

# RESIST-3 O.O.K. K-SeT

REF K-11R4

IVD

REF K-15R4

## USO

Test de diagnóstico rápido in vitro para la detección de carbapenemasas de OXA-163, OXA-48 y KPC en cultivos bacterianos.

Para uso diagnóstico in vitro.

Sólo para uso profesional.

## I. INTRODUCCIÓN

Los organismos productores de carbapenemasas (OPC) y más particularmente, las enterobacterias resistentes a los carbapenems (ERC o CRE por sus siglas en inglés) representan un importante riesgo sanitario en todo el mundo, debido al amplio espectro de resistencia que incluye, además de las carbapenemasas, la mayor parte de los agentes antimicrobianos, dejando así muy pocas posibilidades para el tratamiento de los pacientes infectados. Además de las ERCs, los OPC también incluyen bacilos gram-negativos no fermentadores (BGNNF), tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, que exhiben resistencia no sólo a beta lactámicos y otros grupos de antibióticos, sino también a carbapenems. La rápida expansión de los OPC, o de los genes que codifican estas resistencias, ha traído como consecuencia brotes nosocomiales y situaciones endémicas en varios países de Europa y otros lugares del mundo.

Los expertos internacionales y las autoridades sanitarias consideran que una acción sanitaria de máxima prioridad es el desarrollo de nuevos tipos de tests para el diagnóstico rápido y detección de los patrones de resistencia antimicrobiana. La KPC es una de las carbapenemasas de mayor prevalencia en muchos países. Por otro lado, las carbapenemasas de la clase D OXA-48 y sus variantes poseen el mecanismo de resistencia más difícil de detectar en los laboratorios clínicos. En particular, la variante de OXA-163 es una enzima difícil de identificar. En realidad, aunque OXA-163 muestra una actividad más débil de carbapenemasa, en comparación con la actividad de OXA-48, ésta muestra una mayor actividad a las cefalosporinas de espectro expandido (ESC, por sus siglas en inglés) cuya identificación rápida también representa otro reto para una acción rápida. Una rápida identificación de dichas carbapenemasas es de vital importancia para mejorar la terapia que se ofrece a los pacientes, y controlar la expansión de la resistencia a los antibióticos en los hospitales. Ya existen algunas pruebas fenotípicas y confirmatorias que utilizan el uso de discos de combinación con inhibidores específicos para la detección de tipos de carbapenemasas seleccionados, incluyendo las de clase A (KPC) y las de clase B (VIM, IMP, NDM); sin embargo, estas pruebas requieren mucho tiempo y un día adicional de espera con posterioridad a los resultados del test de susceptibilidad antimicrobiana. Por otro lado, los ensayos colorimétricos realizados con métodos fenotípicos, en algunos casos, no son suficientemente sensibles para detectar las carbapenemasas con expresión a bajo nivel, tales como la de OXA-48 y variantes muy cercanas (las llamadas "símil OXA-48") y para la subfamilia OXA-163 que muestra una actividad de carbapenemasa muy baja. Hoy en día, la confirmación definitiva de la presencia de OXA-48 y OXA-163 se realiza mediante análisis moleculares y secuenciación genética. Estos tests son caros y pueden ser realizados únicamente en un entorno dedicado y por parte de personal capacitado, lo cual limita las posibilidades de un uso más generalizado del test.

## II. PRINCIPIO EN QUE SE BASA EL TEST

Este test está listo para su uso y está basado en una tecnología de membranas con nanopartículas coloidales de oro. Este kit está destinado a la detección de carbapenemasas a partir de un aislamiento de una única colonia bacteriana de Enterobacterias o BGNNF que crecen en una placa de agar. Se sensibiliza una membrana de nitrocelulosa mediante (1) un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítopo de la carbapenemasa de OXA-48 y sus variantes (pero no la variante OXA-163), con (2) otro anticuerpo monoclonal dirigido contra otro epítopo de la carbapenemasa de OXA-48 y sus variantes (incluyendo la OXA-163) y con (3) un tercer anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítopo de la carbapenemasa de KPC.

Hay tres conjugados distintos unidos a partículas de oro coloidal que se secan en una membrana: un conjugado dirigido contra un tercer epítopo de la carbapenemasa de OXA-48 (+163), un conjugado dirigido contra un segundo epítopo de la carbapenemasa de KPC y un conjugado de control para validar las condiciones del test.

Este test tiene como objetivo la detección de carbapenemasas parecidas a la OXA-48, ESC (cefalosporinas de espectro expandido) parecidas a la OXA-163, y carbapenemasas de KPC en una sola colonia de aislados de enterobacterias que crecen en una placa de agar.

Cuando la solución amortiguadora suministrada que contiene las bacterias resuspendidas entra en contacto con la tira, los conjugados solubilizados migran con la muestra mediante difusión pasiva y ambos conjugados, así como el material de la muestra, entran en contacto con el primer anticuerpo anti-KPC que se adsorbe en la tira de nitrocelulosa. Si la muestra contiene la carbapenemasa de KPC, el complejo conjugado-KPC quedará ligado a la primera línea (inferior) del anticuerpo anti-KPC que se adsorbe en la nitrocelulosa. La migración continúa mediante difusión pasiva y ambos conjugados, así como el material de la muestra, entran en contacto con la segunda línea del anticuerpo anti-OXA-48 y con la tercera línea del anticuerpo anti-OXA-163(+48) que se adsorben en la tira de nitrocelulosa. Si la muestra contiene la carbapenemasa de OXA-48, el complejo conjugado-OXA-48 quedará ligado a la segunda línea del anticuerpo anti-OXA-48 que se adsorbe en la nitrocelulosa. Si la muestra contiene la carbapenemasa de OXA-163, el complejo conjugado-OXA-163 quedará ligado a la tercera línea del anticuerpo anti-OXA-163(+48) que se adsorbe en la nitrocelulosa. Finalmente, la solución continúa migrando hacia una cuarta línea (superior) del reactivo de control que quedará ligado a un conjugado de control, produciendo así una línea roja. El resultado será visible después de 15 minutos, en forma de líneas rojas en la tira.

\* Dado que el segundo conjugado se dirige contra todas las variantes de OXA-163, pero también de OXA-48, si la muestra contiene una elevada cantidad de OXA-48, la segunda línea (etiquetada como "48" en el dispositivo) será altamente positiva y la tercera línea (etiquetada como "163" en el dispositivo) puede ser una señal débil ya que parte de OXA-48 no quedará captada por la segunda línea.

## III. REACTIVOS Y MATERIALES

### 1. RESIST-3 O.O.K.K-SeT (10 ó 20)

20 paquetes sellados que contienen un dispositivo y un desecante.

Cada dispositivo contiene una tira sensibilizada.

### 2. Frasco gotero de solución amortiguadora LY-A (15 ml)

Solución amortiguadora salina a pH 7, 5 que contiene TRIS, Na<sub>3</sub> (<0.1%) y un detergente.

### 3. Instrucciones de uso (1)

### 4. Tubos semi-rígidos de recogida, desechables con cuentagotas (10/20)

## IV. PRECAUCIONES ESPECIALES

- Todas las operaciones vinculadas con el uso de la prueba deben realizarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (BPL).

- Todos los reactivos son sólo para uso en el diagnóstico in vitro.

- El sobre debe abrirse con cuidado

- Evite tocar con los dedos la nitrocelulosa.

- Al manipular las pruebas, utilice guantes.

- No utilice nunca los reactivos de otro kit.

- Las líneas verdes indican los lugares de adsorción de los inmunoreactivos. El color verde desaparece durante la prueba.

- La calidad de los reactivos no se puede garantizar tras el vencimiento del período de caducidad o si los reactivos no se conservan en las condiciones requeridas, como se indica en el folleto.

## V. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

- Deseche los guantes, hisopos, tubos de ensayo y accesorios utilizados de acuerdo con las BPL.

- Cada usuario es responsable de la gestión de los residuos producidos y debe asegurarse de que se eliminan de acuerdo con la legislación vigente.

## VI. CONSERVACIÓN

- Un sobre sin abrir se puede mantener entre 4 y 30°C y utilizarlo durante el período de validez indicado en el envase. Una vez abierto el sobre, realice la prueba inmediatamente.

- Evite congelar los accesorios y el tampón.

## VII. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras para análisis se deben obtener y manipular utilizando métodos microbiológicos estándar.

Asegúrese de que las muestras no se tratan con soluciones que contengan formaldehído o sus derivados.

Comuníquese con nosotros para consultar los medios de cultivo probados y validados para esta prueba.

## VIII. PROCEDIMIENTO

### Preparación del test:

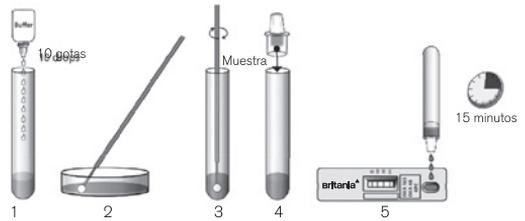
Sin abrir el paquete deje que, tanto los componentes del kit como el espécimen (en el caso de que la placa que contiene la colonia que se examina se hubiera mantenido a 4°C) alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar el test.

Abra la bolsa y extraiga el dispositivo. Una vez abierto, lleve a cabo el test inmediatamente. Anote el nombre del paciente o el número de espécimen en el dispositivo (un dispositivo por cada muestra).

### Procedimiento de preparación del espécimen:

No se tienen datos sobre el rendimiento del test para los tipos de muestras que no sean colonias bacterianas. Recomendamos el uso de colonias de bacterias frescas para un rendimiento óptimo del test.

1. Tome un tubo semi-rígido y añada 10 gotas de solución amortiguadora de LY-A en el tubo.
2. Coseche las bacterias tomando la colonia con un ansa descartable de bacteriología y sumerja el ansa hasta el fondo del tubo semi-rígido que contiene la solución amortiguadora.
3. Agite con vortex sin retirar el ansa.
4. Inserte firmemente el cuentagotas en el tubo semi-rígido.
5. Agite la preparación con vortex para homogeneizar. La totalidad de la colonia bacteriana debe estar resuspendida en la solución.
6. Invierta el tubo de ensayo y añada lentamente 3 gotas de la muestra diluida en el depósito de la muestra del dispositivo.
7. Deje que reaccione durante un máximo de 15 min y lea los resultados.



Los resultados positivos pueden ser informados tan pronto como las líneas de test y de control se hagan visibles.

**No tome en cuenta la aparición de nuevas líneas después de que haya pasado el tiempo de reacción. Los resultados deben leerse cuando las tiras aún estén húmedas.**

## IX. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben interpretarse de este modo:

**Resultado negativo del test:** aparecerá una línea de color rojo-púrpura sobre la ventana central de lectura, en la posición de la Línea de control (C) No se observan más bandas.

**Resultado positivo del test:** además de una banda de color rojo-púrpura en la Línea de control (C), aparecerá una banda visible de color rojo-púrpura en una de las posiciones de la Línea de test (KPC, 163 o 48). La intensidad de la línea puede variar en función de la cantidad de antígenos, así como del tipo de variante presente en la muestra. Se considerará el resultado positivo si aparece cualquier línea de color rojo-púrpura en el test (KPC, 163 o 48), aunque sea leve.

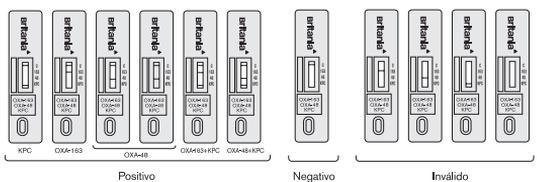
Si la única línea positiva del test es la línea de KPC, la muestra contiene la variante de KPC.

Si la única línea positiva del test es la línea 163, la muestra contiene la variante OXA-163 (o una variante estrechamente relacionada como OXA-247, 405 o 438). Si la única línea positiva del test es la línea 48, la muestra contiene OXA-48 (o bien una variante estrechamente relacionada, pero no la subfamilia OXA-163, es decir, OXA-163, 247, 405 o 438).

En caso de que aparezca una línea altamente positiva de OXA-48 en el test, puede aparecer una señal muy tenue en la línea de OXA-163 del test. En este caso, debería interpretarse el test como un positivo a OXA-48 y un negativo a OXA-163.

**Resultado inválido del test:** La ausencia de una Línea de control indica un error en el procedimiento del test. Es necesario repetir los tests inválidos con un dispositivo de test nuevo.

Nota: durante el proceso de secado, puede aparecer una sombra muy débil en las posiciones de Línea del test. No debe considerarse como un resultado positivo.



**X. RENDIMIENTO**

**A. Límite de detección**

El límite de detección se determinó mediante proteínas purificadas recombinantes de OXA-48 y OXA-163 y ha sido evaluado en 0,125 ng/ml y 0,49 ng/ml, respectivamente.

El límite de detección de KPC en el test ha sido evaluado en 0,625 ng/ml.

**B. Validación de la colección de las cepas de referencia**

Las carbapenemasas del tipo OXA-48 y OXA-163 del test K-SeT se evaluaron en una colección de 75 cepas clínicas completamente caracterizadas en el Laboratorio Nacional de Referencia, servicio de Antimicrobianos (Argentina).

75 cepas	50 cepas han dado positivo para OXA-48 y OXA-163	17 cepas que portan OXA-48 y carbapenemasas variantes del tipo OXA-48	OXA-48, OXA-162, OXA-181, OXA-232, OXA-244 de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	25 cepas han dado negativo para OXA-48 y OXA-163	33 cepas que portan variantes de OXA-163 de carbapenemasa	OXA-163, OXA-247, OXA-438 de <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Enterobacter kobei</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella ozonae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Kluyvera georgiana</i>
		14 cepas que portan una carbapenemasa distinta a OXA-48	GES-5, IMP-8, KPC-2, KPC-3, NDM-1, VIM-1, VIM-2, SPM-1, OXA-23, OXA-58, OXA-72, OXA-143, Sme y IMI
		11 cepas no productoras de carbapenemasa	Incluyendo OXA-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, CNY-2, GES-1 + OXA-2, AmpC + porins, CTX-M + porins

**C. Estudio prospectivo**

El kit K-SeT RESIST-3 O.O.K. ha sido validado por comparación con el método molecular de referencia (validado dentro de la empresa en PCR múltiple, incluyendo método de secuenciación) en el Laboratorio de Referencia Nacional para estudio de Bacilos gram negativos resistentes a múltiples fármacos (Bélgica) en un estudio prospectivo llevado a cabo en 173 aislados clínicos de posibles CPE, no duplicados y consecutivos, realizados desde julio hasta setiembre de 2016.

**ESTADO DE KPC**

RESIST-3 O.O.K. K-SeT	Positivo	Negativo	Total
Positivo	9	0	9
Negativo	0	164	164
Total	9	164	173

Intervalo de confianza del 95 %

Sensibilidad:	100 %	(68,4 hasta 100 %)
Especificidad:	100 %	(98,2 hasta 100 %)
Valor positivo predictivo:	100 %	(68,4 hasta 100 %)
Valor negativo predictivo:	100 %	(98,2 hasta 100 %)
Concordancia:	100 %	(173/173)

**D. Repetibilidad y reproductibilidad**

Para revisar la precisión dentro de un mismo lote (repetibilidad), se procesaron 15 veces las mismas muestras positivas y una solución amortiguadora en el mismo lote de producción, bajo las mismas condiciones experimentales. Todos los resultados observados confirmaron los resultados esperados.

Para revisar la precisión dentro de un mismo lote (reproductibilidad), se procesaron algunas muestras (positivas y solución amortiguadora) en kits de tres lotes distintos de producción. Todos los resultados observados confirmaron los resultados esperados.

**XI. LÍMITES DEL KIT**

Esta es una prueba cualitativa y no puede predecir la cantidad de antígenos presentes en la muestra. Debe tenerse en cuenta la presentación clínica y los resultados de otras pruebas para establecer un diagnóstico.

Un resultado positivo de la prueba no descarta la posibilidad de que puedan estar presentes otros mecanismos de resistencia a los antibióticos.

**XII. PROBLEMAS TÉCNICOS / RECLAMACIONES**

Si surge un problema técnico o si los resultados no coinciden con los indicados en este manual de instrucciones:

1. Registre el número de lote del kit involucrado.
2. Si es posible, conserve la muestra en las condiciones adecuadas de almacenamiento mientras dure la gestión de la reclamación.
3. Póngase en contacto con Laboratorios Britania (info@britanialab.com) o con su distribuidor local.

**XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. DW Wareham and MH Abdul Momin. Rapid Detection of Carbapenemasas in Enterobacteriaceae: Evaluation of the RESIST-3 O.K.N (OXA-48, KPC, NDM) Multiplexed Lateral Flow Assay. J Clin Microbiol. 2017 Feb 1. pii: JCM.02471-16
2. E Rubio, Y Zboromyrska, C Pitart, I Campo, I Alejo-Cancho, A Fasanello, A Vergara, F Marco, J Vila. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of OXA-48 carbapenemase. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017 Mar;37(3):266-267
3. F Koroska, S Göttig, M Kaase, J Steinmann, S Gatermann, J Sommer, T Wille, G Plum, A Hamprecht. Comparison of phenotypic tests and an immunochromatographic assay and development of a new algorithm for OXA-48-like detection. J Clin Microbiol. 2016 Dec 28. Pii: JCM.01929-16
4. F Pasteran, L Denorme, I Ote, S Gomez, D De Belder, Y Glupczynski, P Bogaerts, B Ghiglione, P Power, P Mertens, A Corso. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 subfamily in carbapenem resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. J Clin Microbiol. 2016 Aug; 54(11):2832-2836
5. Meunier, A, Vickers, R, Pike, R.L, Hill, N, Woodford and K.L. Hopkins. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2016 Aug; 71 (8):2357-9
6. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Abdul Momin MH. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for the Rapid Detection of OXA-48-like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2016 Feb;54 (2):471-3
7. Fernández J, Fleites A, Roldo MR, Vazquez F. Evaluation of OXA-48 K-Se T: an immunochromatographic assay for rapid detection of OXA-48-producing Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016 May;85 (1):12-5
8. Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V, Cuzon G, Naas T. Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2016 Jul;71 (7):1834-40

9. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, Leclipteux T, Bogaerts P. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. J Antimicrob Chemother. 2016 May;71(5):1217-22

10. A. Abulaila, F. Erdem, Z. Aktas and O. Oncul. Evaluation Comparison of a novel OXA-48 K-Set test and blue-carba test in detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae with using PCR as reference method. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam April 09 – 12, 2016

11. C.S. Nodari, A. Barth, C. Magagnin, A. Zavascki, A. Gales, C. Carvalhaes. OXA-370 is rapidly detected from different culture media using OXA-48 K-SeT® immunochromatography. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam April 09 – 12, 2016

12. Bogaerts, S, Evrard, G, Cuzon, TD, Huang, T, Naas and Y. Glupczynski. Specificity of the OXA-48 immunochromatographic K-SeT for the detection of OXA-48 like in *Shewanella* spp. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Infectious Amsterdam April 09 – 12, 2016

13. L. Dortet, A. Jousset, V. Sainte-Rose, G. Cuzon, and T. Naas. Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT for the detection of OXA-48-type carbapenemase producing Enterobacteriaceae. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam April 09 – 12, 2016

14. P. Bogaerts, S. Evrard, M. Dozen, TD. Huang and Y. Glupczynski Impact of the isolation medium for the detection of OXA-48 and KPC-producing Gram negative bacteria by immunochromatographic assays. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam April 09-12, 2016

15. I. de Toro Peinado, M°C.M. Gradolph, R. S. Rodriguez, M. V. Troya, M°P. B. Ruiz, B. Palop A rapid test for detection of OXA-48 carbapenemase. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam April 09-12, 2016

**AUTORIZACIÓN ANMAT**

Cert. N° 8574  
Código: K-11R4 (10 determinaciones)  
K-15R4 (20 determinaciones)  
Dir. Técnico: Bioq. Alejandro Rossi

**SÍMBOLOS UTILIZADOS**



DIAGNÓSTICO IN VITRO



CÓDIGO N°



ELABORADOR



FECHA DE VENCIMIENTO



N° DE DETERMINACIONES



LOTE N°



MANTÉNGASE EN LUGAR SECO



LÍMITE DE TEMPERATURA



INSTRUCCIONES DE USO



NO REUTILIZAR



CONTIENE AZIDA DE SODIO