



NG•TEST®/CTX-M Multi

NG-Test® CTX-M Multi Rapid test for the detection of CTX-M groups 1, 2, 8, 9, 25 β -lactamases in a bacterial colony from culture.

For professional use only.



EN Instructions for use - 01

ES Instrucciones de uso - 25

FR Instructions d'utilisation - 06

IT Istruzioni per l'uso - 30

CZ Návod k použití - 11

PL Sposób użycia - 35

DE Gebrauchsanweisung - 15

PT Instruções de Utilização - 40

EL οδηγίες χρήσης - 20

■

■

■

INTRODUCTION

NG-Test® CTX-M Multi is a qualitative rapid immunoassay for the detection of CTX-M groups 1, 2, 8, 9 and 25 in a bacterial colony obtained from culture. It is an *in vitro* diagnostic assay, for professional use only, that aids to detect extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) produced by Enterobacterales.

SUMMARY

β -lactams are first-line antibiotics for the treatment of infections caused by Enterobacterales. Nevertheless, since the beginning of their massive use in the 1940s, their efficacy has been challenged by the production of enzymes that inactivate them: β -lactamases. Among them, the extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) hydrolyse most β -lactams sparing only cephamycins (as ceftoxitin) and carbapenems.

The epidemiology of ESBLs among Enterobacterales recently changed with widespread dissemination of CTX-M-type enzymes. In the 1990s, the main ESBLs were derived from TEM- and SHV-type enzymes, and mainly diffused within hospital clones of *Klebsiella pneumoniae* and Enterobacterales spp. Diffusion of CTX-Ms within the *Escherichia coli* species changed this situation. Currently, more than 170 CTX-M variants have been identified and described in 5 main groups (CTX-M groups 1, 2, 8, 9 and 25). Dominant variants are geographically different. However, CTX-M-15 (group 1) and CTX-M-14 (group 9) are the most detected around the world, followed by CTX-M-2 (group 2).

Wherever their location in the world, CTX-Ms now represent the majority of ESBLs, to the point that their diffusion is qualified as pandemic. They are equally isolated in community and hospital settings and seem to be endemic in long-term care institutions. The increasing prevalence of ESBLs in community settings creates an unprecedented problem: the influx of multiresistant bacteria from the community setting to the hospital setting.

PRINCIPLE

NG-Test® CTX-M Multi is a ready for use rapid immunoassay for the detection of groups 1, 2, 8, 9 and 25 CTX-M β -lactamases in a bacterial colony sampled on a solid agar medium after culture (an overnight) and processed in an extraction buffer.

The assay is carried out by dispensing the sample in the cassette well. The sample migrates towards the conjugate pad and, if present, the CTX-M enzymes react with labelled anti-CTX-M mouse monoclonal antibodies. The complex migrates through nitrocellulose membrane by capillarity and interacts with the anti-CTX-M mouse monoclonal antibodies immobilized on the membrane, on the test region "T".

The control line C, is formed by labelled streptavidin and monoclonal antibodies reacting with biotin-BSA and goat anti-mouse polyclonal antibodies immobilized on the membrane.

If the sample is positive for CTX-M from groups 1, 2, 8, 9 or 25, a red line will appear on the test region "T" and on the control region "C" of the membrane. If not, only one red line will appear on the control region "C".

REAGENTS AND MATERIALS SUPPLIED**Each kit contains :**

- 20 Test cassettes in aluminium pouches with desiccant
- 20 Microtubes
- 20 Disposable pipettes of 100 μ L
- 1 Extraction buffer solution in a plastic bottle (4,5 mL)
- 1 Instructions for use

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Timer • Single use gloves • Loop • Vortex

PRECAUTIONS

- *In vitro* diagnostic test. For professional use only.
- All the operations must be carried out according to good laboratory practices.
- Do not use after the expiry date.
- The devices must remain in the sealed pouches until they are used.
- Handle the samples as if they were potentially infectious.
- After use, discard the device in an infectious waste container.
- Do not reuse the device.

STORAGE AND STABILITY

Store the devices in their sealed pouches between 4 and 30°C. Do not freeze. Kits are stable until the expiry date indicated on every kit.

CULTURE AND SAMPLING

The samples to be tested shall be obtained and handled according to the standardised microbiology procedures. A colony will be collected in a solid agar-based culture, then will be suspended in the extraction buffer provided into the kit. It is highly recommended to use fresh bacterial colonies for the assay performance to be optimal.

Validated culture media:

Mueller Hinton (MH) agar, URiselect 4 (URI-4), Columbia agar + 5% horse blood, ChromID ESBL agar, Drigalski (DRIG) agar.

OPERATING PROCEDURE

1 / Wear protective gloves.

2 / Bring the kit components at room temperature for at least 10 minutes.

Preparing the sample

1 / Dispense 5 drops (150µL) of extraction buffer in one of the microtubes provided into the kit.

2 / From a solid agar-based culture, collect a colony with a loop, and then suspend it in the microtube containing 150µL of extraction buffer.

3 / Close the microtube.

4 / Vortex to homogenise the mixture before use.

NOTE: Mucous colonies can lead to migration problems, due to their high viscosity. Vortex for 3 minutes a colony in extraction buffer and incubate for 10 minutes at room temperature before performing the test.

Carrying out the test

1 / Open the pouch, and take out the device. Once opened, use the test immediately.

2 / Using the provided pipette, add 100µL of the prepared mixture (sample must reach the black line indicated on the pipette to accurately aspirate 100µL) in the sample well labelled "S".

3 / Read the results at 15 minutes and interpret them as indicated below.

NOTE : Do not interpret the test results after 20 minutes, as they may vary possibly causing false positive results.

RESULT INTERPRETATION**NEGATIVE****Negative result**

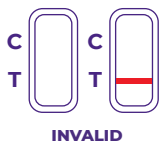
If only one red line appears on the control region (C): the sample does not contain any CTX-M enzyme or non-detectable level of this one and must be interpreted as a negative result.



Positive result

If two red lines appear, one on the control region (C) and one on the test region (T): the sample contains CTX-M enzyme and must be interpreted as a positive result.

NOTE: The intensity of the red test line (T) may vary depending on the CTX-M enzyme level in the sample. A weak line should be considered as a positive result.



Invalid result

If the control line (C) does not appear, the test result is invalid. Insufficient sample volume or an incorrect procedure are the most likely reasons for control line failure.

Deterioration of the test kit may have occurred. Repeat the procedure using a new test. If the problem persists, do not reuse the kit and contact your distributor.

QUALITY CONTROL

An internal control is included in the test. When the control line develops, it confirms the sample volume was sufficient and the procedure was correct.

LIMITATIONS

This test is a qualitative assay, so it cannot yield any quantitative result.

This first-line test allows a rapid stratification of the patients.

The obtained results must be confirmed with alternative or complementary diagnostic procedures.

A positive or a negative test does not rule out the presence of other mechanisms of antibiotic resistance.

Some cross-reactions can occur with strains expressing OXY-like ESBL enzymes, usually expressed by *Klebsiella oxytoca* species.

PERFORMANCES AND CHARACTERISTICS

Detection limit:

The detection limit was determined using purified recombinant enzymes:

- **Group 1** / CTX-M-15 250 pg/mL
- **Group 2** / CTX-M-2 600 pg/mL
- **Group 9** / CTX-M-14 100 pg/mL

NG-Test® CTX-M Multi detects the following variants:

- **Group 1** / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
- **Group 2** / CTX-M-2
- **Group 8** / CTX-M-8
- **Group 9** / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
- **Group 25** / CTX-M-94, -100

Evaluation study:

NG-Test® CTX-M Multi was evaluated on 165 isolates (PCR characterized ESBL content) at the NRC (AMR French National Reference Centre) of CHU Kremlin Bicêtre Paris-France.

Table 1:

		STATUT		
		POSITIVE result	NEGATIVE result	TOTAL
NG•TEST [®] CTX-M Multi	POSITIVE	149	0	149
	NEGATIVE	0	16	16
	TOTAL	149	16	165

SENSITIVITY	100%	CONFIDENCE INTERVAL 95% [97.5% ; 100%]
SPECIFICITY	100%	CONFIDENCE INTERVAL 95% [80.6% ; 100%]

BIBLIOGRAPHY

- Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
- Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
- Hasan Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β -Lactamase Producing Klebsiella spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
- R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum - Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
- Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β -Lactamases in Escherichia coli from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases - www.cdc.gov/eid - Vol. 15, No. 5, May 2009.
- Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gramnegative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
- Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frontier in microbiology, volume 3, articles 110.
- Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli and its CTX-M-15-like extended-spectrumlactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355-358.
- David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2005, p. 657-686 Vol. 18, No. 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) 18: 18.
- Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC,Davangere.CTX-M β -lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.
- Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - Korean J Intern Med 2014;29:27-30
- Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101.
- Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfat, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa 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-negative Isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology, July 2014 Vol. 23, No. 3.
- L. Dortet, L.Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended- Spectrum-Lactamase

-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test.
Journal of Clinical Microbiology- October 2014 Volume 52 Number 10.

SYMBOLS



Content for
20 assays



Expiry date



Temperature
limit



in vitro diagnostic
medical device



Do not re-use



Batch number



Catalogue
reference



Consult
instructions
for use



Manufacturer



This test was developed in collaboration
with the CEA*.

*The French Alternative Energies and Atomic
Energy Commission is a key player in research,
development and innovation.

UTILISATION

Le NG-Test[®] CTX-M Multi est un test rapide immunologique qualitatif pour la détection des β -lactamases CTX-M des groupes 1, 2, 8, 9 et 25 à partir d'une colonie bactérienne après culture. Il s'agit d'un test de diagnostic *in vitro*, à usage exclusivement professionnel, qui aide à la détection des β -lactamases spectre élargi ou étendu (BLSE) produites par les entérobactériales.

RÉSUMÉ

Les β -lactamines sont les antibiotiques de première ligne dans le traitement des infections causées par les entérobactériales. Cependant, dès le début de leur utilisation de masse dans les années 1940, leur efficacité a été confrontée à la production d'enzymes les inactivant : les β -lactamases. Parmi elles, les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) hydrolysent la majorité des β -lactamines en n'épargnant que les céphamycines (comme la céfoxitine) et les carbapénèmes.

L'épidémiologie des BLSE au sein des entérobactériales a récemment changé avec la dissémination massive des enzymes de type CTX-M. Dans les années 1990, les principales BLSE étaient dérivées des enzymes de type TEM et SHV et diffusées majoritairement au sein des clones hospitaliers de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacteriales* spp. La diffusion de CTX-M au sein de l'espèce *Escherichia coli* a bouleversé cette situation.

Actuellement, plus de 170 variants de CTX-M ont été identifiés et décrits dans 5 groupes principaux (les groupes CTX-M 1, 2, 8, 9 et 25). Les variants dominants sont différents selon les zones géographiques. Cependant, les CTX-M-15 (groupe 1) et les CTX-M-14 (groupe 9) sont les plus détectés dans le monde, ensuite, ce sont les CTX-M-2 (groupe 2).

Les CTX-M constituent désormais la majorité des BLSE quelle que soit la région du monde à tel point qu'on qualifie leur diffusion de pandémique. Elles sont indifféremment isolées en milieu communautaire ou hospitalier et semblent endémiques dans les établissements de long séjour. La prévalence croissante des BLSE en milieu communautaire pose un problème inédit qui est l'afflux de bactéries multirésistantes de la communauté vers l'hôpital.

PRINCIPE

NG-Test[®] CTX-M Multi est un test immuno-chromatographique rapide et prêt l'emploi pour la détection des β -lactamases CTX-M des groupes 1, 2, 8, 9 et 25 à partir d'une colonie bactérienne prélevée sur un milieu gélosé solide après culture (une nuit) et traitée dans un tampon d'extraction.

L'essai est réalisé par la distribution d'un volume suffisant d'échantillon dans le puits de la cassette. L'échantillon migre au travers du papier conjugué et les enzymes CTX-M, si présentes, réagissent avec les anticorps monoclonaux de souris anti-CTX-M marqués. Le complexe migre à travers la membrane de nitrocellulose par capillarité et interagit avec les anticorps monoclonaux de souris anti-CTX-M immobilisés sur la membrane au niveau de la zone test « T ».

La bande de contrôle (C) se forme par la fixation de la streptavidine et des anticorps monoclonaux marqués. Ils réagissent avec des anticorps polyclonaux de chèvre anti-souris et de la biotine-BSA immobilisés sur la membrane. Si l'échantillon est positif (présence de CTX-M des groupes 1, 2, 8, 9 ou 25), une bande rouge apparaîtra la fois sur la zone test et la zone contrôle. Sinon, une seule bande rouge apparaîtra sur la zone contrôle.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS

Chaque kit contient :

- 20 cassettes test en sachet aluminium avec dessiccant
- 20 microtubes
- 20 pipettes de 100 μ L

- 1 solution de tampon d'extraction en flacon plastique (4,5 mL)
- 1 notice

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS

Chronomètre • Gants à usage unique • Oese • Vortex

PRÉCAUTIONS

- Test de diagnostic *in vitro* à usage professionnel.
- Toutes les opérations doivent être réalisées selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- Ne pas utiliser après la date d'expiration.
- Les dispositifs doivent rester dans les sachets scellés jusqu'à leur utilisation.
- Manipuler les échantillons comme étant potentiellement infectieux.
- Après usage, jeter le dispositif dans un conteneur approprié pour déchets infectieux.
- Le dispositif ne doit pas être réutilisé.

CONSERVATION ET STABILITÉ

Conserver les dispositifs dans leur sachet scellé entre 4 et 30°C. Ne pas congeler. Les coffrets sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret.

CULTURE ET PRÉLÈVEMENT

Les échantillons à tester doivent être obtenus et manipulés selon les méthodes standardisées de microbiologie.

À partir d'une culture sur gélose solide, une colonie sera prélevée à l'aide d'une oese puis mise en suspension dans un tampon d'extraction fourni dans le coffret.

Il est fortement recommandé d'utiliser des colonies bactériennes fraîches pour obtenir une performance optimale du test.

Milieux de culture validés :

Mueller Hinton (MH) agar , UR1select-4 (URI-4), Columbia agar + 5 % sang de cheval, ChromID ESBL agar, Drigalski (DRIG) agar.

MODE OPÉRATEIRE

1 / Porter des gants de protection.

2 / Ramener les composants du kit à température ambiante pendant au moins 10 minutes.

Préparation de l'échantillon

1 / Déposer 5 gouttes (150µL) de tampon d'extraction dans un des tube eppendorf fourni dans le coffret.

2 / À partir de la culture sur gélose solide, prélever une colonie à l'aide d'une oese puis la mettre en suspension dans le tube eppendorf contenant 150µL de tampon d'extraction.

3 / Fermer le microtube.

4 / Vortexer pour homogénéiser le mélange avant l'utilisation.

NOTE : *Les colonies muqueuses peuvent entraîner des problèmes de migration, du fait d'une importante viscosité. Vortexer la colonie dans le tampon d'extraction pendant 3 minutes et laisser incuber 10 minutes à température ambiante avant de réaliser le test.*

Réalisation du test

1 / Ouvrir le sachet et retirer le dispositif. Une fois ouvert, le test doit être utilisé immédiatement.

2 / À l'aide de la pipette fournie, prélever 100µL du mélange préparé (faire monter l'échantillon jusqu'au trait noir indiqué sur la pipette) et les déposer dans le puits chantillon marqué "S".

3 / Lire les résultats à 15 minutes et les interpréter comme indiqué ci-dessous.

NOTE : *Ne pas interpréter les résultats du test après 20 minutes, les résultats pouvant varier et causant potentiellement des résultats faux positifs.*

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS



NÉGATIF

Résultat négatif

Si une seule bande de couleur rouge apparaît sur la zone contrôle (C) : l'échantillon ne contient pas d'enzyme CTX-M ou en contient un niveau non détectable et doit être interprété comme un résultat négatif.

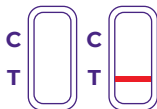


POSITIF

Résultat positif

Si deux bandes de couleur rouge apparaissent, une sur la zone contrôle (C) et une autre dans la zone test (T) : l'échantillon contient une enzyme CTX-M et doit être interprété comme un résultat positif.

NOTE : L'intensité de la couleur rouge de la ligne de test (T) varie en fonction de la concentration d'enzyme CTX-M présente dans l'échantillon. Une ligne d'intensité faible doit être considérée comme un résultat positif.



INVALIDE

Résultat invalide

Si la bande de contrôle (C) n'apparaît pas, le résultat du test n'est pas valide. Un volume d'échantillon insuffisant ou une procédure incorrecte sont les raisons les plus fréquentes de l'absence de ligne de contrôle. Une dégradation du coffret peut avoir eu lieu. Répétez la procédure en utilisant un nouveau test. Si le problème persiste, ne pas réutiliser le coffret et contacter votre distributeur.

CONTRÔLE QUALITÉ

Un contrôle de qualité interne est inclus dans le test. L'apparition de la bande de contrôle confirme un volume d'échantillon suffisant et une procédure correcte.

LIMITATIONS

Ce test est qualitatif et en conséquence ne peut pas fournir une valeur quantitative.

Ce test de première intention permet une stratification rapide des patients.

Les résultats obtenus doivent être confirmés par des procédures de diagnostic alternatives ou complémentaires.

Un test positif ou négatif n'écarte pas la présence d'autres mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Des réactions croisées peuvent se produire avec des souches exprimant des enzymes BLSE OXY-like, généralement exprimées par *Klebsiella oxytoca*.

PERFORMANCES ET CARACTÉRISTIQUES

Limite de détection:

La limite de détection a été déterminée l'aide d'enzymes recombinantes purifiées.

• **Group 1** / CTX-M-15 250 pg/mL

• **Group 2** / CTX-M-2 600 pg/mL

• **Group 9** / CTX-M-14 100 pg/mL

NG-Test[®] CTX-M Multi détecte les variants suivants :

• **Group 1** / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182

• **Group 2** / CTX-M-2

• **Group 8** / CTX-M-8

• **Group 9** / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93

• **Group 25** / CTX-M-94, -100

Évaluation clinique :

NG-Test® CTX-M Multi a été évalué sur 165 souches cliniques (BLSE caractérisées par PCR) au CNR (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques) du Kremlin Bicêtre Paris-France.

Table 1:

		STATUT		
		résultat POSITIF	résultat NÉGATIF	TOTAL
NG•TEST® CTX-M Multi	POSITIF	149	0	149
	NÉGATIF	0	16	16
	TOTAL	149	16	165

SENSIBILITÉ	100%	INTERVALLE DE CONFIANCE	95% [97.5% ; 100%]
SPÉCIFICITÉ	100%	INTERVALLE DE CONFIANCE	95% [80.6% ; 100%]

BIBLIOGRAPHIE

1. Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
2. Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
3. Hasan Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella* spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
4. R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum - Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
5. Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases - www.cdc.gov/eid - Vol. 15, No. 5, May 2009.
6. 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; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
7. Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frontiers in microbiology, volume 3, articles 110.
8. Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum lactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355-358.
9. David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2005, p. 657-686 Vol. 18, No. 4.
10. 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) 18: 18.
11. Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC,Davangere.CTX-M β -lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.
12. Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - Korean J Intern Med 2014;29:27-30
13. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101.

14. Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfar, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa 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-negative Isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology, July 2014 Vol. 23, No. 3.

15. L. Dortet, L. Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended- Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. Journal of Clinical Microbiology- October 2014 Volume 52 Number 10.

SYMBOLES



Contenu suffisant pour 20 tests



Date d'expiration



30°C
Limites de température de conservation (4°C-30°C)



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Ne pas réutiliser



N° de lot



Référence du produit



Consulter les instructions d'utilisation



Fabricant



Ce test a été développé en collaboration avec le CEA*.

*Le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives est un acteur français majeur de la recherche technologique et de l'innovation.

ÚVOD

NG-Test® CTX-M Multi je kvalitativní rychlý imunologický test pro detekci širokospektrých β-laktamáz (ESBL) CTX-M skupin 1, 2, 8, 9 a 25 z kolonií bakteriálních kultur. Jedná se o *in vitro* diagnostický test určený pouze pro laboratorní použití, který pomáhá detekovat širokospektré β-laktamázy (ESBL) produkované Enterobacterales.

SOUHRN

β-laktamy jsou antibiotika první volby pro léčbu infekcí způsobených Enterobacterales. Nicméně již od počátku jejich masivního používání ve čtyřicátých letech dvacátého století byla jejich účinnost omezena produkcí enzymů, které je inaktivují: β-laktamá zám. β-laktamázy s rozšířeným spektrem (ESBL) hydrolyzují většinu β-laktamů, kromě cefamycinů (cefotixin) a karbapenemů.

Epidemiologie ESBL produkovaných enterobakteriemi se nedávno změnila díky rozšíření enzymu typu CTX-M. V devadesátých letech 20. století byly hlavní ESBL odvozeny od enzymů typu TEM a SHV a byly šířeny nemocničními klony *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter* spp. Šíření enzymů CTX-M v rámci druhu *Escherichia coli* tuto situaci změnilo. Do dnešní doby bylo identifikováno a popsáno více jak 170 variant CTX-M v pěti hlavních skupinách (CTX-M skupina 1, 2, 8, 9 a 25). Dominantní varianty se geograficky liší. Nicméně CTX-M-15 (skupina 1) a CTX-M-14 (skupina 9) jsou rozšířené celosvětově, následovány CTX-M-2 (skupina 2). Kdekoli na světě nyní enzymy CTX-M převládají mezi ESBL enzymy a jejich rozšíření se dá kvalifikovat jako pandemické. Jsou izolované jak v komunitě, tak v nemocnicích a jejich výskyt je endemický v zařízeních dlouhodobé péče. Zvyšující se prevalence ESBL v komunitě vytváří bezprecedentní problém: příliv multirezistentních bakterií z komunitního do nemocničního prostředí.

PRINCIP

NG-Test® CTX-M Multi je imunologický test k rychlé detekci širokospektrých β-laktamáz CTX-M skupin 1, 2, 8, 9 a 25 z kolonií bakteriálních kultur kultivovaných (přes noc) na pevném agaru a zpracovaných v extrakčním pufru. Test se provádí dávkováním dostatečného objemu vzorku do jamky (S) v kazetě. Vzorek migruje směrem ke konjugační podložce, na které jsou značené monoklonální protilátky zacílené proti CTX-M-15. Je-li enzym CTX-M přítomný, je jeho komplex s monoklonálními protilátkami zachycen v testovací zóně (T) pomocí dalších monoklonálních protilátek zacílených proti CTX-M. Kontrolní proužek C je tvořen značenými streptavidinovými a monoklonálními protilátkami reagujícími s biotin-BSA a kozmi anti-mýšmi polyklonálními protilátkami imobilizovanými na membráně. Pokud je vzorek pozitivní na CTX-M ze skupin 1, 2, 8, 9 nebo 25, objeví se červený proužek jak v testovací oblasti „T“, tak i v kontrolní oblasti „C“. Není-li ve vzorku enzym CTX-M přítomný, bude červený proužek přítomný pouze v kontrolní oblasti (C).

DODÁVANÁ ČINIDLA A MATERIÁLY

Každý sada obsahuje:

- 20 testovacích kazetek v hliníkových obalech s desikantem
- 20 mikrozkrumavek
- 20 jednorázových pipet o objemu 100 µL
- 1 roztok extrakčního pufru v plastové lahvičce (4,5 mL)
- 1 návod k použití

POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

stopky • ochranné rukavice • bakteriologická klička • Vortex

UPOZORNĚNÍ

- Diagnostický test *in vitro*. Pouze pro laboratorní použití.
- Všechny postupy musí být prováděny v souladu se správnou laboratorní praxí.
- Nepoužívejte po uplynutí data expirace.

- Testovací kazety musí zůstat až do použití v uzavřeném hliníkovém obalu.
- Zacházejte se vzorky, jako by byly potencionálně infekční.
- Po použití vyhodte kazety do infekčního odpadu.
- Kazety nepoužívejte opakovaně.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Uchovávejte kazety v jejich uzavřených obalech mezi 4 až 30°C. Výrobek je stabilní do uplynutí expirace vyznačené na obalu soupravy.

KULTURY A PŘÍPRAVA VZORKU

Testované vzorky by měly být odebrány a zpracovávány podle standardních mikrobiologických postupů.

Pomocí klíčky odeberte kolonii z kultury vyrostlé na pevném agaru a následně ji resuspendujte v dodávaném extrakčním pufru. Pro optimální průběh testu je doporučeno používat čerstvé bakteriální kolonie.

Validovaná kultivační média:

Mueller Hinton (MH) agar, URiselect 4 (URI-4), Columbia agar + 5% koňské krve, ChromID ESBL agar, Drigalski (DRIG) agar.

PRACOVNÍ POSTUP

1 / Používejte ochranné rukavice.

2 / Temperujte komponenty soupravy při pokojové teplotě po dobu nejméně 10 minut.

Příprava vzorku

1 / Napipetujte 5 kapek (150µL) extrakčního pufru do dodávané zkumavky Eppendorf.

2 / Klíčkou odeberte kolonii z kultury vyrostlé na pevném agaru, a následně ji resuspendujte ve zkumavce obsahující extrakční pufr.

3 / Uzavřete zkumavku.

4 / Homogenizujte danou směs pomocí vortexu.

POZNÁMKA: Mukózní kolonie mohou způsobovat problémy díky jejich vysoké viskozitě. Takovéto kolonie vortexujte po dobu 3 minut v extrakčním pufru a před prováděním testu inkubujte 10 minut při pokojové teplotě.

Provedení testu

1 / Otevřete obal a vyjměte testovací kazetu. Po otevření obalu proveďte test ihned.

2 / Pomocí dodané pipety odeberte 100µL připravené směsi (na pipetě je hranice 100µl označena černou čarou) a napipetujte ji do jamky (označené „S“) na kazetě.

3 / Výsledek odečtete za 15 minut, jak je uvedeno níže.

POZNÁMKA: Neodečítejte výsledky po uplynutí doby delší než 20 minut z důvodu možné falešné pozitivivity.

INTERPRETACE VÝLEDKŮ



NEGATIVNÍ

Negativní výsledek

Červený proužek pouze v kontrolní zóně (C): vzorek neobsahuje enzym CTX-M nebo jeho detekovatelnou hladinu a výsledek by měl být interpretován jako negativní

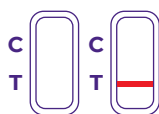


POZITIVNÍ

Pozitivní výsledek

Objevte se dva červené proužky, jeden v kontrolní zóně (C) a druhý v testovací zóně (T): vzorek obsahuje enzym CTX-M a výsledek by měl být interpretován jako pozitivní.

POZNÁMKA: Intenzita červeného proužku v testovací oblasti (T) se může lišit v závislosti na množství CTX-M enzymu ve vzorku. I slabý proužek by měl být považován za pozitivní výsledek.



NEPLATNÝ

Neplatný výsledek

Proužek v kontrolní zóně (C) chybí – výsledek testu je neplatný. Nejčastějšími důvody absence proužku v kontrolní zóně (C) jsou nedostatečný objem vzorku nebo nesprávné provedení postupu testu. Mohlo také dojít k degradaci testovacího kitu. Opakujte postup za použití nového testu (kazety). Pokud problém přetrvává, nepoužívejte daný kit a kontaktujte svého distributora.

KONTROLA KVALITY

Vnitřní kontrola kvality je součástí testu. Přítomnost kontrolního proužku potvrzuje dostatečný objem vzorku a správné provedení testu.

OMEZENÍ

Tento test je testem kvalitativním, takže nemůže poskytnout žádný kvantitativní výsledek.

Tento test umožňuje rychlou stratifikaci pacientů.

Získané výsledky by měly být potvrzeny provedením alternativní nebo kompletnější diagnostické metody.

Pozitivní test nevylučuje přítomnost jiných mechanismů rezistence k β -laktámům.

Některé zkřížené reakce se mohou vyskytnout u kmenů exprimujících enzymy ESBL podobné OXY, které obvykle exprimují druhy *Klebsiella oxytoca*.

DETEKČNÍ CHARAKTERISTIKA

Detekční limit:

Detekční limit byl stanoven za použití purifikovaného rekombinantního enzymu.

- Skupina 1 / CTX-M-15 250 pg/mL
- Skupina 2 / CTX-M-2 600 pg/mL
- Skupina 9 / CTX-M-14 100 pg/mL

NG-Test® CTX-M Multi detekuje následující varianty:

- Skupina 1 / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
- Skupina 2 / CTX-M-2
- Skupina 8 / CTX-M-8
- Skupina 9 / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
- Skupina 25 / CTX-M-94, -100

Validace:

NG-Test® CTX-M Multi byl evaluován na 165 kmenech (charakterizace obsahu β -laktamázy pomocí PCR) v NRC (AMR French National Reference Centre) CHU Kremlin Bicêtre Paris-Francie.

Table 1:

		STATUT		
		výsledek POZITIVNÍ	výsledek NEGATIVNÍ	CELKEM
NG-TEST® CTX-M Multi	POZITIVNÍ	149	0	149
	NEGATIVNÍ	0	16	16
	CELKEM	149	16	165

SENZITIVA	100%	INTERVAL SPOLEHLIVOSTI 95% [97.5% až 100%]
SPECIFICITA	100%	INTERVAL SPOLEHLIVOSTI 95% [80.6% až 100%]

LITERATURA

- Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
- Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
- Hasan Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β -Lactamase Producing Klebsiella spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
- R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum - Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
- Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β -Lactamases in Escherichia coli from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases - www.cdc.gov/eid - Vol. 15, No. 5, May 2009.
- Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gramnegative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
- Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frintier in microbiology, volume 3, articles 110.
- Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli and its CTX-M-15-like extended-spectrum lactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355-358.
- David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2005, p. 657-686 Vol. 18, No. 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) 18: 18.
- Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC,Davangere.CTX-M β -lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.
- Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - Korean J Intern Med 2014;29:27-30
- Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101.
- Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfar, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa 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-negative Isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology, July 2014 Vol. 23, No. 3.
- L. Dortet, L.Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended- Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. Journal of Clinical Microbiology- October 2014 Volume 52 Number 10.

SYMBOLY



Lze použít pro 20 testů



In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek



Číslo šarže



Viz návod k použití



Datum expirace



Nepoužívejte opakovaně



Referenční katalogové číslo



Výrobce



Teplotní rozmezí od do



Tento test byl vyvinut ve spolupráci s CEA[®].
*Francouzská Komise pro atomovou energii a alternativní energie a je klíčovým hráčem ve výzkumu, vývoji a inovacích.

VERWENDUNG

NG-Test[®] CTX-M Multi ist ein schneller Immunoassay für den qualitativen Nachweis von CTX-M-Gruppen 1, 2, 8, 9 und 25 in einer Bakterienkultur. Dies ist ein *In-vitro* Diagnostikassay nur für den professionellen Gebrauch zur Erkennung von β -Lactamasen mit erweitertem Spektrum (ESBLs), die von Enterobakterien produziert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

β -Lactam-Antibiotika sind Erstlinien-Antibiotika für die Behandlung von Infektionen durch Enterobakterien. Jedoch wurde seit Beginn ihrer Massenanwendung in den 1940er Jahren ihre Wirksamkeit mit der Produktion von Enzymen mit inaktivierender Wirkung konfrontiert: den β -Lactamasen. Dazu zählen β -Lactamasen mit erweitertem Spektrum (ESBLs), die die Mehrheit der β -Laktame hydrolysieren, nur Cephamycine (wie Cefoxitin) und Carbapeneme sind nicht betroffen.

Die Epidemiologie der ESBLs in Enterobakterien hat sich in jüngster Zeit mit der massiven Verbreitung von CTX-M-Enzymen verändert. In den 1990er Jahren wurden die wichtigsten ESBLs von Enzymen des TEM- und SHV-Typs abgeleitet und hauptsächlich in Krankenhauskolonien von *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter* sp. verbreitet. Durch die Verbreitung von CTX-M innerhalb der *Escherichia coli*-Arten hat sich diese Situation verändert. Derzeit wurden mehr als 170 CTX-M Varianten identifiziert und in 5 Hauptgruppen (CTX-M Gruppen 1, 2, 8, 9 und 25) eingeteilt. Dominierende Varianten variieren geografisch. CTX-M-15 (Gruppe 1) und CTX-M-14 (Gruppe 9) sind jedoch weltweit am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von CTX-M-2 (Gruppe 2).

CTX-Ms bilden heute die Mehrheit der ESBLs in allen Regionen der Welt und haben sich so stark verbreitet, dass sie als Pandemie eingestuft wurden. In Heimen und Krankenhäusern treten sie isoliert auf und scheinen in Langzeitpflegeeinrichtungen endemisch zu sein. Die zunehmende Prävalenz von ESBLs in Heimen schafft ein neues Problem, nämlich die Ausbreitung von multiresistenten Bakterien vom Heim- ins Krankenhausumfeld.

PRINZIP

NG-Test[®] CTX-M Multi ist ein gebrauchsfertiger schneller Immunoassay zum Nachweis von CTX-M β -Lactamasen der Gruppen 1, 2, 8, 9 und 25, die von einer Agarplatte einer Bakterienkultur (über Nacht) entnommen und in einem Extraktionspuffer dispergiert werden.

Das Assay wird durch Dispensierung der Probe in der Probenvertiefung der Testkassette durchgeführt. Die Probe migriert zum Konjugat-Pad und falls CTX-M Enzyme vorhanden sind, reagieren sie mit markierten monoklonalen anti-CTX-M Maus-Antikörpern. Der Komplex migriert mittels Kapillarität durch die Nitrozellulosemembran und interagiert mit den anti-CTX-M mausmonoklonaren Antikörpern, die am Testbereich "T" der Membran immobilisiert sind.

Der Kontrollstreifen C mit markiertem Streptavidin und monoklonalen Antikörpern reagiert mit Biotin-BSA und Ziege-Anti-Maus polyklonalen Antikörpern, die an der Membran immobilisiert sind.

Das Vorhandensein von CTX-M der Gruppen 1, 2, 8, 9 oder 25 wird durch eine rote Linie im Testbereich "T" und im Kontrollbereich "C" der Membran angezeigt. Wenn die Probe kein CTX-M enthält, wird nur eine rote Linie im Kontrollbereich "C" angezeigt.

REAGENZIEREN UND MITGELIEFERTES MATERIAL

Jedes Test-Set enthält:

- 20 Testkassetten in Aluminiumbeuteln mit Trockenmittel
- 20 Mikroröhrchen
- 20 Einmalpipetten 100 μ L
- 1 Extraktionspuffer-lösung in Kunststoffflasche (4,5 mL)
- 1 Bedienungsanleitung

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Stoppuhr • Einweghandschuhe • Öse • Vortexmischer

VORSICHTSMAßNAHMEN

- *In vitro*-Diagnostiktest. Nur für den professionellen Gebrauch.
- Alle Maßnahmen sind gemäß guter Laborpraxis durchzuführen.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Die Produkte müssen bis zu ihrer Verwendung in den verschlossenen Beuteln aufbewahrt werden.
- Die Proben müssen als potenziell infektiös behandelt werden.
- Die gebrauchten Tests nach der Verwendung in einem Behälter für infektiöse Abfälle entsorgen.
- Die Produkte dürfen nicht wiederverwendet werden.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Produkte müssen im geschlossenen Beutel zwischen 4 und 30°C aufbewahrt werden. Nicht einfrieren. Die Sets sind bis zu dem auf jedem Set angegebenen Verfallsdatum stabil.

NÄHRMEDIUM UND PROBENGEWINNUNG

Die zu untersuchenden Proben müssen nach mikrobiologischen Standardverfahren gewonnen und behandelt werden. Eine Kolonie wird von einer Agarplatte entnommen und dann im Extraktionspuffer, der im Set enthalten ist, suspendiert. Um eine optimale Leistungsfähigkeit des Assays zu erzielen, wird dringend empfohlen, frische Bakterienkolonien zu verwenden.

Validierte Nährmedien:

Mueller Hinton (MH) agar, URiselect-4 (URI-4), Columbia agar + 5 %Pferd Blut, ChromID ESBL agar, Drigalski (DRIG) agar.

ARBEITSANWEISUNGEN

1/ Schutzhandschuhe tragen.

2/ Die Bestandteile des Sets für mindestens 10 Minuten auf Raumtemperatur bringen.

Probenvorbereitung

1/ 5 Tropfen (150µL) des Extraktionspuffers in ein mitgeliefertes Eppendorf-Röhrchen geben.

2/ Von einer Kultur auf einer Agarplatte mithilfe einer Öse eine Kolonie entnehmen und dann im Eppendorf-Röhrchen mit 150µL Extraktionspuffer-Lösung suspendieren.

3/ Mikroröhrchen verschließen.

4/ Mit dem Vortexmischer mischen, um die Mischung vor dem Gebrauch zu homogenisieren.

HINWEIS: *Mukoide Kolonien können aufgrund ihrer hohen Viskosität zu Migrationsproblemen führen. Eine Kolonie in Extraktionspuffer 3 Minuten lang vortexen und vor der Durchführung des Tests 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.*

Durchführung des Tests

1/ Den Beutel öffnen und das Set entnehmen. Den Test sofort nach dem Öffnen verwenden.

2/ Mit Hilfe der mitgelieferten Pipette 100µL der vorbereiteten Mischung entnehmen (die Probe bis zum auf der Pipette angegebenen schwarzen Strich ansaugen, um genau 100µL anzusaugen) und in die mit „S“ gekennzeichnete Probenmulde geben.

3/ Das Ergebnis nach 15 Minuten wie unten angegeben ablesen.

HINWEIS: *Die Testergebnisse nicht nach 20 Minuten auswerten, da sie variieren und m gleicherweise zu falsch positiven Ergebnissen führen können.*

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE



NEGATIVES

Negatives Ergebnis

Wenn im Kontrollbereich (C) nur eine rote Linie erscheint: Die Probe enthält keine CTX-M Enzyme oder einen nicht nachweisbaren Pegel und muss daher als negatives Ergebnis gewertet werden.

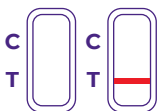


POSITIVES

Positives Ergebnis

Wenn zwei rote Linien erscheinen, eine im Kontrollbereich (C) und eine im Testbereich (T): die Probe enthält CTX-M Enzyme und muss als positives Ergebnis gewertet werden.

HINWEIS: Die Intensität der roten Farbe der Testlinie (T) variiert je nach CTX-M-Enzymgehalt der Probe. Eine Linie mit geringer Farbintensität gilt als positives Ergebnis.



UNGÜLTIGES

Ungültiges Ergebnis

Wird die Kontrolllinie (C) nicht angezeigt, ist das Testergebnis ungültig. Ein zu geringes Volumen der Probe oder falsche Handhabung sind die häufigste Ursache für das Fehlen der Kontrolllinie.

Das Testset könnte auch beschädigt worden sein. Wiederholen Sie den Vorgang mit einem neuen Test. Wenn das Problem weiterhin besteht, das Set nicht wiederverwenden und Ihren Händler kontaktieren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Im Test ist eine interne Kontrolle enthalten. Die Anzeige der Kontrolllinie "C" bestätigt ein ausreichendes Probenvolumen und eine korrekte Vorgehensweise.

EINSCHRÄNKUNGEN

Dieser Test ist ein qualitativer Assay und kann daher keine quantitativen Ergebnisse liefern.

Dieser Erstlinien-Test dient zur schnellen Stratifizierung der Patienten.

Die erzielten Ergebnisse müssen durch alternative oder zusätzliche Diagnoseverfahren bestätigt werden.

Ein positiver oder negativer Test schließt das Vorhandensein anderer Antibiotika-Resistenz-Mechanismen nicht aus.

Kreuzreaktivität kann mit Stämmen auftreten, die OXY-ähnliche ESBL-Enzyme exprimieren, welche in der Regel von *Klebsiella oxytoca* Arten exprimiert werden.

TESTLEISTUNGEN UND EIGENSCHAFTEN**Nachweisgrenze:**

Die Nachweisgrenze wurde mittels gereinigter rekombinanter Enzyme festgestellt:

- **Gruppe 1** / CTX-M-15 250 pg/mL
- **Gruppe 2** / CTX-M-2 600 pg/mL
- **Gruppe 9** / CTX-M-14 100 pg/mL

NG-Test[®] CTX-M Multi weist die folgenden Varianten nach:

- **Gruppe 1** / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
- **Gruppe 2** / CTX-M-2
- **Gruppe 8** / CTX-M-8
- **Gruppe 9** / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
- **Gruppe 25** / CTX-M-94, -100

Evaluierungsstudie:

Der **NG-Test[®] CTX-M Multi** wurde anhand von 165 Isolaten (PCRmarkierter ESBL-Gehalt) im NRC (Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques), Hôpital du Kremlin-Bicêtre, Paris, Frankreich evaluiert.

Table 1:

		STATUT		
		POSITIVES ergebnis	NEGATIVES ergebnis	GESAMT
NG•TEST[®] CTX-M Multi	POSITIV	149	0	149
	NEGATIV	0	16	16
	GESAMT	149	16	165
SENSITIVITÄT	100%	KONFIDENZINTERVALL 95% [97.5% ; 100%]		
SPEZIFITÄT	100%	KONFIDENZINTERVALL 95% [80.6% ; 100%]		

BIBLIOGRAPHIE

1. Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
2. Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
3. Hasan Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella* spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
4. R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum - Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
5. Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases - www.cdc.gov/eid - Vol. 15, No. 5, May 2009.
6. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gramnegative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
7. Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frontier in microbiology, volume 3, articles 110.
8. Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum lactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355-358.

9. David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology reviews*, Oct. 2005, p. 657–686 Vol. 18, No. 4.
10. 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) 18: 18.
11. Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC,Davangere.CTX-M β -lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.
12. Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - *Korean J Intern Med* 2014;29:27-30
13. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013; 39(1): 79–101. Genes among the Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing Gram-negative Isolates. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, July 2014 Vol. 23, No. 3.
14. Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfar, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa M. Noor-eldeen and Nahla A. Nosair. Multiplex PCR for Detection of bla CTX-M
15. L. Dortet, L.Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended- Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. *Journal of Clinical Microbiology*- October 2014 Volume 52 Number 10.

SYMBOLE

	Inhalt ausreichend für 20 Tests		Mindesthaltbarkeitsdatum	 Temperaturgrenze
	In-Vitro-Diagnostikum		Einmalige Verwendung	
	Chargennummer		Katalogverweis	
	Gebrauchsanleitung lesen		Hersteller	

cea

Dieser Test wurde in Zusammenarbeit mit dem CEA* entwickelt.

*Das Commissariat für Atomenergie und alternative Energien (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives) ist ein wichtiger französischer Akteur in Forschung, Entwicklung und Innovation.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δοκιμή **NG-Test[®] CTX-M Multi** είναι μία ταχεία ποιοτική ανοσολογική δοκιμή ανίχνευσης των ομάδων 1,2,8,9 και 25 CTX-M σε μία αποικία βακτηρίων που λαμβάνεται από καλλιέργεια. Είναι μια *in vitro* διαγνωστική μέθοδος, για επαγγελματική χρήση μόνο, που να ανιχνεύουν οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) που παράγονται από τα Enterobacterales.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι β-λακτάμες είναι αντιβιοτικά πρώτης επιλογής για την θεραπεία μολύνσεων που οφείλονται στα Enterobacteriaceae. Παρ' όλα αυτά, από τότε που ξεκίνησε η μαζική χρήση τους κατά τη δεκαετία του 1940, η αποτελεσματικότητά τους αμφισβητήθηκε από τη παραγωγή ενζύμων που τις απενεργοποιούν, τις β-λακταμάσες. Μεταξύ αυτών οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) υδρολύουν τις περισσότερες β-λακτάμες εξαιρουμένων μόνον των cephamycins (όπως η ceftioxitin) και των carbapenems.

Η επιδημιολογία των ESBLs στα Enterobacterales πρόσφατα έχει μεταβληθεί με την εκτεταμένη διάδοση των ενζύμων του τύπου CTX-M. Την δεκαετία του 1990, οι κύριες ESBLs προήλθαν από ένζυμα των τύπων TEM- και SHV, κυρίως εξαπλούμενες εντός νοσοκομειακών κλώνων των ειδών *Klebsiella pneumoniae* και *Enterobacterales spp.* Η διάδοση των CTX-Ms εντός των ειδών της *Escherichia coli* άλλαξε αυτή την κατάσταση. Επί του παρόντος, περισσότερες από 170 παραλλαγές CTX-M έχουν ταυτοποιηθεί και περιγραφεί σε 5 κύριες ομάδες (τις ομάδες CTX-M 1, 2, 8, 9 και 25). Οι κύριες παραλλαγές έχουν διαφορετική γεωγραφική εξάπλωση. Ωστόσο, η CTX-M-15 (ομάδα 1) και η CTX-M-14 (ομάδα 9) είναι οι περισσότερο ανιχνευόμενες σε όλο τον κόσμο, ακολουθούμενες από την CTX-M-2 (ομάδα 2).

Από όποια γεωγραφική θέση απομόνωσής τους στον κόσμο, οι CTX-Ms σήμερα αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των ESBLs, μέχρι του σημείου που η εξάπλωσή τους να θεωρείται πανδημική. Απομονώνονται με την ίδια συχνότητα σε κοινοτικές και νοσοκομειακές εγκαταστάσεις, φαίνεται όμως να ενδημούν σε μονάδες μακράς νοσηλείας. Η αυξανόμενη επικράτηση των ESBLs σε κοινοτικές εγκαταστάσεις δημιουργεί ένα πρωτοφανές πρόβλημα: την είσοδο πολυανθεκτικών βακτηρίων από τις κοινοτικές εγκαταστάσεις στις νοσοκομειακές εγκαταστάσεις.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμή NG-Test CTX-M MULTI είναι μία έτοιμη προς χρήση ταχεία ανοσοενζυμική μέθοδος ανίχνευσης των ομάδων 1, 2, 8, 9 και 25 CTX-M β-λακταμασών από μία αποικία βακτηρίων που λαμβάνεται από καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό στερεού άγαρ (16 ωρών), και επεξεργάζεται με ρυθμιστικό διάλυμα εκκύλισης.

Η μέθοδος γίνεται με τοποθέτηση δείγματος στην ειδική θέση στην κασέτα. Όταν το δείγμα οδεύει μέσω της περιοχής του συζεύγματος και αν υπάρχουν ένζυμα CTX-M τότε αντιδρούν με τα σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα μύος έναντι των ενζύμων CTX-M. Ακολούθως το σύμπλοκο οδεύει μέσω της μεμβράνης νιτροκυταρίνης με τριχοειδείς δυνάμεις και αλληλεπιδρά με τα ακινητοποιημένα στην μεμβράνη μονοκλωνικά αντισώματα μύος έναντι των ενζύμων CTX-M στην περιοχή της δοκιμής (T).

Η γραμμή ποιοτικού ελέγχου C σχηματίζεται από σημασμένη στρεπταβιδίνη και μονοκλωνικά αντισώματα που αντιδρούν με biotin-BSA και πολυκλωνικών αντισωμάτων αγός έναντι ποντικού στην μεμβράνη. Αν το δείγμα είναι θετικό για CTX-M των ομάδων 1, 2, 8, 9 και 25, θα εμφανιστεί μια κόκκινη γραμμή στην περιοχή δοκιμής (T) και στην περιοχή του μάρτυρα (C) της μεμβράνης. Αν όχι, τότε μόνο μια κόκκινη γραμμή θα εμφανιστεί στην περιοχή του μάρτυρα (C).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Κάθε κιτ περιλαμβάνει:

- 20 κασέττες δοκιμής σε θήκες αλουμινίου με αφυγραντικό
- 20 μικροσωληνάρια

- 20 αναλώσιμες πιπέττες των 100μL
- 1 Ρυθμιστικό διάλυμα εκκύλισης σε πλαστικό φιαλίδιο (4,5 mL)
- 1 φυλλάδιο

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Χρονόμετρο • Γάντια μιας χρήσης • Κρίκοι • Vortex

ΠΡΟΦΥΛΑΞΙΣ

- *In vitro* Διαγνωστική δοκιμή. Για επαγγελματική μόνο χρήση.
- Όλες οι εργασίες θα πρέπει να διεξάγονται σύμφωνα με την καλή εργαστηριακή πρακτική.
- Μην το χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης.
- Οι συσκευές θα πρέπει να παραμένουν στις σφραγισμένες θήκες μέχρι να χρησιμοποιηθούν.
- Χειριστείτε τα δείγματα σαν να ήταν δυνητικά μολυσματικά.
- Μετά τη χρήση, απορρίψτε την συσκευή σε ένα δοχείο απόρριψης για μολυσματικά.
- Μην ξαναχρησιμοποιείτε την συσκευή.

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Φυλάξτε τις συσκευές στις σφραγισμένες θήκες τους μεταξύ 4 και 30°C. Μην καταψύχετε. Τα κιτ είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στη ετικέτα του κουτιού.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Τα δείγματα που θα δοκιμαστούν πρέπει να λαμβάνονται και να χειρίζονται σύμφωνα με τις τυποποιημένες διαδικασίες για την μικροβιολογία. Μια αποικία θα συλλεχθεί σε καλλιέργημα από στερεό θρεπτικό υλικό. Συστήνεται να χρησιμοποιούνται φρέσκες αποικίες βακτηρίων ώστε η απόδοση της μεθόδου να είναι η βέλτιστη.

Πιστοποιημένα καλλιεργητικά μέσα:

Mueller Hinton (MH) agar και URSelect 4 (URI-4), Columbia agar + 5% horse blood, ChromID ESBL agar, Drigalski (DRIG) agar.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1 / Φοράτε προστατευτικά γάντια.

2 / Αφήστε τα συστατικά του κιτ σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 10 λεπτά.

Προετοιμάζοντας το δείγμα

1 / Διανείμετε 5 σταγόνες (150μL) του διαλύματος εκκύλισης στο παρεχόμενο μικροσωληνάριο στο κιτ.

2 / Στο καλλιέργημα από στερεό θρεπτικό υλικό, συλλέξτε την αποικία με ένα κρίκο, και μετά διασπείρετε στο σωληνάριο που περιέχει τα 150μL του διαλύματος εκκύλισης.

3 / Κλείστε το μικροσωληνάριο.

4 / Ανακινήστε με το vortex για να ομογενοποιηθεί το μίγμα πριν τη χρήση.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Οι βλεννώδεις αποικίες είναι δυνατόν να προξενήσουν δυσκολίες στη μετακίνηση τους λόγω του μεγάλου ιξώδους. Συνιστάται ανακίνηση της αποικίας με Vortex για 3 λεπτά στο διάλυμα εκκύλισης και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν ξεκινήσετε τη δοκιμή.

Διεξάγοντας την δοκιμή

1 / Ανοίξτε την θήκη, και βγάλτε έξω την συσκευή. Εφόσον ανοιχθεί χρησιμοποιήστε την αμέσως.

2 / Με την παρεχόμενη πιπέτα, προσθέστε 100μL του προετοιμασμένου μίγματος (το δείγμα θα πρέπει να φτάνει στην μαύρη γραμμή που φαίνεται στην πιπέτα για να μεταφερθούν με ακρίβεια 100μL) στο βύθισμα με τη σήμανση "S".

3 / Διαβάστε τα αποτελέσματα σε 15 λεπτά και ερμηνεύστε αυτά όπως φαίνεται παρακάτω.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Μην ερμηνεύετε τα αποτελέσματα της δοκιμής μετά από 20 λεπτά, διότι μπορεί να ποικίλουν προκαλώντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ



ΑΡΝΗΤΙΚΟ

Αρνητικό αποτέλεσμα

Αν μόνο μια κόκκινη γραμμή εμφανίζεται στην περιοχή του μάρτυρα (C): το δείγμα δεν περιέχει κάποιο ένζυμο CTX-M ή οποιαδήποτε ανιχνεύσιμη ποσότητα αυτού και πρέπει να ερμηνευτεί σαν αρνητικό αποτέλεσμα.

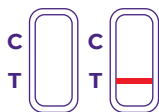


ΥΙΜ ΘΕΤΙΚΟ

Θετικό αποτέλεσμα

Αν δύο κόκκινες γραμμές εμφανίζονται, μια στην περιοχή του μάρτυρα (C) και μια στην περιοχή δοκιμής (T): το δείγμα περιέχει ένζυμο CTX-M και πρέπει να ερμηνευτεί σαν θετικό αποτέλεσμα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η ένταση της κόκκινης γραμμής της δοκιμής (T) μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το επίπεδο του ενζύμου CTX-M στο δείγμα. Η ακνή γραμμή θα πρέπει να θεωρηθεί ως θετικό αποτέλεσμα.



ΑΚΥΡΟ

Άκυρο αποτέλεσμα

Αν η γραμμή του μάρτυρα (C) δεν εμφανίζεται, η δοκιμή δεν είναι έγκυρη. Οι πιο πιθανές αιτίες για την αποτυχία της γραμμής του μάρτυρα είναι ο ανεπαρκής όγκος δείγματος ή η λανθασμένη διαδικασία.

Θα μπορούσε να έχει συμβεί αλλοίωση του κιτ. Επαναλάβετε την διαδικασία χρησιμοποιώντας ένα καινούριο τεστ. Αν το πρόβλημα επιμένει μην ξαναχρησιμοποιήσετε το κιτ και επικοινωνήστε με τον αντιπρόσωπο σας.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Περιλαμβάνεται εσωτερικός μάρτυρας στο τεστ. Όταν η γραμμή του μάρτυρα αναπτύσσεται, αυτό βεβαιώνει ότι ο όγκος του δείγματος ήταν επαρκής και η διαδικασία ήταν σωστή.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η δοκιμή αυτή είναι ποιοτική μέθοδος, και έτσι δεν μπορεί να δώσει ένα ποσοτικό αποτέλεσμα.

Αυτή η δοκιμή πρώτης γραμμής επιτρέπει μια γρήγορη ικανοποίηση των ασθενών.

Τα λαμβανόμενα αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με μία εναλλακτική ή συμπληρωματική διαγνωστική μέθοδο.

Μια θετική ή αρνητική δοκιμή δεν θα πρέπει να αποκλείει την παρουσία άλλων μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά.

Ορισμένες διασταυρούμενες αντιδράσεις μπορούν να συμβούν με στελέχη που εκφράζουν ένζυμα ESBL τύπου OXY (OXY-like), τα οποία συνήθως εκφράζονται από το είδος *Klebsiella oxytoca*.

ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Όριο ανίχνευσης:

Το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας κεκαθαρωμένα ανασυνδυασμένο ένζυμο :

- **ομάδα 1** / CTX-M-15 250 pg/mL
- **ομάδα 2** / CTX-M-2 600 pg/mL
- **ομάδα 9** / CTX-M-14 100 pg/mL

Το **NG-Test® CTX-M Multi** προσδιορίζει τουλάχιστον τις παρακάτω παραλλαγές από τις ομάδες 1, 2, 8, 9 και 25:

- **ομάδα 1** / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
- **ομάδα 2** / CTX-M-2
- **ομάδα 8** / CTX-M-8
- **ομάδα 9** / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
- **ομάδα 25** / CTX-M-94, -100

Μελέτη αξιολόγησης της μεθόδου:

Το **NG-Test® CTX-M Multi** ελέγχθηκε σε 165 απομονώσεις (που με PCR ευρέθηκαν θετικές σε περιεχόμενο ESB�) στο NRC (AMR French National Reference Centre) του CHU Kremlin Bicêtre Paris-France.

Πίνακας 1:

		ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ		
		Θετικό αποτέλεσμα	Αρνητικό αποτέλεσμα	Σύνολο
NG-TEST® CTX-M Multi	Θετικό	149	0	149
	Αρνητικό	0	16	16
	Σύνολο	149	16	165
ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	100%	διάστημα εμπιστοσύνης 95% [97.5% ; 100%]		
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	100%	διάστημα εμπιστοσύνης 95% [80.6% ; 100%]		

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
2. Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
3. Hasan Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β-Lactamase Producing Klebsiella spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
4. R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum - Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
5. Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β-Lactamases in Escherichia coli from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases · www.cdc.gov/eid · Vol. 15, No. 5, May 2009.
6. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gramnegative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
7. Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frontiers in microbiology, volume 3, articles 110.

8. Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli and its CTX-M-15-like extended-spectrum lactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355–358.
9. David L. Paterson¹ and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2005, p. 657–686 Vol. 18, No. 4.
10. 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) 18: 18.
11. Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC, Davangere. CTX-M β-lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.
12. Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - Korean J Intern Med 2014;29:27-30
13. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79–101.
14. Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfar, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa 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-negative Isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology, July 2014 Vol. 23, No. 3.
15. L. Dortet, L. Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. Journal of Clinical Microbiology- October 2014 Volume 52 Number 10.

ΣΥΜΒΟΛΑ

Περιεχόμενο για 20 δοκιμασίες

*in vitro* διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν

Αριθμός παρτίδας



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης



Ημερομηνία λήξης



Να μην επαναχρησιμοποιείται



Αναφορά καταλόγου



Κατασκευαστής



30°C

Όριο

θερμοκρασίας

4°C



Αυτή η δοκιμή αναπτύχθηκε σε συνεργασία με τη CEA*.

*Η Γαλλική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας και Εναλλακτικών

Πηγών Ενέργειας αποτελεί βασικό πρωταγωνιστή στους τομείς της έρευνας, της ανάπτυξης και της καινοτομίας.

INTRODUCCIÓN

NG-Test[®] CTX-M Multi es un test rápido de inmunoensayo para la detección de los grupos 1, 2, 8, 9 y 25 CTX-M de β-lactamasas en colonia bacteriana obtenida a partir de cultivo. Es una prueba de diagnóstico *in vitro*, únicamente para uso profesional que permite detectar β-lactamasas de espectro ampliado (BLEA) producido por enterobacterias.

RESUMEN

Los antibióticos β-lactámicos son los antibióticos de primera línea para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias. Sin embargo, desde que se empezaron a utilizar de manera masiva en los años 40, su eficacia ha ido decreciendo con la aparición de enzimas que los inactiva: las β-lactamasas. Dentro de este grupo, las β-lactamasas de espectro ampliado (BLEA) hidrolizan la mayoría de antibióticos β-lactámicos, no siendo afectados cefamicinas (cefotixina) ni carbapenemas.

La epidemiología de las BLEA en enterobacterias ha cambiado recientemente con la propagación de enzimas de tipo CTX-M. En los años 90, las BLEA derivaban principalmente de enzimas TEM y tipo SHV y se propagaban mediante clones hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter* spp. La difusión de las CTX-M en *Escherichia coli* ha cambiado la situación.

Actualmente se han identificado y descrito más de 170 variantes de CTX-M en 5 grupos principales (grupos 1, 2, 8, 9 y 25). Las variantes predominantes están distribuidas geográficamente de manera distinta. Las variantes más distribuidas globalmente son CTX-M-15 (grupo 1), CTX-M-14 (grupo 9) y CTX-M-2 (grupo 2).

Las CTX-M representan la mayoría de las BLEA a nivel mundial, calificándose su propagación de pandemia. Se encuentran en centros hospitalarios y entornos comunitarios y parecen ser endémicos en centros de asistencia de larga estancia. La prevalencia creciente de BLEA en entornos comunitarios está creando un problema sin precedentes: la propagación de bacterias multiresistentes desde entornos comunitarios a centros hospitalarios.

PRINCIPIO

NG-Test[®] CTX-M Multi es un test rápido de inmunoensayo listo para el uso para la detección de los grupos 1, 2, 8, 9 y 25 CTX-M de β-lactamasas en colonia bacteriana obtenida en medio de cultivo de agar sólido tras 16 horas de incubación y procesada en un tampón de extracción.

La prueba se lleva a cabo dispensando la muestra en el pozo de la placa. La muestra migra a lo largo de la placa hacia la almohadilla de conjugado y si están presentes los enzimas CTX-M, éstos reaccionan con anticuerpos marcados monoclonales de ratón anti-CTX-M. El complejo migra a lo largo de la membrana de nitrocelulosa por capilaridad e interacciona con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CTX-M inmovilizados sobre la zona de test "T".

La línea de control "C" está formada por estreptavidina marcada y anticuerpos monoclonales que reaccionan con biotina-BSA y anticuerpos policlonales inmovilizados en la membrana.

Si la muestra es positiva para CTX-M de grupos 1, 2, 8, 9 y 25, aparece una línea roja en la zona de test "T" y en la zona de control "C" de la membrana. Si la muestra es negativa, únicamente aparece la línea roja en la zona de control "C".

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

Cada kit contiene:

- 20 placas envasadas individualmente en aluminio con desecante
- 20 microtubos
- 20 pipetas desechables de 100µL
- 1 botella de solución de tampón (4,5 mL)

- 1 folleto

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Cronómetro • Guantes desechables • Asa • Vórtex

PRECAUCIONES

- Prueba de diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
- El procedimiento debe llevarse a cabo siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No utilizar si ha caducado.
- No abrir los estuches de las placas hasta su uso.
- Manipular las muestras como potencialmente infecciosas.
- Tras su uso, eliminar la placa en un contenedor de residuos infecciosos.
- No reutilizar la placa.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Conservar las placas en sus envases debidamente cerrados a 4-30°C. NO CONGELAR. Las placas son estables hasta la fecha de caducidad indicada en cada estuche.

CULTIVO Y MUESTREO

Las muestras que se van a analizar deben obtenerse y manipularse según procedimientos estandarizados de microbiología.

En una placa de cultivo de agar sólido, se toma una colonia con un asa y se suspende en el tampón de extracción.

Es altamente recomendable emplear colonias frescas para la obtención de resultados óptimos.

Medios de cultivo validados:

Mueller Hinton (MH) agar , URiselect-4 (URI-4), Columbia agar + 5 % sangre de caballo, ChromID ESBL agar, Drigalski (DRIG) agar.

PROCEDIMIENTO OPERATIVO

1 / Emplear guantes.

2 / Dejar los componentes del kit a temperatura ambiente al menos 10 minutos.

Preparación de la muestra

1 / Dispensar 5 gotas (150µL) de tampón de extracción en un tubo Eppendorf (incluido en el kit).

2 / En la placa de cultivo de agar sólido, tomar una colonia con un asa y suspenderla en el tubo que contiene 150µL de tampón de extracción.

3 / Cerrar el tubo con el tapón.

4 / Homogeneizar la mezcla con el vortex.

NOTA: *Las colonias mucosas pueden causar problemas de migración, debido a su alta viscosidad. Agite en vórtex durante 3 minutos una colonia en el tampón de extracción e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.*

Realización de la prueba

1 / Abrir el envase, extraer la placa y realizar el análisis de inmediato.

2 / Tomar 100µL de la mezcla con la pipeta (la muestra debe llegar a la línea negra de la pipeta para tomar exactamente 100µL) y dispensar el volumen adecuado en el pozo de la muestra identificado como "S".

3 / Leer los resultados a los 15 minutos e interpretarlos tal como se indica a continuación.

NOTA: *No leer el test pasados 20 minutos porque el resultado puede variar dando lugar a resultados falsos positivos.*

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



NEGATIVO

Resultado negativo

Sólo aparece una línea coloreada en la zona de control (C): la muestra no contiene enzima CTX-M o el nivel que se detecta de enzima debe interpretarse como resultado negativo.

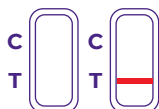


POSITIVO

Resultado positivo

Aparecen dos líneas coloreadas, una en la zona de control (C) y otra en la zona de test (T): la muestra contiene enzima CTX-M y debe interpretarse como resultado positivo.

NOTA: La intensidad de la línea de test (T) puede variar dependiendo del nivel de enzima CTX-M en la muestra. Una línea débil debe considerarse como resultado positivo.



NO VÁLIDO

Resultado no válido

Si no aparece la línea de control (C), el resultado se considera no válido. Las causas suelen ser volumen insuficiente de muestra o un procedimiento incorrecto. También puede deberse a un deterioro en el kit. Repetir el procedimiento con una nueva placa. Si persiste el problema, no volver a utilizar el kit y contactar con el distribuidor.

CONTROL DE CALIDAD

La prueba incluye un control interno. Si aparece la línea de control, se confirma que el volumen de muestra ha sido suficiente y que el procedimiento ha sido correcto.

LIMITACIONES

Ésta es una prueba cualitativa por lo que no puede proporcionar resultados cuantitativos.

Esta prueba de cribado permite una rápida clasificación de pacientes.

Los resultados obtenidos deben ser confirmados mediante procedimientos diagnósticos alternativos o complementarios.

Un resultado positivo o negativo no descarta la presencia de otros mecanismos de resistencia antibiótica.

Pueden producirse algunas reacciones cruzadas con cepas que expresan enzimas ESBL de tipo OXY, generalmente expresadas por *Klebsiella oxytoca*.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Límite de detección:

El límite de detección se determinó empleando enzimas recombinantes purificados.

- **Grupo 1** / CTX-M-15 250 pg/mL
- **Grupo 2** / CTX-M-2 600 pg/mL
- **Grupo 9** / CTX-M-14 100 pg/mL

NG-Test® CTX-M Multi detecta las siguientes variantes:

- **Grupo 1** / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
- **Grupo 2** / CTX-M-2
- **Grupo 8** / CTX-M-8
- **Grupo 9** / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
- **Grupo 25** / CTX-M-94, -100

Estudio de evaluación:

NG-Test[®] CTX-M Multi se evaluó en 165 muestras de β-lactamasas de espectro ampliado caracterizadas por PCR en el NRC (AMR French National Reference Centre) de CHU Kremlin Bicêtre Paris-France.

Tabla 1:

		STATUS		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
NG•TEST [®] CTX-M Multi	POSITIVO	149	0	149
	NEGATIVO	0	16	16
	TOTAL	149	16	165
SENSIBILIDAD	100%	INTERVALO DE CONFIANZA 95% [97.5% ; 100%]		
ESPECIFICIDAD	100%	INTERVALO DE CONFIANZA 95% [80.6% ; 100%]		

BIBLIOGRAFÍA

- Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
- Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
- Hasan Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β-Lactamase Producing Klebsiella spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
- R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum - Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
- Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β-Lactamases in Escherichia coli from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases - www.cdc.gov/eid - Vol. 15, No. 5, May 2009.
- Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gramnegative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
- Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frontier in microbiology, volume 3, articles 110.
- Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli and its CTX-M-15-like extended-spectrum lactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355-358.
- David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2005, p. 657-686 Vol. 18, No. 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) 18: 18.
- Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC, Davangere. CTX-M β-lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.
- Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - Korean J Intern Med 2014;29:27-30
- Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101.

14. Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfar, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa 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-negative Isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology, July 2014 Vol. 23, No. 3.

15. L. Dortet, L.Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended- Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. Journal of Clinical Microbiology- October 2014 Volume 52 Number 10.

SÍMBOLOS



Contenido para
20 pruebas



Fecha de
caducidad



Límites de
temperatura



Producto
de diagnóstico
in vitro



No reutilizar



Número de lote



Referencia



Consultar
instrucciones
de uso



Fabricante



Esta prueba fue desarrollada en colaboración
con la CEA (Comisión de Energía Atómica)*.

**La Comisión francesa de Energía Atómica es
un actor clave en investigación, desarrollo
e innovación

INTRODUZIONE

NG-Test® CTX-M Multi è un test immunologico rapido qualitativo per la rilevazione delle β -lattamasi CTX-M di gruppo 1, 2, 8, 9 e 25 in una colonia batterica ottenuta da coltura. È un test diagnostico *in vitro* per uso professionale, da utilizzare come ausilio nella rilevazione delle β -lattamasi a spettro esteso (ESBLs) prodotte dalle Enterobacteriales.

SOMMARIO

I β -lattamici sono antibiotici di prima linea per il trattamento delle infezioni causate da Enterobacteriales. Tuttavia, dall'inizio del loro massivo utilizzo negli anni '40, la loro efficacia sta via via contrastata dalla produzione di enzimi che li inattivano: le β -lattamasi. Tra queste vi sono le β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) in grado di idrolizzare la maggior parte dei β -lattamici, fatta eccezione solo per le cefamicine (come cefoxitin) e i carbapenemi.

L'epidemiologia delle ESBL tra le Enterobacteriales è cambiata di recente con l'ampia diffusione di enzimi di tipo CTX-M. Negli anni '90, le principali ESBL erano derivate da enzimi di tipo TEM e SHV, e prevalentemente diffuse all'interno di cloni ospedalieri di *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. La diffusione degli enzimi CTX-M tra le specie di *Escherichia coli* ha modificato questa situazione. Attualmente, sono state identificate e descritte più di 170 varianti CTX-M in 5 gruppi principali (gruppi CTX-M 1, 2, 8, 9 e 25). Le varianti dominanti sono geograficamente differenti. Tuttavia, CTX-M-15 (gruppo 1) e CTX-M-14 (gruppo 9) sono i pi rilevati in tutto il mondo, seguiti da CTX-M-2 (gruppo 2). In qualsiasi zona del mondo, gli enzimi CTX-M rappresentano ora la maggioranza delle ESBL, al punto che la loro diffusione è ormai considerata pandemica. Sono ugualmente isolati in comunità e nelle strutture ospedaliere, e sembrano essere endemici nelle istituzioni di assistenza a lungo termine. La crescente prevalenza di ESBL in comunità crea un problema senza precedenti: l'affluenza di batteri multiresistenti dalla comunità all'ambiente ospedaliero.

PRINCIPIO

NG-Test® CTX-M Multi è un test rapido immunologico pronto per l'uso per la rilevazione delle β -lattamasi CTX-M di gruppo 1, 2, 8, 9 e 25 in una colonia batterica campionata su terreno di agar solido dopo coltura (per una notte) ed elaborata in un buffer di estrazione.

Il test è eseguito dispensando il campione nel pozzetto della cassetta. Il campione migra attraverso la membrana con il coniugato e, se presenti, gli enzimi CTX-M reagiscono con anticorpi monoclonali murini marcati anti-CTX-M. Il complesso migra attraverso la membrana di nitrocellulosa per capillarità e interagisce con gli anticorpi monoclonali murini anti-CTX-M immobilizzati sulla membrana, sulla regione di test "T". La linea di controllo C, è formata da streptavidina marcata e anticorpi monoclonali che reagiscono con biotina-BSA e anticorpi policlonali di capra anti-topo immobilizzati sulla membrana.

Se il campione è positivo per CTX-M di gruppo 1, 2, 8, 9 o 25, apparirà una riga rossa nell'area di test "T" e nell'area di controllo "C" della membrana. In caso contrario, verrà visualizzata una sola linea rossa nell'area di controllo "C".

REAGENTI E MATERIALI FORNITI**Ciascun kit contiene:**

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

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Timer • Guanti monouso • Anse • 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.
- Le card devono essere conservate 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. Non congelare. I kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata su ciascun kit.

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 nel tampone d'estrazione. Per prestazioni ottimali, si raccomanda vivamente l'uso di colonie batteriche fresche.

Terreni di coltura validati:

Mueller Hinton (MH) agar, UriSelectTM 4 (URI-4), Columbia agar + 5% sangue di cavallo, ChromID ESBL agar, Drigalski (DRIG) agar.

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 (150µL) di tampone d'estrazione in una provetta Eppendorf fornita con il kit.

2 / Con un'ansa prelevare una colonia cresciuta su agar solido, quindi risospenderla nella provetta Eppendorf contenente 150µL di tampone d'estrazione.

3 / Chiudere la provetta con il tappo.

4 / Prima dell'uso, omogeneizzare la soluzione mediante Vortex.

NOTA: colonie mucoidi potrebbero causare problemi di migrazione, a causa della loro alta viscosità. Vortexare per 3 minuti una colonia nel tampone di estrazione e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente prima di eseguire il test.

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 100µL di soluzione preparata (il campione deve raggiungere la linea nera indicata sulla pipetta per poter trasferire 100µL) nel pozzetto campione marcato con la lettera "S".

3 / Leggere i risultati dopo 15 minuti e interpretarli come indicato di seguito.

NOTA: non interpretare i risultati del test dopo che siano trascorsi 20 minuti, perché potrebbero variare e causare risultati falsi positivi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



NEGATIVO

Risultato negativo

Appare solo una linea rossa nella regione controllo (C): il campione non contiene l'enzima CTX-M o contiene CTX-M a livelli non rilevabili e deve essere interpretato come risultato negativo.

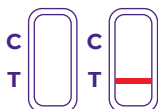


POSITIVO

Risultato positivo

Appaiono due linee: una nella regione controllo (C) e una nella regione test (T). Il campione contiene l'enzima CTX-M e deve essere interpretato come risultato positivo.

NOTA: l'intensità della linea rossa Test (T) potrebbe variare in relazione al livello di enzima presente nel campione. Una debole linea dovrebbe essere considerata come risultato positivo.



NO 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.

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

Questo test 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 procedure diagnostiche alternative e complementari.

Un test positivo o negativo non esclude la presenza di altri meccanismi di resistenza. Potrebbero verificarsi alcune reazioni crociate con ceppi che esprimono enzimi ESBL OXY-like, solitamente espressi dalle specie di *Klebsiella oxytoca*.

PRESTAZIONI E CARATTERISTICHE

Limite di rilevazione:

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

- Gruppo 1 / CTX-M-15 250 pg/mL
- Gruppo 2 / CTX-M-2 600 pg/mL
- Gruppo 9 / CTX-M-14 100 pg/mL

NG-Test® CTX-M Multi rileva le seguenti varianti:

- Gruppo 1 / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
- Gruppo 2 / CTX-M-2
- Gruppo 8 / CTX-M-8
- Gruppo 9 / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
- Gruppo 25 / CTX-M-94, -100

Studio di valutazione:

Il **NG-Test® CTX-M Multi** è stato valutato su 165 isolati (caratterizzati come ESBL con metodica PCR) presso l'NRC (AMR Centro Nazionale di Riferimento Francese) del CHU Kremlin Bicêtre Paris-France.

Tabella 1:

		STATUS		
		risultato POSITIVO	risultato NEGATIVO	TOTALE
NG-TEST® CTX-M Multi	POSITIVO	149	0	149
	NEGATIVO	0	16	16
	TOTALE	149	16	165

SENSIBILITÀ	100%	INTERVALLO DI CONFIDENZA 95% [97.5% ; 100%]
SPECIFICITÀ	100%	INTERVALLO DI CONFIDENZA 95% [80.6% ; 100%]

BIBLIOGRAFÍA

1. Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
2. Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
3. Hasan Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella* spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
4. R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
5. Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases - www.cdc.gov/eid - Vol. 15, No. 5, May 2009.
6. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gramnegative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
7. Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frontier in microbiology, volume 3, articles 110.
8. Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrumlactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355-358.
9. David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2005, p. 657-686 Vol. 18, No. 4.
10. 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) 18: 18.
11. Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC,Davangere.CTX-M β -lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.
12. Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - Korean J Intern Med 2014;29:27-30
13. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101.

14. Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfar, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa 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-negative Isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology, July 2014 Vol. 23, No. 3.

15. L. Dortet, L.Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. Journal of Clinical Microbiology- October 2014- Volume 52 Number 10.

SIMBOLI



Contenuto per 20 test



Dispositivo medico diagnostici *in vitro*



Numero di lotto



Consultare le istruzioni per l'uso



Data scadenza



Non riutilizzare



Riferimento catalogo



Produttore



30°C
Limite di temperatura



Questo test è stato sviluppato in collaborazione con il CEA*.

**Il Commissariato per l'energia atomica e le energie alternative è un attore chiave nella ricerca, nello sviluppo e nell'innovazione.

WPROWADZENIE

NG-Test[®] CTX-M Multi jest jakościowym szybkim testem immunologicznym do wykrywania grup 1, 2, 8, 9 i 25 CTX-M w kolonii bakteryjnej uzyskanej z hodowli.

Jest to test diagnostyczny *in vitro*, wyłącznie do użytku profesjonalnego, który pomaga wykryć beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum (ESBL) wytwarzane przez Enterobacterales.

STRESZCZENIE

β-laktamy są antybiotykami pierwszego rzutu w leczeniu zakażeń wywołanych przez Enterobacterales. Niemniej jednak od początku ich masowego zastosowania w latach 40. XX wieku ich skuteczność była kwestionowana przez produkcję enzymów, które je inaktywują: β-laktamazy. Wśród nich β-laktamazy o rozszerzonym spektrum (ESBL) hydrolizują większość β-laktam w oszczędzając jedynie cefamycyny (jak cefoksytyny) i karbapenemy.

Epidemiologia ESBL wśród Enterobacterales ostatnio uległa zmianie wraz z powszechnym rozpowszechnieniem się enzymów typu CTX-M. W latach 90. XX w. główne ESBL pochodziły z enzymów typu TEM i SHV i głównie występowały się w klonach szpitalnych *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacterales* spp. Dyfuzja CTX-M w obrębie gatunku *Escherichia coli* zmieniła tę sytuację. Obecnie zidentyfikowano i opisano ponad 170 wariantów CTX-M w 5 głównych grupach (grupy 1, 2, 8, 9 i 25 CTX-M). Dominujące warianty są geograficznie różne. Jednak CTX-M-15 (grupa 1) i CTX-M-14 (grupa 9), a następnie CTX-M-2 (grupa 2) są najczęściej wykrywane na świecie.

Niezależnie od lokalizacji, CTX-M reprezentują teraz większość ESBL, do tego stopnia, że ich rozprzestrzenianie jest zakwalifikowane jako pandemia. Są one jednakowo odizolowane w środowisku społecznym i szpitalnym i wydają się być endemiczne w instytucjach opieki długoterminowej. Rosnąca częstość występowania ESBL w warunkach środowiskowych stwarza bezprecedensowy problem: napływ bakterii wieloopornych z otoczenia środowiskowego do szpitala.

ZASADA PROCEDURY

NG-Test[®] CTX-M Multi jest gotowym do użycia szybkim testem immunologicznym do wykrywania grup 1, 2, 8, 9 i 25 β-laktamazy CTX-M w kolonii bakteryjnej izolowanej na stałąm podłożu agarowym po hodowli (przez noc) i zawieszony w buforze ekstrakcyjnym.

Badanie przeprowadza się poprzez naniesienie próbki do studzienki na kasetce. Podczas badania próbka wraz z koniugatem migruje wzdłuż membrany, a jeśli obecne są enzymy CTX-M to reagują z wyznakowanymi mysimi przeciwciałami monoklonalnymi anti-CTX-M. Mieszanina wędruje następnie przy pomocy sił kapilarnych wzdłuż membrany i zachodzi w interakcję z przeciwciałami mysimi monoklonalnymi anti-CTX-M unieruchomionymi na błonie w obszarze testowym „T”.

Linia kontrolna C znakowana jest streptawidyną i przeciwciałami monoklonalnymi reagującymi z biotyną-BSA oraz kozimi antymysimi przeciwciałami poliklonalnymi unieruchomionymi na membranie.

Jeżeli próbka jest dodatnia pod względem CTX-M z grup 1, 2, 8, 9 lub 25, czerwona linia pojawi się na obszarze testowym „T” i regionie kontrolnym „C” membrany. Jeśli nie, pojawi się tylko jedna czerwona linia, w obszarze kontrolnym „C”.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY DOSTARCZONE W ZESTAWIE

Każdy zestaw zawiera:

- 20 kaset testowych w aluminiowych opakowaniach ze środkiem osuszającym
- 20 mikroprobówek
- 20 jednorazowych pipet o pojemności 100µL
- 1 bufor ekstrakcyjny w plastikowej butelce (4,5 mL)
- 1 instrukcję obsługi

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIE DOSTARCZONE

Zegar laboratoryjny • Jednorazowe rękawiczki • Eza • Mieszadło typu vortex

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Wyłącznie do diagnostyki in vitro i użytku profesjonalnego.
- Wszystkie czynności muszą być wykonywane zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Nie używać po upływie daty ważności.
- Testy przechowywać w zamkniętych opakowaniach i otwierane bezpośrednio przed użyciem.
- Wszelkie próbki traktować jako potencjalnie zakaźny materiał.
- Po użyciu należy zutylizować wszystkie elementy testu zgodnie z procedurą dla materiałów zakaźnych.
- Do użytku jednorazowego, nie używać ponownie.

STABILNOŚĆ I PRZECHOWYWANIE

Testy przechowywać w zamkniętych aluminiowych opakowaniach w temperaturze od 4 do 30°C. Nie zamrażać. Zestawy testowe są stabilne do daty ważności podanej na każdym opakowaniu.

HODOWLA I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

Próbki, które mają być poddane badaniu powinny być uzyskane zgodnie z obowiązującymi procedurami mikrobiologicznymi. Kolonie bakteryjne powinny być namażane na podłożu agarowym stałym a następnie zanurzone w buforze ekstrakcyjnym dołączonym do zestawu testowego. W celu uzyskania optymalnych wyników wysoce zalecane jest stosowanie świeżych kolonii bakteryjnych.

Zalewane podłoża mikrobiologiczne:

Mueller Hinton (MH) agar, UriSelectT 4 (URI-4), Columbia agar + 5 % krwi końskiej, ChromID ESBL agar, Drigalski (DRIG) agar.

PROCEDURA OZNACZENIA

1 / Pracować w rękawicach ochronnych.

2 / Elementy zestawu doprowadzić do temperatury pokojowej przez co najmniej 10 minut.

Przygotowanie próbki

1 / Odmierzyć 5 kropli (150µL) buforu ekstrakcyjnego do jednej z mikropróbówek dostarczonych do zestawu.

2 / Za pomocą ezy zebrać z hodowli na bazie agaru kolonię a następnie zawiesić w mikropróbówce zawierającej 150µL buforu ekstrakcyjnego.

3 / Szczelnie zamknąć mikropróbówkę.

4 / Dokładnie wymieszać próbkę przez przystąpieniem do dalszego etapu.

UWAGA: Kolonie śluzowe mogą prowadzić do problemów z migracją z uwagi na ich wysoką lepkość. Wirować kolonię przez 3 minuty w buforze ekstrakcyjnym i inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej przed wykonaniem testu

Wykonanie oznaczenia

1 / Otworzyć opakowanie i wyjąć kasetę testową. Po otwarciu natychmiast wykonać test.

2 / Za pomocą dostarczonej pipety dodać 100µL przygotowanej zawiesiny (pobrana ilość zawiesiny musi zrównać się z czarną linią umieszczoną na pipecie, aby dokładnie zaaspirować 100µL)

3 / Wynik odczytać po 15 minutach, zgodnie z poniższymi instrukcjami.

UWAGA: nie interpretować wyniku po czasie dłuższym niż 20 minut, rezultaty mogą być inne od pierwotnych co może powodować fałszywie dodatnie wyniki.

INTERPRETACJA WYNIKÓW



NEGATYWNY

Wynik negatywny

Jeśli pojawia się tylko jedna czerwona linia w obszarze kontrolnym (C): próbka nie zawiera enzymów CTX-M lub zawiera je na poziomie niewykrywalnym przez test i musi być interpretowana jako wynik ujemny.

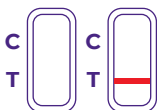


POZYTYWNY

Wynik pozytywny

Jeśli pojawiają się dwie linie, jedna w obszarze kontrolnym (C) i jedna w obszarze testowym (T): próbka zawiera enzymy CTX-M i musi być interpretowana jako wynik dodatni.

UWAGA: Intensywność czerwonej linii w obszarze testowym (T) może różnić się z uwagi na poziom enzymów CTX-M w próbce. Jasnoróżowa linia powinna być interpretowana jako dodatni wynik.



NIEPRAWIDŁOWY

Wynik nieprawidłowy

Jeśli linia w obszarze kontrolnym (C) nie pojawia się, wynik testu jest nieprawidłowy.

Najczęstszą przyczyną takiego stanu rzeczy jest niewystarczająca ilość próbki bądź błąd w procedurze. Możliwe jest również pogorszenie jakości zestawu testowego. Należy powtórzyć procedurę używając nowego testu. W przypadku powtórzyrzenia się problemu należy zaprzestać używania testu i skontaktować się z dystrybutorem.

KONTROLA JAKOŚCI

Wewnętrzna kontrola jakości zawarta jest w teście. Pojawienie się czerwonej linii kontrolnej C świadczy o wystarczającej ilości próbki i prawidłowo przeprowadzonej procedurze wykonania testu.

OGRANICZENIA TESTU

Test jest testem jakościowym, nie dostarczy więc wyników ilościowych.

Test pozwala na stosowanie jako szybka pomoc w kwalifikowaniu pacjentów. Uzyskane wyniki muszą być potwierdzone alternatywnymi lub uzupełniającymi metodami diagnostycznymi.

Pozytywny lub negatywny wynik testu nie wyklucza obecności innych mechanizmów lekooporności.

W niektórych przypadkach, zaobserwowano reakcje krzyżowe dla szczepów wykazujących ekspresję enzymów ESBL podobnych do OXY, zwykle dla gatunków *Klebsiella oxytoca*.

CHARAKTERYSTYKA TESTU

Limit detekcji:

Granicę wykrywalności określono przy użyciu oczyszczonych rekombinowanych enzymów:

- **Grupa 1 / CTX-M-15** 250 pg/mL
- **Grupa 2 / CTX-M-2** 600 pg/mL
- **Grupa 9 / CTX-M-14** 100 pg/mL

NG-Test® CTX-M Multi wykrywa następujące warianty:

- Grupa 1 / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
- Grupa 2 / CTX-M-2
- Grupa 8 / CTX-M-8
- Grupa 9 / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
- Grupa 25 / CTX-M-94, -100

Ocena kliniczna:

Ocena kliniczna NG-Test® CTX-M Multi została przeprowadzona na 165 izolatach (potwierdzona obecność ESBL metodą PCR) w NRC (Francuski Ośrodek Referencyjny ds. Lekooporności) w CHU Kremlin Bicêtre Paryż, Francja.

Tabela 1:

		WYNIK		
		wynik POZYTYWNY	wynik NEGATYWNY	SUMA
NG•TEST® CTX-M Multi	POZYTYWNY	149	0	149
	NEGATYWNY	0	16	16
	SUMA	149	16	165
CZUŁOŚĆ	100%	CI 95% [97.5% ; 100%]		
SPECYFICZNOŚĆ	100%	CI 95% [80.6% ; 100%]		

BIBLIOGRAFIA

1. Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
2. Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
3. Hasana Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β -Lactamase Producing Klebsiella spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
4. R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum - Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
5. Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β -Lactamases in Escherichia coli from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases . www.cdc.gov/eid . Vol. 15, No. 5, May 2009.
6. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gramnegative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
7. Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frintier in microbiology, volume 3, articles 110.
8. Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli and its CTX-M-15-like extended-spectrumlactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355-358.
9. David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2005, p. 657-686 Vol. 18, No. 4.
10. 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) 18: 18.

11. Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC,Davangere.CTX-M β -lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.

12. Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - Korean J Intern Med 2014;29:27-30

13. Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101.

14. Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfar, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa 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-negative Isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology, July 2014 Vol. 23, No. 3.

15. L. Dortet, L.Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended- Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. Journal of Clinical Microbiology- October 2014 Volume 52 Number 10.

SIMBOLE



Zawiera 20 testów



Data ważności



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*



Do użytku jednorazowego



Numer partii



Numer katalogowy



Informacje zawarte w ulotce



Wytwórca



Zakres temperatury przechowywania



Niniejszy test został opracowany we współpracy z CEA*.

*The French Alternative Energies and Atomic Energy Commission is a key player in research, development and innovation.

USO PRETENDIDO

O **NG-Test[®] CTX-M Multi** é um imunoenensaio qualitativo rápido para a deteção dos grupos CTX-M 1, 2, 8, 9 e 25 em colónia bacteriana obtida de cultura. É um ensaio de diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional, que auxilia na deteção de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) produzidas por Enterobacterales.

RESUMO

Os β -lactamicos são antibióticos de primeira linha para o tratamento de infeções 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 alargado (ESBLs) hidrolisam a maioria dos β -lactamicos poupando apenas as cefamicinas (como cefoxitina) e carbapenémicos.

A epidemiologia de ESBLs entre Enterobacterales mudou recentemente com disseminação difundida de enzimas do tipo CTX-M. Na década de 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 spp. A difusão das CTX-Ms nas espécies de *Escherichia coli* mudou esta situação. Atualmente, mais de 170 variantes do CTX-M foram identificadas e descritas em 5 grupos principais (grupos CTX-M 1, 2, 8, 9 e 25). As variantes dominantes são geograficamente diferentes. Porém, as CTX-M-15 (grupo 1) e CTX-M-14 (grupo 9) são as mais detetadas em todo o mundo, seguida pela CTX-M-2 (grupo 2).

Onde quer que seja a sua localização no mundo, as CTX-Ms representam agora a maioria das ESBLs, ao ponto da sua difusão ser qualificada como pandémica. Estas são igualmente isoladas em ambientes comunitários e hospitalares e parecem ser endógenos em instituições de cuidados prolongados. A crescente prevalência de ESBLs em ambientes comunitários cria um problema sem precedentes: o influxo de bactérias multiresistentes da comunidade para o ambiente hospitalar.

PRINCÍPIO

NG-Test[®] CTX-M Multi é um imunoenensaio rápido pronto para uso, para a deteção dos grupos 1, 2, 8, 9 e 25 das β -lactamases de CTX-M em colónias bacterianas amostrada de um meio de ágar sólido após cultura (uma noite) e processado em num tampão de extração.

O ensaio é realizado distribuindo a amostra no poço da cassette. A amostra migra para o bloco conjugado e, se presente, as enzimas CTX-M reagem com os anticorpos monoclonais anti-CTX-M de murganho marcados. O complexo migra através da membrana de nitrocelulose por capilaridade e interage com os anticorpos monoclonais de murganho anti-CTX-M imobilizados na membrana, na região de teste "T".

A linha de controlo C, é formada por estreptavidina marcada e anticorpos monoclonais que reagem com biotina-BSA e anticorpos policlonais de cabra anti murganho imobilizados na membrana.

Se a amostra for positiva para CTX-M dos grupos 1, 2, 8, 9 ou 25, uma linha vermelha irá aparecer 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".

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS**Cada kit contém:**

- 20 Cassetes de teste em bolsas de alumínio com dessecante
- 20 microtubos
- 20 Pipetas descartáveis de 100 μ L
- 1 Solução tampão de extração num frasco de plástico (4,5 mL)
- 1 Instruções de utilização

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Temporizador • Luvas de uso único • Ansa • Vórtex

PRECAUÇÕES

- Teste de diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
- Todas as operações devem ser realizadas de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Não utilize após o prazo de validade.
- Os dispositivos devem permanecer nas bolsas seladas até que sejam usados.
- Manuseie as amostras como se fossem potencialmente infecciosas.
- Após o uso, descarte o dispositivo num contentor de resíduos infecciosos.
- Não reutilize o dispositivo

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Guarde os dispositivos nos seus sacos selados entre 4 e 30°C. Não congelar. Os kits são estáveis até a data de validade indicada em todos os kits.

CULTURA E AMOSTRAGEM

As amostras a serem testadas devem ser obtidas e manuseadas de acordo com os procedimentos microbiológicos padronizados. Uma colônia irá ser colhida de uma cultura sólida á base de ágar, seguidamente será suspensa no tampão de extração fornecido no kit. É altamente recomendável utilizar colônias bacterianas frescas para que o desempenho do ensaio seja o ideal.

Meios de cultura validados:

Agar Mueller Hinton (MH), URIselct 4 (URI-4), ágar Columbia + 5% de sangue de cavalo, gar ChromID ESB, gar Drigalski (DRIG).

PROCEDIMENTO OPERACIONAL

1 / Utilizar luvas de proteção.

2 / Trazer os componentes do kit á temperatura ambiente durante pelo menos 10 minutos.

Preparação da amostra:

1 / Dispensar 5 gotas (150µL) de tampão de extração num dos microtubos fornecidos no kit.

2 / A partir de uma cultura sólida á base de ágar, recolha uma colônia com uma ansa e, em seguida, suspenda-a no microtubo que contém 150µL de tampão de extração.

3 / Feche o microtubo.

4 / Vórtex para homogeneizar a mistura antes de usar.

NOTA: Colônias mucosas podem levar a problemas de migração, devido á sua alta viscosidade. Vórtex uma colônia no tampão de extração durante 3 minutos e incubar durante 10 minutos á temperatura ambiente antes de realizar o teste.

Execução do ensaio:

1 / Abra a bolsa e retire o dispositivo. Depois de aberto, use o teste imediatamente.

2 / Usando a pipeta fornecida, adicione 100µL da mistura preparada (a amostra deve alcan ar a linha preta indicada na pipeta para aspirar com precisão 100µL) no poço da amostra identificado com "S".

3 / Leia os resultados após 15 minutos e interprete-os como indicado abaixo.

NOTA: Não interprete os resultados do teste após 20 minutos, pois estes possivelmente podem variar, causando resultados falsos positivos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS



NEGATIVO

Resultado negativo

Se apenas aparecer uma linha vermelha na região de controlo (C): a amostra não contém a enzima CTX-M ou nível não detetável desta e deve ser interpretado como um resultado negativo.

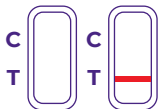


POSITIVO

Resultado positivo

Se aparecerem duas linhas vermelhas, uma na região de controlo (C) e outra na região de teste (T): a amostra contém a enzima CTX-M e deve ser interpretada como um resultado positivo.

NOTA: A intensidade da linha de teste vermelha (T) pode variar dependendo do nível de enzima CTX-M na amostra. Uma linha fraca deve ser considerada como um resultado positivo.



INVÁLIDO

Resultado inválido

Se a linha de controlo (C) não aparecer, o resultado do teste é inválido. Volume de amostra insuficiente ou um procedimento incorreto são os motivos mais prováveis de falha na linha de controlo. Pode ter ocorrido deterioração do kit de teste. Repita o procedimento usando um novo teste. Se o problema persistir, não reutilize o kit e entre em contato com seu distribuidor.

CONTROLO DE QUALIDADE

Está incluído um controlo interno no teste. Quando a linha de controlo se desenvolve, confirma que o volume da amostra foi suficiente e o procedimento estava correto.

LIMITAÇÕES

Este teste é um ensaio qualitativo, por isso não pode produzir qualquer resultado quantitativo.

Este teste de primeira linha permite uma estratificação rápida dos doentes.

Os resultados obtidos devem ser confirmados com procedimentos de diagnóstico alternativos ou complementares.

Um teste positivo ou negativo não exclui a presença de outros mecanismos de resistência a antibióticos.

Algumas reações cruzadas podem ocorrer com estirpes que expressam enzimas ESBL do tipo OXY, geralmente expressas por espécies de *Klebsiella oxytoca*.

DESEMPENHOS E CARACTERÍSTICAS**Limite de deteção:**

O limite de deteção foi determinado utilizando enzimas recombinantes purificadas.

- **Grupo 1** / CTX-M-15 250 pg/mL
- **Grupo 2** / CTX-M-2 600 pg/mL
- **Grupo 9** / CTX-M-14 100 pg/mL

O **NG-Test® CTX-M Multi** deteta as seguintes variantes:

- **Grupo 1** / CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
- **Grupo 2** / CTX-M-2
- **Grupo 8** / CTX-M-8
- **Grupo 9** / CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
- **Grupo 25** / CTX-M-94, -100

Estudo de avaliação:

O **NG-Test® CTX-M Multi** foi avaliado em 165 isolados (PCR caracterizado por conteúdo ESBL) no NRC (Centro Nacional de Referência Nacional AMR) do CHU Kremlin Bicêtre Paris-France.

Tabela 1:

		STATUS		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
NG•TEST® CTX-M Multi	POSITIVO	149	0	149
	NEGATIVO	0	16	16
	TOTAL	149	16	165

SENSIBILIDADE	100%	INTERVALO DE CONFIANÇA	95% [97.5% ; 100%]
ESPECIFICIDADE	100%	INTERVALO DE CONFIANÇA	95% [80.6% ; 100%]

BIBLIOGRAFIA

- Hervé Boutal and Al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-Ms producing enterobacteriaceae. In : Poster ECCMID 2018.
- Hervé Boutal and Al. 2017. CTX-M-15 detection in clinical samples: evaluation of an immune chromatographic test. In : Poster ANSM 2017.
- Hasan Afzali and Al. 2016. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella* spp. in Kashan, Iran. In : Jundishapur J Microbiol. 2015 October; 8(10):e27967.
- R. Bonnet, 2004. Growing Group of Extended-Spectrum - Lactamases: the CTX-M Enzymes. In: Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, p. 1-14.
- Etienne Rupp , and Al. 2009. CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. In: Emerging Infectious Diseases · www.cdc.gov/eid · Vol. 15, No. 5, May 2009.
- Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu, 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gramnegative bacteria. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101 2013 Informa Healthcare USA, Inc.
- Rafael Cantón, José María González-Alba and Juan Carlos Galán, 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. In : Frintier in microbiology, volume 3, articles 110.
- Hiran Dhanjia, Michel Doumitha, Olivier Clermont, Erick Denamur, Russell Hope, David M. Livermore, Neil Woodford. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum lactamases; International Journal of Antimicrobial Agents 36 (2010) 355-358.
- David L. Paterson and Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum-Lactamases: a Clinical Update. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2005, p. 657-686 Vol. 18, No. 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) 18: 18.
- Sridhar Rao P.N- Assistant Professor Dept.of Microbiology JJMMC,Davangere.CTX-M β -lactamases. www.microrao.com 03rd July, 2012.
- Sun Hee Park. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern - Korean J Intern Med 2014;29:27-30
- Wei-Hua Zhao and Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 2013; 39(1): 79-101.
- Wageih S. El-Naghy, Amal A. Wafy, Nashwa N. Elfarr, Atef Taha, Abeer Shahba, Nashwa 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-negative Isolates. Egyptian Journal of Medical Microbiology, July 2014 Vol. 23, No. 3.

15. L. Dortet, L. Poirel, P. Nordmann. Rapid Detection of Extended- Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test. Journal of Clinical Microbiology- October 2014 Volume 52 Number 10.

SÍMBOLOS



Conteúdo para
20 ensaios



Dispositivo médico
de diagnóstico
in vitro



Número de lote



Consulte
instruções de
utilização



Prazo de validade



Não reutilizar



Referência de
catálogo



Fabricante



Limite de
temperatura



Este teste foi desenvolvido em colaboração com a CEA*.

*A Comissão francesa de Energia Atômica e Energias Alternativas é um interveniente-chave na pesquisa, desenvolvimento e inovação.

For products sold in Australia:

Distributor: Cell biosciences
Pty Ltd

PO Box 243, Heidelberg, VIC 3084

Fax: 03 8678 3956

Mobile: 0394 167 177

Web: www.cellbiosciences.com.au

Note: any serious incident that occurs in relation to the device should be reported to the manufacturer and to the Therapeutic Goods Agency.

TGA:

TGA, PO Box 100, Woden ACT 2606,
Australia.

Website: <https://www.tga.gov.au/>

Email: info@tga.gov.au

Fax: 02 6203 1605

 **NG·BIOTECH® SAS**

Atelier Relais Le Tremplin,
Parc d'Act. de Courbouton Sect 1
35480 Guipry - France

Phone : +33(0)2 23 30 17 83

Fax : +33(0)9 71 70 53 10

support@ngbiotech.com

www.ngbiotech.com

ENO016CTM/Rév. 230620