

RESIST-5 O.O.K.N.V.



Produttore:

Coris BioConcept
Science Park CREALYS
Rue Jean Sonet 4A
B - 5032 GEMBLoux
BELGIO
Tel.: +32(0)81.719.917
Fax: +32(0)81.719.919
info@corisbio.com

Prodotto in BELGIO

www.corisbio.com
IFU-58R9/IT/02

Test diagnostico rapido per la rilevazione delle carbapenemasi OXA-163, OXA-48, KPC, NDM e VIM in coltura batterica

PER UTILIZZO DIAGNOSTICO IN VITRO

ESCLUSIVAMENTE PER USO PROFESSIONALE

Bibliografia: K-15R9, 2x20 cassette, tampone, 20 provette e contagocce

IT

I. INTRODUZIONE

I microrganismi produttori di carbapenemasi (CPO), e più specificamente, le Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE) sono un importante problema di salute pubblica in tutto il mondo a causa del loro ampio spettro di resistenza agli antibiotici tra cui, oltre ai carbapenemi, la maggior parte delle classi di agenti antimicrobici, che lascia pochissime opzioni per il trattamento dei pazienti infetti. Oltre alle CRE, i CPO includono anche bacilli gram-negativi non fermentanti (NFGNB), ad esempio *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* che mostrano resistenza non solo al beta lattame e ad altri gruppi di antibiotici, ma anche ai carbapenemi. La rapida diffusione dei CPO e dei geni che codificano per queste resistenze ha causato la comparsa di focolai nosocomiali e situazioni endemiche in diversi paesi in Europa e in tutto il mondo.

Lo sviluppo di nuovi test diagnostici rapidi per individuare i pattern di resistenza antibiotica è ritenuto essenziale e prioritario dagli esperti e dalle autorità sanitarie internazionali. NDM e KPC rappresentano due delle carbapenemasi più diffuse e in crescita in molti paesi. D'altra parte, le carbapenemasi classe D tipo OXA-48 sono i meccanismi di resistenza più impegnativi da rilevare dai laboratori clinici. In particolare, la variante OXA-163 è un enzima difficile da identificare. Infatti, sebbene OXA-163 mostri un'attività carbapenemasiica più debole rispetto a OXA-48, mostra anche una maggiore attività rispetto alle cefalosporine ad ampio spettro (ESC), cosa che rappresenta un'altra sfida per l'identificazione rapida. VIM non solo è presente nelle Enterobacteriaceae, ma è anche molto diffusa nei batteri non fermentanti. L'identificazione rapida di queste carbapenemasi è di essenziale importanza per migliorare la terapia somministrata ai pazienti e controllare la diffusione di questa resistenza agli antibiotici nei nosocomi.

Esistono già test fenotipici di conferma che utilizzano dischi combinati con inibitori specifici per individuare tipi selezionati di carbapenemasi, tra cui le carbapenemasi di classe A (KPC) e di classe B (VIM, IMP, NDM); tuttavia, questi test richiedono molto tempo e necessitano di un giorno in più dopo i risultati dei test di sensibilità antimicrobica. Inoltre, i dosaggi colorimetrici fenotipici spesso non sono abbastanza sensibili per il rilevamento delle carbapenemasi a bassa attività come OXA-48 e varianti strettamente correlate (le cosiddette "simili OXA-48") e per la sottofamiglia OXA-163 che mostra un'attività carbapenemasiica molto bassa. Diversi test di sequenziamento molecolare e genetico consentono inoltre di rilevare le carbapenemasi, in particolare per la conferma definitiva di OXA-48 e OXA-163. Questi test sono costosi, richiedono molto tempo e possono essere eseguiti solo in un ambiente dedicato e da personale di laboratorio qualificato, il che ne limita l'uso generalizzato.

II. PRINCIPIO DEL TEST

Questi sono test pronti all'uso basati su una tecnologia a membrana con nanoparticelle di oro colloidale. Il nostro kit è finalizzato alla rilevazione delle carbapenemasi da una singola colonia batterica isolata di enterobatteri o NFGNB che crescono su una piastra di agar. Ogni sacchetto contiene: 2 cassette a flusso laterale per l'identificazione di (i) KPC, OXA-163 e OXA-48 e (ii) NDM e VIM. Questi due dispositivi sono finalizzati alla rilevazione delle carbapenemasi KPC, OXA-163, OXA-48, NDM e VIM da colonie di isolati batterici che crescono su una piastra di agar e sono risospese nel tampone fornito. **Identificazione di KPC OXA-163 e OXA-48.** Una membrana di nitrocellulosa viene sensibilizzata con:

- (1) un anticorpo monoclonale diretto contro le carbapenemasi KPC (linea "KPC")
- (2) un anticorpo monoclonale diretto contro un primo epitopo delle carbapenemasi OXA-48 e varianti (ma non la variante OXA-163) (linea "48")
- (3) un anticorpo monoclonale diretto contro un secondo epitopo delle carbapenemasi OXA-48 e varianti, inclusa OXA-163 (linea "163")
- (3) un reagente di cattura di controllo (linea "C" superiore).

Tre diversi coniugati di nanoparticelle d'oro colloidale sono essiccati su una membrana: un coniugato diretto contro un secondo epitopo delle carbapenemasi KPC, un coniugato diretto contro un terzo epitopo delle carbapenemasi OXA-48 e varianti, inclusa OXA-163, e un coniugato di controllo.

Identificazione di NDM e VIM. Una membrana di nitrocellulosa viene sensibilizzata con:

- (1) un anticorpo monoclonale diretto contro le carbapenemasi NDM (linea "N" inferiore),
- (2) un anticorpo monoclonale diretto contro le carbapenemasi VIM (linea "V" centrale),
- (3) un reagente di cattura di controllo (linea "C" superiore).

Tre diversi coniugati di nanoparticelle d'oro colloidale vengono essiccati su una membrana: un coniugato diretto contro le carbapenemasi NDM, un coniugato diretto contro le carbapenemasi VIM e un coniugato di controllo.

Quando il tampone fornito contenente i batteri risospesi viene a contatto con la striscia, i coniugati solubilizzati migrano con il campione per diffusione passiva, mentre i coniugati e il materiale del campione entrano in contatto con i rispettivi anticorpi immobilizzati che vengono adsorbiti sulla striscia di nitrocellulosa. Se il campione contiene una carbapenemasi KPC, OXA-163, OXA-48, NDM o VIM, i complessi costituiti dai coniugati e KPC, OXA-163, OXA-48, NDM oppure VIM rimarranno legati alle rispettive linee specifiche (KPC: linea "KPC"; OXA-48: linea "48", OXA-163: linea "163"; NDM: linea "N", VIM: linea "V"). La migrazione continua per diffusione passiva e sia i coniugati, sia il materiale del campione entrano in contatto con il reagente di controllo della linea (superiore) che si lega a un coniugato di controllo (linea "C"), producendo così una linea rossa.

*Poiché il secondo coniugato è diretto contro tutte le varianti OXA-163 e tutte le varianti OXA-48, se il campione contiene una quantità molto elevata di OXA-48, la seconda linea (etichettata come "48" sulla cassetta) sarà fortemente positiva, mentre la terza linea (etichettata come "163" sulla cassetta) potrebbe mostrare un segnale debole perché alcune OXA-48 in eccesso potrebbero non essere catturate dalla specifica linea OXA-48 (seconda linea) ma dalla linea OXA-163 (terza linea).
Il risultato è visibile entro 15 minuti sotto forma di linee rosse sulla striscia.

III. REAGENTI E MATERIALI

1. RESIST-5 O.O.K.N.V. (2x20 cassette)

20 sacchetti sigillati contenenti due cassette a flusso laterale e un essiccante. Ogni card per test contiene una striscia sensibilizzata.

2. Flacone contenente il tampone LY-A (15 mL)

Soluzione salina tamponata a pH 7,5 contenente TRIS, Na₂S₂O₅ (<0,1%) e un detergente.

3. Istruzioni per l'uso (1)

4. Provette semirigide monouso con contagocce (20)

IV. PRECAUZIONI SPECIALI

- Tutte le operazioni correlate all'uso del test devono essere effettuate in conformità con le buone pratiche di laboratorio (BPL).

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

- Prestare attenzione quando si apre il sacchetto.

- Evitare di toccare la nitrocellulosa con le dita.

- Indossare i guanti per manipolare i campioni.

- Non utilizzare mai reagenti di un altro kit.

- Le linee verdi indicano i siti di adsorbimento degli immunoreagenti. Il colore verde scompare durante il test.

La qualità dei reagenti non è garantita oltre la data di scadenza o nel caso in cui i reagenti vengano conservati in condizioni diverse da quelle indicate nel foglietto illustrativo.

V. SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

- Smaltire guanti, tamponi, provette e card usati in conformità alle buone pratiche di laboratorio (BPL).

- Ogni utente è responsabile della gestione degli eventuali rifiuti prodotti e deve assicurarsi che questi vengano smaltiti in conformità con le normative vigenti.

VI. CONSERVAZIONE

- Un sacchetto sigillato può essere conservato a una temperatura compresa tra 4 e 30 °C e utilizzato entro la data di scadenza indicata sulla confezione. Una volta aperto il sacchetto, eseguire immediatamente il test.

- Evitare di congelare card per test e tampone.

VII. RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni da testare devono essere ottenuti e gestiti tramite metodi microbiologici standard.

Assicurarsi che i campioni non vengano trattati con soluzioni contenenti formaldeide o suoi derivati.

I terreni di coltura testati e convalidati con i kit Coris BioConcept RESIST sono elencati sul sito web: <https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/RESIST-5-OOKNV.php>

VIII. PROCEDURA

OPERAZIONI PRELIMINARI

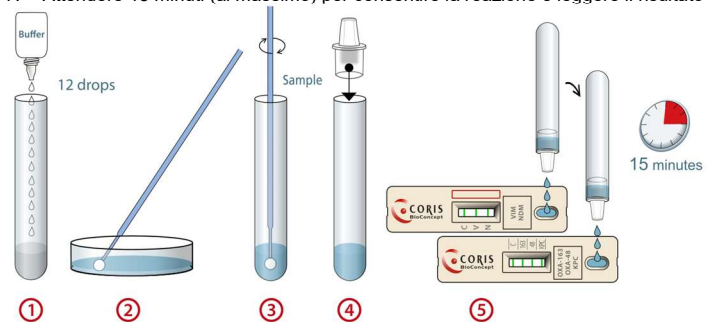
Prima di eseguire il test, lasciare che i componenti del kit, nella confezione sigillata, e i campioni (nel caso in cui la piastra contenente la colonia da analizzare sia stata conservata a 4 °C) si stabilizzino a temperatura ambiente (15-30 °C).

Aprire il sacchetto ed estrarre la card per test. Una volta aperto il sacchetto, eseguire immediatamente il test. Scrivere sulla card il nome del paziente o il numero del campione (una card per campione).

PROCEDURA DI PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Le prestazioni previste con campioni diversi dalle colonie batteriche non sono state definite. Per prestazioni ottimali si consiglia l'uso di colonie batteriche fresche.

1. Preparare una provetta semirigida e aggiungervi 12 gocce di tampone LY-A.
2. Raccogliere i batteri prelevando una colonia con un'ansa batteriologica monouso e immergere l'ansa fino in fondo nella provetta semirigida contenente il tampone.
3. Mescolare a fondo prima di rimuovere il loop.
4. Inserire saldamente il contagocce sulla provetta semirigida.
5. Utilizzare il Vortex per omogeneizzare il preparato. L'intera colonia batterica deve essere sospesa nel tampone.
6. Capovolgere la provetta e aggiungere lentamente 3 gocce di campione diluito nel pozzetto per campioni di ognuna delle due cassette etichettate (i) KPC, OXA-48 e OXA-163 e (ii) NDM e VIM. In alternative, aggiungere 100 µl con una micropipette in entrambe le cassette.
7. Attendere 15 minuti (al massimo) per consentire la reazione e leggere il risultato



I risultati possono essere interpretati come positivi non appena appaiono la linea del test e quella di controllo.

Non tenere in considerazione la comparsa di nuove linee una volta trascorso il tempo di reazione.

I risultati devono essere letti sulle strisce ancora bagnate.

IX. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati devono essere interpretati nel modo seguente per ognuna delle due cassette:

Risultato negativo: comparsa di una banda di colore rosso-viola nella finestra di lettura centrale, in corrispondenza della posizione della linea di controllo (C). Non è presente nessun'altra linea.

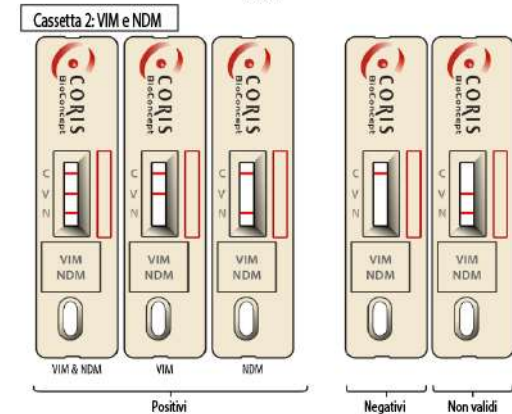
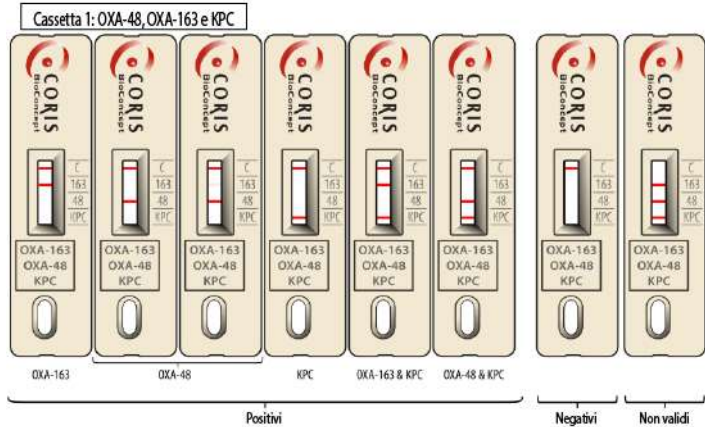
Risultato positivo: oltre a una linea rossastra-porpora sulla linea di controllo (C), compare una linea rossastra-viola visibile in una delle posizioni delle linee di test ("KPC" o "163" o "48") sulla cassetta etichettata (i) KPC, OXA-48, OXA-163, o in una delle posizioni delle linee di test ("V" o "N") sulla cassetta etichettata (ii) NDM e VIM. L'intensità della linea di test può variare a seconda della quantità di antigene e del tipo di variante presente nel campione. Una qualsiasi linea di test di colore rossostra-viola (KPC, OXA-48, OXA-163NDM e VIM), anche se debole, deve essere considerata un risultato positivo.

Se accanto al segno "KPC" compare una linea di test positiva, il campione contiene varianti KPC. Se compare accanto al segno "48", il campione contiene varianti OXA-48 o simil-OXA-48. Se compare accanto al segno "163", il campione contiene la variante OXA-163 o varianti strettamente correlate come OXA-247, 405 o 438; se accanto al segno "N", il campione contiene NDM e se accanto al segno "V", il campione contiene

VIM. Le linee di test positive possono anche comparire in diverse combinazioni. In questo caso il campione contiene una combinazione di numerose carabapenemasi. Tuttavia, nel caso di una linea di test OXA-48 estremamente positiva, sulla linea di test OXA-163 potrebbe comparire un segnale debole. In questo caso il test deve essere interpretato come OXA-48 positivo e OXA-163 negativo.

Risultato non valido: l'assenza di una linea di controllo indica un errore nella procedura di test. Ripetere i test non validi utilizzando un nuovo kit.

Nota: durante l'asciugatura è possibile che compaia una debolissima ombreggiatura in corrispondenza della linea di test. Tale ombreggiatura non deve essere considerata indice di risultato positivo.



X. PRESTAZIONI

A. Limite di rilevazione

I limiti di rilevazione determinati per le proteine ricombinanti purificate di OXA-48, OXA-163, KPC, NDM e VIM sono stati valutati a 0,125 ng/mL, 0,49 ng/mL, 0,625 ng/mL, 0,25 ng/mL e 0,23 ng/mL, rispettivamente.

B. Studio prospettico (basato sul kit RESIST-3 O.K.N. K-SeT)

Il test a cassetta per OXA-48 e KPC è stato convalidato confrontandolo con il metodo molecolare di riferimento (PCR multiplex validata, compreso il sequenziamento) nel Laboratorio nazionale di riferimento per bacilli gram-negativi con resistenza multifarmaco (National Reference Laboratory for Multidrug-Resistant Gram Negative Bacilli) (Belgio) nell'ambito di uno studio prospettico eseguito su 173 isolati clinici, non duplicati, consecutivi e che si presumeva fossero CPE, da luglio a settembre 2016.

Test OXA-48	Positivi	Negativi	Totali
Positivi	69	0	69
Negativi	0	104	104
Totali	69	104	173

		Intervallo di confidenza 95% ¹
Sensibilità:	100%	(95,7 – 100%)
Specificità:	100%	(97,2 – 100%)
Valore predittivo positivo:	100%	(95,7 – 100%)
Valore predittivo negativo:	100%	(97,2 – 100%)
Accuratezza:	100%	(173/173)

Test KPC	Positivi	Negativi	Totali
Positivi	9	0	9
Negativi	0	164	164
Totali	9	164	173

		Intervallo di confidenza 95% ¹
Sensibilità:	100%	(68,4 – 100%)
Specificità:	100%	(98,2 – 100%)
Valore predittivo positivo:	100%	(68,4 – 100%)
Valore predittivo negativo:	100%	(98,2 – 100%)
Accuratezza:	100%	(173/173)

C. Convalida della raccolta dei ceppi di riferimento

Le carabapenemasi tipo OXA-48 e OXA-163 del test K-SeT sono state valutate su una raccolta di 75 ceppi clinici completamente caratterizzati nel laboratorio nazionale di riferimento per gli antimicrobici (Argentina).

75 ceppi	50 ceppi sono risultati positivi per OXA-48 e OXA-163	17 ceppi trasportano la carabapenemasi tipo OXA-48 e simil-OXA-48	OXA-48, OXA-162, OXA-181, OXA-232, OXA-244 da <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
		33 ceppi trasportano le varianti OXA-163 di carabapenemasi	OXA-163, OXA-247, OXA-438 da <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Enterobacter kobei</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella ozonae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Kluyvera georgiana</i>

25 ceppi sono risultati negativi per OXA-48 e OXA-163	14 ceppi trasportano una carabapenemasi non OXA-48	GES-5, IMP-8, KPC-2, KPC-3, NDM-1, VIM-1, VIM-2, SPM-1, OXA-23, OXA-58, OXA-72, OXA-143, Sme, IMI
	11 ceppi non produttori di carabapenemasi	Comprese OXA-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, CMY-2, GES-1 + OXA-2, AmpC + porine, CTX-M + porine

D. Studio retrospettivo

Il test a cassetta per VIM e NDM è stato convalidato confrontandolo con un metodo molecolare di riferimento nel Laboratorio nazionale di riferimento per i *Bacilli* Gram-negativi con resistenza multifarmaco (Belgio) in uno studio retrospettivo su una raccolta di ceppi di riferimento.

Test NDM	Positivi	Negativi	Totali
Positivi	24	0	24
Negativi	0	95	95
Totali	24	95	119

		Intervallo di confidenza 95% ¹
Sensibilità:	100%	(82,8 – 100%)
Specificità:	100%	(95,2 – 100%)
Valore predittivo positivo:	100%	(82,8 – 100%)
Valore predittivo negativo:	100%	(95,2 – 100%)
Accuratezza:	100%	(119/119)

Test VIM	Positivi	Negativi	Totali
Positivi	38	0	38
Negativi	1*	80	81
Totali	39	80	119

*: il risultato falso negativo è una colonia di *P. aeruginosa* che ospita geni VIM-5 e NDM-1. Questa colonia è stata rilevata NDM positiva ma VIM negativa. La produzione di VIM-5 non è stata valutata.

		Intervallo di confidenza 95% ¹
Sensibilità:	97,4%	(84,9 – 99,9%)
Specificità:	100%	(94,3 – 100%)
Valore predittivo positivo:	100%	(88,6 – 100%)
Valore predittivo negativo:	98,8%	(92,4 – 99,9%)
Accuratezza:	99,2%	(118/119)

E. Ripetibilità e riproducibilità

Per controllare l'accuratezza intra-lotto (ripetibilità), gli stessi campioni positivi e una soluzione tampone sono stati testati per 15 volte su kit appartenenti allo stesso lotto di produzione nelle stesse condizioni sperimentali. Tutti i risultati osservati sono stati confermati come previsto.

Per controllare l'accuratezza inter-lotti (riproducibilità), alcuni campioni (positivi e tampone) sono stati testati su kit appartenenti a tre lotti di produzione diversi. Tutti i risultati sono stati confermati come previsto.

XI. LIMITI DEL KIT

Il test è qualitativo, pertanto non può essere utilizzato per valutare la quantità di antigeni presenti nel campione. Ai fini della diagnosi è necessario tenere in considerazione anche i dati clinici e altri risultati di laboratorio disponibili. Un test positivo non esclude la presenza di altri meccanismi di resistenza agli antibiotici.

XII. PROBLEMI TECNICI / RECLAMI

In caso di problemi tecnici o prestazioni difformi rispetto a quelle indicate in questo foglietto illustrativo:

1. Registrare il codice del lotto del kit in questione.
2. Se possibile, durante la gestione del reclamo conservare il campione nelle condizioni di conservazione appropriate.
3. Contattare Coris BioConcept (client_care@corisbio.com) o il distributore locale.

XIII. BIBLIOGRAFIA

- Y. Glupczynski, A. Jousset, S. Evrard, R. Bonnin, T. Huang, L. Dortet, P. Bogaerts and T. Naas. Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Mar (7):1955-1960
- DW. Wareham and MH. Abdul Momin Rapid Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae: 1 Evaluation of the RESIST-3 O.K.N (OXA-48, KPC, NDM) Multiplexed Lateral Flow Assay. *J Clin Microbiol.* 2017 Feb (4):1223-1225
- F Pasteran, L Denorme, I Ote, S Gomez, D De Belder, Y Glupczynski, P Bogaerts, B Ghiglione, P Power, P Mertens, A Corso. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 subfamily in carbapenem resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *J Clin Microbiol.* 2016 Aug 17. pii: JCM.01175-16
- D. Meunier, A. Vickers, R. Pike, R.L. Hill, N. Woodford and K.L. Hopkins. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Aug; 71 (8):2357-9
- Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Abdul Momin MH. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for the Rapid Detection of OXA-48-like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016 Feb;54 (2):471-3
- Fernández J, Fleites A, Rodicio MR, Vazquez F. Evaluation of OXA-48 K-Se T: an immunochromatographic assay for rapid detection of OXA-48-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 May;85 (1):12-5
- Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V, Cuzon G, Naas T. Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Jul;71 (7):1834-40
- Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, Leclipteux T, Bogaerts P. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2016 May;71(5):1217-22
- A. Abulaila, F. Erdem, Z. Aktas and O. Oncul. Evaluation Comparison of a novel OXA-48 K-Set test and blue-carba test in detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae with using PCR as reference method. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam April 09 – 12, 2016

Data ultimo aggiornamento: 07 AGOSTO 2019

REF	Codice	Produttore
IVD	Dispositivo medico per test diagnostici in vitro	Limiti di temperatura
LOT	Quantità sufficiente per <n> test	Numero di lotto
i	Consultare le istruzioni per l'uso	Non riutilizzare
☔	Conservare in luogo asciutto	Utilizzare entro
DIL SPE	Diluyente (campione)	CONT Na ₃
		Contiene sodio azide

¹Newcombe, Robert G. "Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of Seven Methods," *Statistics in Medicine*, 17, 857-872 (1998).