

Introduzione

NG-Test CARBA 5 è un test immunocromatografico rapido, con lettura visiva, per la rilevazione delle 5 carbapenemasi KPC, OXA, VIM, IMP e NDM in una singola colonia batterica ottenuta da coltura.

Sommario

I β -Lattamici rappresentano gli antibiotici di prima linea per il trattamento delle infezioni causate dalle *Enterobacteriaceae*. Tuttavia, dall'inizio del loro massivo utilizzo negli anni '40, la loro efficacia è stata via via contrastata dalla produzione di enzimi che li inattivano: le β -lattamasi. Tra queste vi sono le carbapenemasi in grado di idrolizzare gli antibiotici carbapenemici.

Prima degli anni '90, la maggior parte delle resistenze agli antibiotici erano associate alla produzione di β -lattamasi ad ampio spettro (ESBL) appartenenti alla classe A, B, C, D della classificazione di Ambler. In seguito, numerosi studi hanno evidenziato un incremento nella produzione di carbapenemasi nelle *Enterobacteriaceae*.

Tra queste carbapenemasi, le β -lattamasi KPC (Classe A) si sono diffuse in tutto il mondo a partire dai primi anni 2000. Successivamente, la diffusione ha riguardato anche le metallo- β -lattamasi (M β SL) di tipo IMP, VIM e NDM (Classe B), così pure le OXA-48 (Classe D).

Principalmente riscontrate in ambito ospedaliero, le carbapenemasi sono responsabili delle infezioni nosocomiali e sollevano un grosso problema in termini di Salute Globale, soprattutto per la difficoltà nel rilevarne la presenza.

Principio

NG-Test CARBA 5 è un test rapido, pronto all'uso, per la rilevazione di 5 carbapenemasi in una singola colonia batterica, isolata su un terreno agarizzato dopo 16 ore di incubazione e processata in una soluzione d'estrazione.

Il saggio utilizza anticorpi monoclonali diretti contro le ESBL per rilevare selettivamente la resistenza batterica del microrganismo testato.

Il saggio è effettuato dispensando un volume sufficiente di campione nel pozzetto della card. Il coniugato presente nella membrana di nitrocellulosa lega gli anticorpi monoclonali marcati contro KPC, OXA, VIM, IMP, NDM. Quando il campione migra attraverso la strip, gli enzimi presenti vengono catturati in corrispondenza della regione "Linea Test" (K, O, V, I, N) contenente anticorpi monoclonali diretti contro KPC, OXA, VIM, IMP, NDM immobilizzati sulla membrana. Se almeno una linea o più linee rosse appaiono in posizione K, O, V, I, N e una linea nella regione controllo (C), significa che nel campione sono presenti delle carbapenemasi. In assenza di carbapenemasi nel campione, nella finestra sarà presente solo la linea controllo (C).

La regione di controllo (C), qualunque sia il risultato, dovrebbe mostrare una linea colorata. Ciò sta a significare che il test è stato eseguito correttamente.

Reagenti e materiali forniti

Ciascun kit contiene:

- 20 card per test confezionate in sacchetti sigillati con un agente essiccante
- 20 provettine Eppendorf
- 20 pipette monouso da 100 μ L
- 1 soluzione buffer di estrazione in un flaconcino di plastica (4,5) μ L
- 1 Istruzioni per l'Uso

Materiale richiesto ma non fornito

- Timer
- Guanti monouso
- Ansa
- Vortex

Precauzioni

- Test diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
- Tutte le operazioni devono essere condotte in conformità con la buona pratica di laboratorio.
- Non utilizzare dopo la data di scadenza.
- La card deve essere conservata nel proprio involucro sigillato fino al momento dell'utilizzo.
- Manipolare i campioni come se fossero potenzialmente infettivi.
- Dopo l'utilizzo, smaltire le card e i reagenti in un contenitore per rifiuti infettivi.
- Non riutilizzare le card.

Conservazione e stabilità

Conservare le card nel loro involucro sigillato a una temperatura compresa tra 4 e 30°C. I test sono stabili fino alla data di scadenza indicata su ciascun sacchetto.

I kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata su ciascun kit.

NON CONGELARE.

Prelievo dei campioni

I campioni da analizzare devono essere ottenuti e manipolati in accordo con le procedure microbiologiche standardizzate.

Con un'ansa prelevare una colonia cresciuta su agar solido e risospenderla in un tampone d'estrazione.

Per prestazioni ottimali, si raccomanda vivamente l'uso di colonie batteriche fresche.

Procedura operativa

1. Indossare guanti protettivi.
2. Prima di eseguire l'analisi, consentire a tutti i componenti del kit di raggiungere la temperatura ambiente per almeno 10 minuti.

Preparazione del campione

1. Dispensare 5 gocce (150 μ L) di tampone d'estrazione in una provettina Eppendorf fornita.
2. Con un'ansa prelevare una colonia cresciuta su agar solido, quindi risospenderla nella provettina Eppendorf contenente 150 μ L di tampone d'estrazione.
3. Chiudere la provetta Eppendorf con il tappo contagocce.
4. Prima dell'uso, omogeneizzare la soluzione mediante Vortex.

Esecuzione del test

1. Aprire l'involucro ed estrarre la card. Una volta aperta la confezione, utilizzare subito la card.
2. Utilizzando la pipetta fornita, dispensare 100 μ L di soluzione preparata (il campione deve raggiungere la linea nera indicata sulla pipetta per poter trasferire 100 μ L) nel pozzetto campione marcato con la lettera "S".
3. Leggere i risultati dopo 15 minuti come indicato di seguito.

ATTENZIONE: non interpretare i risultati del test dopo che siano trascorsi 20 minuti, perché potrebbero variare.

Interpretazione dei risultati

Risultato Negativo

Appare solo una linea rossa nella regione controllo (C): il campione non contiene nessuna carbapenemasi o contiene carbapenemasi a livelli non rilevabili e deve essere interpretato come risultato negativo.



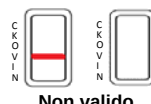
Negativo

Risultato Positivo

Appare una linea rossa nella regione controllo (C) e una o più linee nelle regioni test K, O, V, I o N: il campione contiene una o più carbapenemasi e deve essere interpretato come risultato positivo.



VIM
Positivo



Non valido

Risultato Non Valido

Se la linea di controllo (C) non appare, il risultato del test non è valido. Le cause principali potrebbero essere dovute all'insufficiente quantità di campione o ad una procedura non corretta. Potrebbe anche essersi verificato un deterioramento del kit.

Ripetere la procedura utilizzando un nuovo test. Se il problema persiste, non riutilizzare il kit e contattare il distributore.

IMPORTANTE: l'intensità delle linee rosse Test potrebbero variare in relazione al livello di KPC, OXA, VIM, IMP e/o NDM presente nel campione.

NG-Test CARBA 5

Solo per uso diagnostico in vitro

Test rapido per la ricerca delle carbapenemasi KPC, OXA, VIM, IMP e NDM nelle colonie batteriche da coltura

Solo per uso professionale



Controllo Qualità

Nel test è incluso un controllo interno. Quando si sviluppa la linea di controllo, ciò sta a significare che il volume del campione era sufficiente e la procedura corretta.

Limitazioni

NG-Test CARBA 5 è un test qualitativo, pertanto non è in grado di fornire risultati quantitativi. Questo test di prima-linea permette una rapida classificazione dei pazienti. I risultati ottenuti devono essere confermati con specifiche colture su agar e allestendo il test di sensibilità in MIC, Minima Concentrazione Inibente. Un test positivo non esclude la presenza di altri meccanismi di antibiotico-resistenza.

Performance caratteristiche

Limite di Rilevazione

Il limite di rilevazione è stato determinato utilizzando enzimi ricombinanti purificati:

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

Validazione su ceppi di riferimento di una Banca Ceppi:

NG-Test CARBA 5 è stato valutato al CNR* (AMR French Reference Center) di Kremlin Bicêtre Paris-France su 167 ceppi clinici.

Status	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	116	0	116
Negativo	0	51	51
Totale	116	51	167

Sensibilità: 100% Intervallo di Confidenza: 94,8%-100%
Specificità: 100% Intervallo di Confidenza: 96,5%-100%

In riferimento alle carbapenemasi target, tutti i risultati sono stati correlati ai genotipi dei microrganismi mediante analisi PCR.

NG-Test CARBA 5 rileva almeno le seguenti varianti:

NDM-1 -4 -5 -6 -7 e 9
KPC -2 e 3
IMP -1 -8 e 11
VIM -1 -2 -4 e 19
OXA -48 -181 -204 -232 -244 -517 -519 e 535
OXA -163 e OXA-405 (OXA-48-like spettro esteso oxacillinas)

Terreni di coltura validati

Luria Broth (LB) et LB agar, Trypticase soja agar (TSA), Mueller-Hinton (MH) agar e URI-4, Columbia agar + 5% sangue di cavallo, ChromID™ESBL agar, ChromIDR CARBA SMART, Drigalski (DRIG) agar.



Questo test è stato sviluppato in collaborazione con CEA*.

*Commissariato francese per l'energia atomica e le energie alternative.

CEA è un Organismo chiave nella ricerca tecnologica.

Bibliografia

- 1-Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. Yohei Doi, MD, PhD1 David L. Paterson, MBBS, PhD, FRACP, FRCPA2,3
- 2-Emerging Infectious Disease www.cdc.gov/eid Vol. 18, No. 9, September 2012. Rapid Detection of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Patrice Nordmann, Laurent Poirel, and Laurent Dortet.
- 3-ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 2010, p. 969-976 Vol. 54, No. 3. Updated Functional Classification of β -Lactamases. Karen Bush and George A. Jacoby2 Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana,1 and Lahey Clinic, Burlington, Massachusetts.

4-Masson SAS. Tous droits réservés. Archives de Pédiatrie 2010;17:S154-S162.

Carbapenemases in Enterobacteriaceae Elsevier.

P. Nordmann*, A. Carrer.

5-Pak J Pharm Sci. 2015 May;28(3 Suppl):1127-33.

Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in Enterocabteriaceae strains.

Demir Y1, Zer Y1, Karaoglan I2.

6-Enferm Infect Microbiol Clin. 2014 Dec;32 Suppl 4:17-23. doi:

10.1016/S0213-005X(14)70170-3.

Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future?

Oteo J1, Miró E2, Pérez-Vázquez M3, Navarro F4.

7-J Clin Microbiol: 2014 Jul;52(7):2500-5. doi: 10.1128/JCM.00547-14. Epub 2014 Apr 30.

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.

Kulkarni MV1, Zurita AN1, Pyka JS1, Murray TS2, Hodsdon ME3, Peaper DR4.

8-Journal of Clinical Microbiology p. 2500-2505.

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 M. V. Kulkarni,a* A. N. Zurita,a *J.A. Pyka,a T. S. Murray,b M.E. Hodsdon,c D. R. Peaperc,d.

Simboli

	20	Contiene un N° di test		Data scadenza
		Per uso diagnostico in vitro		Non riutilizzate
		N° di lotto		Codice
		Far riferimento alle Istruzioni per l'Uso		Limiti della temperatura di conservazione
		Conservare in luogo asciutto	Contiene NaN3	0,01% di sodio azide



NG Biotech

Z.A. Courbouton, Atelier relais le Tremplin

35480 Guipry France

Tel. +33 (0) 2 23 30 17 83 Fax: +33 (0) 9 71 70 53 10

Email: info@ngbiotech.com



Ref : ITO004CAR
Rev : 171120