento da sensibilidade ou especificidade e não é recomendada devido a presença de grande volume de oxigênio, e outros gases, e pelo maior número de reações metabólicas, se comparado ao sangue periférico, salvo sob orientação médica.

Amostras apresentando coágulos devem ser descartadas, existe a possibilidade de retenção de micro-organismos.

Não se observa alterações na capacidade de recuperação de microrganismos em amostras com as seguintes alterações:

- Bilirrubina: > 20 mg/dL

- Hemoglobina: > 10 g/L

- Lipídeos: > 10 g/L

Para casos em que ocorram valores superiores aos informados, sugere-se atenção especial ao processo e, se clinicamente possível, obtenção de nova amostra evitando hemólise durante o processo de coleta ou submetendo o paciente a um jejum prolongado, por exemplo.

- 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.

### 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

Em uma prática clínica, as hemoculturas são realizadas quando há uma razão clínica para suspeitar de septicemia. O sangue é coletado e analisado antes da administração de antibióticos. Os frascos de hemocultura são incubados em um sistema de detecção automática que sinaliza a presença de bactérias, leveduras ou fungos em uma amostra.

O NG - Test Blood Culture Prepkít faz a sondagem dos glóbulos vermelhos e lava o sedimento bacteriano de amostras positivas de hemocultura. O extrato bacteriano resultante é adequado para análise usando o kit NG-Test Carba 5.

São imobilizados anticorpos monoclonais de ratos dirigidos contra KPC (K), OXA (O), VIM (V), IMP (I), e NDM (N) em zonas de teste de membrana de nitrocelulose designadas por K, O, V, I, e N.

Este ensaio é realizado ao inocular uma amostra no poço do cassete. A amostra migra através do bloco conjugado e caso estejam presentes, as carbapenemases reagem com os anticorpos monoclonais anti-carbapenemases marcados. O complexo migra através da membrana de nitrocelulose via capilaridade e interage com os anticorpos monoclonais anti-carbapenemases correspondentes, imobilizados na membrana.

A linha de controle C, é formada por estreptavidina marcada e anticorpos monoclonais arcados que reagem com biotina-BSA e anticorpos policlonais de cabra e anti-rato, imobilizados na membrana. Caso a amostra seja positiva para uma ou para várias carbapenemases, irá aparecer uma linha vermelha na(s) zona(s) de teste e na zona controle da membrana. Caso contrário, apenas irá aparecer uma linha vermelha na zona de controle.

##### b- Armazenamento e estabilidade

- Os componentes do conjunto podem permanecer em temperatura de 20 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 ;
- Centrifuga com rotores de tubos *ependorf*, velocidade 15.000 rpm (cerca de 20.000g);
- Cronômetro;
- Equipamento automatizado para hemocultura;
- Frascos de hemocultura;
- Kit NG-Test Carba 5 (código 646001);

- Pipeta.

#### 6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

a- Misturar 1 mL de hemocultura positiva com 1 mL de solução tampão de lise (frasco identificado R1 com tampa vermelha) em um microtubo.

NOTA: Os microtubos são fornecidos no kit NG-Test Carba 5.

b- Agitar em vórtex por 20 segundos ou misture por inversão o tubo pelo menos 5 vezes.

d- Centrifugar por 1 minuto em 15.000 rpm (~ 20.000 g). Descartar cuidadosamente o sobrenadante por pipetagem. Certifique-se de ter removido completamente o sobrenadante.

e- Ressuspender o sedimento em 1 mL de solução tampão de lavagem (frasco identificado R2 com tampa branca).

f- Agitar em vórtex por 20 segundos.

g- Centrifugar por 1 minuto a 15.000 rpm (~ 20.000 g). Descartar completamente o sobrenadante com a pipeta.

f- Ressuspender o sedimento em 5 gotas (150 µL) de tampão de extração (fornecido no kit NG-Carba Test 5)

g- Executar o teste NG-Test Carba 5 de acordo com as instruções do kit (comercializado separadamente).

Instruções para: 646001- NG-TEST CARBA 5 – KIT 20T:

#### 6.1 PROCEDIMENTO OPERACIONAL – REALIZAÇÃO DO TESTE

a- Aguardar que os reagentes e as amostras atinjam a temperatura ambiente, durante pelo menos 10 minutos;

b- Adicionar 5 gotas (150 µL) do tampão de extração a um dos microtubos fornecidos no kit;

c- Fechar o microtubo;

d- Homogeneizar em vórtex antes de utilizar.

e- Abrir a embalagem e retirar o conteúdo. Uma vez aberta, utilize o teste imediatamente.

f- 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".

g- 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.

h- Interpretar conforme indicado abaixo.

#### 7. RESULTADOS

##### Resultado Negativo:

Caso apareça apenas uma linha vermelha na região do controle (C); a amostra não contém nenhuma carbapenemase ou estas existem em um nível não detectável e este deve ser interpretado como um resultado negativo.



Negativo

##### Resultado Positivo:

Caso apareça uma linha vermelha na região do controle (C) e uma ou várias nas regiões de teste K, O, V, I e N: a amostra contém uma ou várias carbapenemases e este deve ser interpretado como um resultado positivo.

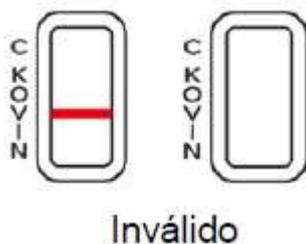


VIM  
Positivo

NOTA: a intensidade da linha de teste vermelha pode variar, dependendo da concentração das carbapenemases presentes 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 de primeira linha permite uma estratificação rápida dos pacientes.
- 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.
- No caso de culturas mistas, a prática comum é subcultivar cada amostra de hemocultura em uma placa de ágar individualmente e usar o kit NG-Test Carba 5, em colônias bacterianas.

## 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 com o uso de enzimas recombinantes purificadas:

- KPC 600 pg/mL
- OXA 300 pg/mL
- VIM 300 pg/mL
- IMP 200 pg/mL
- NDM 150 pg/mL

#### - Avaliação clínica

O NG-Test Carba 5 foi avaliado no NRC (National Reference Center for Antibiotic Resistance), durante um estudo prospectivo. Foi realizado um teste cego com 116 estirpes e os resultados foram comparados com o teste de sequenciamento PCR. Um isolado

produtor de IMI foi excluído de análise de resultados porque este tipo de não faz parte do uso pretendido do teste em questão.

Método	PCR			
	Positivo	Negativo	Total	
NG-Test CARBA 5	Positivo	70	0	70
	Negativo	0	45	45
	Total	70	45	115

Sensibilidade	100%	IC 95% = 93,5 - 100%
Especificidade	100%	IC 95% = 90,4 – 100%

#### Especificidade analítica:

Foi realizada uma avaliação retrospectiva na NRC com 180 isolados caracterizados por PCR, e tal permitiu identificar variantes detectadas pelo NG – Test CARBA 5:

- Tipo NDM: NDM-1-4-5-6-7-9
- Tipo KPC: KPC -2-3
- Tipo IMP: IMP -1-8-11
- Tipo VIM: VIM -1-2-4-19
- Tipo OXA-48: OXA-48-162-181-204-232-244-517-519-535.

Não carbapenemases (atividade cruzada): OXA-163 e OXA-405 (oxacilinases de largo espectro do tipo OXA-48 com uma atividade carbapenemase muito fraca).

## 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](http://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](mailto: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

1. Boutal H. et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother, 2018.
2. Bush K et al. Update Functional Classification of  $\beta$ -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010.
3. Demir Y et al, Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC and OXA-48 enzymes in Enterobacteriaceae strains. Pak J Pharm Sci, 2015.
4. Kulkarni MV et al. Use of imipenem to detect KPC, NDM, OXA, IMP, and VIM carbapenemase activity from gram-negative rods in 75 minutes using liquid chromatography –tandem mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2014.
5. Nordmann P et al. Carbapenemases in Enterobacteriaceae. Archives de Pédiatrie. 2010.
6. Nordmann P et al. Rapid Detection of Carbapenemase – producing Enterobacteriaceae. Emerging Infectious Diseases. 2012.
7. Oteo J et al. Evolution of carbapenemase – producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future? Enferm Infect Microbiol Clin. 2014.
8. Yohei D et al. Carbapenemase – Producing Enterobacteriaceae. Semir Resp. Crit. Care Med. 2015.

Fabricado por:



NG-Biotech  
Z.A. Courbouton, Secteur 1, 35480 Guipry, France.

Importado e distribuído por:



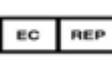
**Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda**

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](http://www.laborclin.com.br)

**Responsável Técnico:**

Maire Wakamori – CRF/PR-20176  
Serviço de Assessoria ao Cliente  
SAC 0800-0410027  
[sac@laborclin.com.br](mailto: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 <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	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)