

Finalidade:

Teste rápido para a detecção de β -lactamases CTX-M do grupo 1 a partir de colônias bacterianas obtidas de cultura.

Registro ANVISA:

10097010-173

Apresentação:

646005 – NG-TEST CTX-M – KIT 20T

LB 172317

Rev. 02 – 09/2024

1. INTRODUÇÃO

Os β -lactâmicos são antibióticos de primeira linha para o tratamento de infecções causadas por *Enterobacterales*. No entanto, desde o início de seu uso em massa na década de 1940, a eficácia tem sido desafiada pela produção de enzimas que os inativam: as β -lactamases. Entre elas, as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) hidrolisam a maioria dos β -lactâmicos poupando apenas as cefamínas (como cefoxitina) e carbapenêmicos.

A epidemiologia de ESBLs entre *Enterobacterales* mudou recentemente com a disseminação difundida de enzimas do tipo CTX-M. Na década 1990, as principais ESBLs foram derivadas de enzimas do tipo TEM e SHV e, principalmente, difundidas dentro de clones hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacterales*. A difusão das CTX-Ms nas espécies de *Escherichia coli* mudou esta situação. Em qualquer lugar do mundo, a CTX-Ms representa a maioria das ESBLs, a ponto de sua difusão ser qualificada como pandêmica. Eles estão igualmente isolados em ambientes comunitários e hospitalares e parecem ser endêmicos em instituições de cuidados de longo prazo. A crescente prevalência de EBLs no ambiente da comunidade cria um problema sem precedentes: o influxo de bactérias multirresistentes da comunidade que vão para o ambiente hospitalar. E isso é ainda mais complicado de prever, já que os fatores de risco em relação ao TEM e SHV tipo EBL são os pouco efetivos para prever CTX-Ms.

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 CTX-M	20
Pipetas descartáveis	20
Tubos eppendorf	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 CTX-M é um imunoensaio rápido pronto para uso, para a detecção de β -lactamase de CTX-M do grupo 1 em uma colônia bacteriana recente, retirada de um ágar semissólido, 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 enzimas CTX-M reagem com anticorpos monoclonais marcados de anti-CTX-M de camundongos marcados. O complexo migra através da membrana de nitrocelulose por capilaridade e interage com os anticorpos monoclonais de camundongo anti CTX-M 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 CTX-M dos grupos 1, 2, 8, 9 ou 25 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;
- Luvas.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

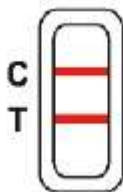
- Aguardar que os reagentes e as amostras atinjam a temperatura ambiente, durante pelo menos 10 minutos;
 - Adicionar 5 gotas (150 µL) do tampão de extração a um dos microtubos fornecidos no kit;
 - Da cultura semeada em ágar semi-sólido, recolher uma colônia pura com a alça e suspender no microtubo 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 10 minutos.
- NOTA: Não interpretar os resultados do teste após 20 minutos, uma vez que estes podem possivelmente variar e causar resultados falsos positivos.
- 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 CTX-M ou nível não detectável desta e deve ser interpretado como um resultado negativo.

**Resultado Positivo:**

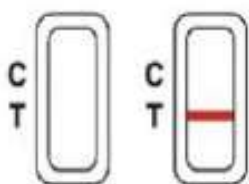
Caso apareça duas linhas vermelhas: uma na região do controle (C) e outra na região do teste (T): a amostra contém a enzima CTX-M e deve ser interpretada como um resultado positivo.

**Observação:**

A intensidade da linha de teste vermelha pode variar, dependendo da concentração do nível da enzima CTX-M 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 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.

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 a enzima CTX-M-15 recombinante purificada e avaliada a 200 pg / mL.

O NG-Test CTX-M detecta pelo menos as seguintes variantes do grupo 1:

CTX-M-1, 3,15, 32, 37, 55, 57, 71, 82, 101 e 182.

- Estudo de avaliação

O NG-Test CTX-M MULTI foi avaliado em 175 isolados (PCR caracterizado por conteúdo ESBL) no NRC (Centro Nacional de Referência Nacional AMR) do CHU Kremlin Bicêtre Paris-France.

Tabela 1: Resultados obtidos no NRC Kremlin Bicêtre

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	70	0	70
NEGATIVO	0	105	105
TOTAL	70	105	175

Sensibilidade: 100% Intervalo de confiança 94,8% a 100%.

Especificidade: 100% Intervalo de confiança 96,5% a 100%.

Tabela 2: Resultados obtidos no NRC Kremlin Bicêtre

175 cepas	70 cepas positivas testadas com NG-Test CTX-M	66 cepas carregando CTX-M-15
		4 cepas carregando variantes de CTX-M (CTX-M-1 e CTX-M-3).
	105 cepas negativas testadas com NG-Test CTX-M	98 cepas carregando carbapenemases (SHV-11, DHA-1, ACC-1, DHA-2, VEB-1, OXA-163, OXA-405, OXA-9, KPC-2, KPC-3, TEM-1, IMI-1, IMI-2, etc).
		7 cepas carregando variantes de CTX-M (CTX-M-14, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-24).

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 equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. 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

1. David L. Paterson 1 and Robert A. Bonomo. Extended- Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Cincal Microbiology reviews, Oct.2005.
2. Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russel Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of lactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36, 2010.
3. L. Dortet, L. Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended Samples Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. Journal of Clinical Microbiology-October 2014, Volume 52 Number 10.
4. Martha Valiadi & Sumit Kalsi & Isaac G. F. Jones & Carrie Turner & J. Mark Sutton & Hywel Morgan. Simple and rapid sample preparation system for the molecular detection of antibiotic resistant pathogens in human urine. Biomed Microdevices, 2016.
5. Sridhar Rao P. N. – Assistant Professor Dept. of Microbiology JJMMC, Davangere. CTX-M β -lactamases. www.microrao.com; 03rs July, 2012.
6. Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern – Korean J Intern Med 2014.
7. Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfar, Ate Taha, Abber Shahba, Nashawa M. Noor-eldeen and Nahla A. Nosair. Multiplex PCR for Detection of bla CTX-M Genes among the Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing Gram-negatives isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology , July 2014.
8. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013.

Fabricado por:



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

Distribuído por:



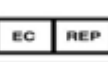
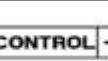
Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

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 <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)