

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



www.corisbio.com

IFU-58R9/FR/02

Fabricant :

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

Produit en BELGIQUE

Test rapide de diagnostic *in vitro* pour la détection de cinq carbapénémases OXA-163, OXA-48, KPC, NDM et VIM sur une culture bactérienne

A DES FINS DE DIAGNOSTIC IN VITRO
POUR USAGE PROFESSIONNEL UNIQUEMENT

FR

Références : K-15R9, 2x20 cassettes, 20 tubes et compte-gouttes

I. INTRODUCTION

Les organismes producteurs de carbapénémase (CPO) et plus particulièrement les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (CRE) représentent un problème majeur de santé publique dans le monde entier en raison de leur large spectre de résistance aux antibiotiques, y compris la plupart des classes d'agents antimicrobiens autres que les carbapénèmes, laissant très peu d'options pour la prise en charge thérapeutique des patients. A côté des CREs, les CPOs incluent aussi des bacilles Gram négatives non fermentantes (NFGNB), tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* qui présentent des résistances non seulement aux bêta-lactames et à d'autres groupes d'antibiotiques mais également aux carbapénèmes. La propagation rapide de ces CPOs ou des gènes codant ces résistances a conduit à des épidémies nosocomiales et des situations endémiques dans plusieurs pays en Europe et ailleurs dans le monde. Le développement de nouveaux tests de diagnostic rapide permettant de suivre les modèles de résistance antimicrobienne est considéré par les experts internationaux et les autorités sanitaires comme l'une des actions prioritaires. NDM et KPC représentent deux des carbapénémases les plus répandues dans de nombreux pays. D'autre part, le type OXA-48 des carbapénémases de la classe D est le mécanisme de résistance le plus difficile à détecter pour les laboratoires cliniques. En particulier, le variant OXA-163. En effet, bien que l'OXA-163 présente une activité carbapénémase plus faible que l'OXA-48, il montre une activité accrue vers les céphalosporines à spectre étendu qui représentent un autre défi pour l'identification rapide. VIM n'est pas seulement présent chez les Enterobacteriaceae, mais elle est également très répandue chez les bacilles Gram négatifs non fermentants, particulièrement chez *Pseudomonas*. L'identification rapide de ces carbapénémases est cruciale pour améliorer à la fois la thérapie du patient et le contrôle de la propagation d'une telle résistance aux antibiotiques dans les hôpitaux. Des tests phénotypiques de confirmation à base d'inhibiteurs existent pour confirmer la présence des carbapénémases de la classe A (KPC) et de classe B (VIM, IMP, NDM) ; cependant, ces tests prennent énormément de temps et nécessitent un jour supplémentaire pour obtenir les résultats. Par ailleurs, les tests phénotypiques colorimétriques ne sont pas souvent assez sensibles pour détecter les carbapénémases faiblement actives telles qu'OXA-48, et les variantes étroitement liées d'OXA-48 et pour la sous-famille OXA-163 qui présente une très faible activité de carbapénémase. Plusieurs tests de séquençage moléculaire et génique permettent également la détection des carbapénémases, spécialement pour la confirmation définitive de l'OXA-48 et de l'OXA-163. Ces tests sont coûteux, chronophage et ne peuvent être effectués dans un environnement adapté et par un personnel de laboratoire qualifié, limitant ainsi leur utilisation généralisée.

II. PRINCIPE DES TESTS

Les tests sont prêts à l'emploi et reposent sur l'utilisation d'une technologie sur membrane avec des nanoparticules d'or colloïdal. Notre trousse est destinée à la détection de carbapénémases provenant d'une seule colonie bactérienne d'entérobactérie ou de NFGNB d'une culture sur boîte gélosée. Chaque pochette contient 2 cassettes pour l'identification de (i) KPC, OXA-163 et OXA-48 et (ii) NDM et VIM. Ces deux dispositifs sont destinés à la détection des carbapénémases KPC, OXA-163, OXA-48, NDM et VIM à partir de colonies d'isolats bactériens se développant sur une boîte gélosée et re-suspendues dans le tampon fourni du kit

Identification de KPC, OXA-163 et de l'OXA-48. Une membrane de nitrocellulose est sensibilisée avec :

- (1) un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope de la carbapénémase KPC (ligne KPC) ;
- (2) un anticorps monoclonal dirigé contre un premier épitope de la carbapénémase OXA-48 et ses variants (mais pas le variant OXA-163) (ligne 48) ;
- (3) un anticorps monoclonal dirigé contre un second épitope de la carbapénémase OXA-48 et ses variants incluant l'OXA-163 (ligne 163) ;
- (4) un réactif contrôle (ligne C).

Trois différents conjugués couplés à des particules d'or colloïdal qui sont insolubilisés sur une membrane : un conjugué dirigé contre un second épitope à la carbapénémase KPC, un conjugué dirigé contre un troisième épitope de la carbapénémase OXA-48 et ses variants incluant l'OXA-163 et un conjugué contrôle.

Identification de NDM et de VIM. Une membrane de nitrocellulose est sensibilisée avec :

- (1) un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope de la carbapénémase NDM (ligne N) ;
- (2) un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope de la carbapénémase VIM (ligne V) ;
- (3) un réactif contrôle (ligne C).

Trois différents conjugués couplés à des particules d'or colloïdal qui sont insolubilisés sur une membrane : un conjugué dirigé contre un second épitope à la carbapénémase NDM, un conjugué dirigé contre un second épitope à la carbapénémase VIM et un conjugué contrôle pour valider les conditions de tests.

L'échantillon (colonie bactérienne) doit être dilué dans le tampon de dilution fourni avec le test. Lorsque le tampon contenant la suspension de bactéries entre en contact avec la bandelette, les conjugués solubilisés migrent par diffusion passive avec l'échantillon et l'ensemble entre en contact avec les anticorps adsorbés sur la membrane de nitrocellulose. Si l'échantillon contient une carbapénémase KPC, OXA-163, OXA-48, NDM ou VIM, les complexes respectifs constitués des conjugués et des carbapénémases correspondantes resteront fixés à leurs lignées spécifiques (KPC, ligne KPC ; OXA-163, ligne 163 ; OXA-48, ligne 48 ; NDM, ligne N ; VIM, ligne V). Finalement, la solution continue à migrer et rencontre la troisième ligne (C, en haut) de réactif qui fixe le conjugué de contrôle générant la ligne rouge de contrôle qui confirme le bon fonctionnement du test.

* Comme le second conjugué est dirigé contre toutes les OXA-163 mais aussi toutes les variantes OXA-48, si l'échantillon contient une très forte quantité d'OXA-48, la deuxième ligne (marquée 48) sera fortement positive et la troisième ligne (marquée 163) peut montrer un faible signal dû à la capture de l'OXA-48 en excès.

Le résultat est visible dans les 15 minutes sous la forme de lignes rouges sur la tigette.

III. REACTIFS ET MATERIELS

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

20 pochettes scellées contenant deux cassettes et un dessiccant. Chaque cassette contient une tigette sensibilisée.

2. Tampon de dilution LY-A (15 mL)

Solution saline tamponnée à pH 7.5 contenant du TRIS, du Na₃ (<0,1%) et un détergent.

3. Notice d'utilisation (1)

4. 20 tubes semi-rigides à usage unique et 20 compte-gouttes

IV. PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Toutes les manipulations liées à l'utilisation de ce test doivent être effectuées selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).
- Les composants de la trousse sont à utiliser en diagnostic *in vitro*, uniquement.
- Ouvrir la pochette avec précaution.
- Eviter de toucher directement la nitrocellulose.
- Porter des gants pendant la manipulation des échantillons.
- Ne jamais mélanger les constituants de trousse différentes.
- Les sites d'adsorption des immunoréactifs sont signalés par les bandes vertes. La couleur verte disparaît pendant la réaction.
- La qualité des réactifs est garantie seulement jusqu'à leur date de péremption et s'ils ont été conservés dans les conditions indiquées dans cette notice.

V. ELIMINATION DES DECHETS

- Eliminer tous les consommables utilisés selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- Chaque utilisateur est responsable de la gestion des déchets qu'il produit et doit assurer l'élimination de ces derniers en fonction de la réglementation applicable.

VI. CONSERVATION

- Une trousse non ouverte doit être conservée entre 4 et 30°C et utilisée avant la date de péremption indiquée sur l'emballage. Une fois la pochette ouverte, démarrer le test immédiatement.
- Les cassettes et le tampon ne doivent pas être congelés.

VII. PRELEVEMENTS

Les échantillons à tester doivent être obtenus et traités en suivant les méthodes classiques de culture des CPE.

S'assurer que les prélèvements n'ont pas été traités avec des échantillons contenant du formaldéhyde ou ses dérivés.

Les milieux de culture testés et validés avec les trousse Coris BioConcept RESIST sont listés sur le site internet : <https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/RESIST-5-OOKNV.php>

VIII. PROCEDURE

Préparation du test :

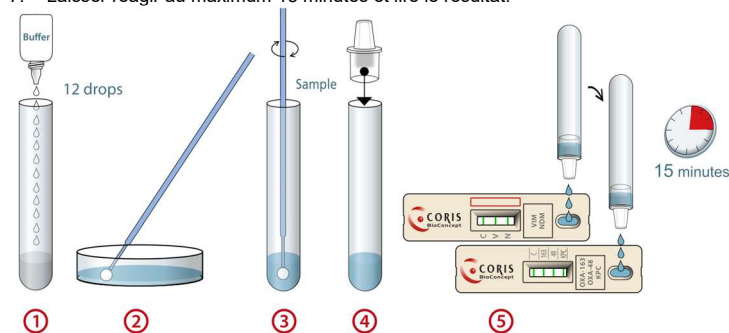
Laisser les réactifs, dans leur emballage fermé, et les échantillons (lorsque la boîte de Petri contenant la colonie à tester a été gardée à 4 °C) s'équilibrer à température ambiante (15-30 °C) avant de débiter le test.

Ouvrir la pochette et ôter les 2 cassettes. Lorsque la pochette a été ouverte, utiliser les cassettes le plus rapidement possible. Marquer les numéros de l'échantillon sur les cassettes (deux cassettes par échantillon).

Procédure de préparation des échantillons :

Les performances du test n'ont pas été établies avec des échantillons autres que les colonies bactériennes. Coris BioConcept recommande l'utilisation de colonies bactériennes fraîches pour une performance optimale de test.

1. Préparer 1 tube semi-rigide et ajouter 12 gouttes de tampon LY-A dans le tube.
2. Récolter une colonie avec une anse bactériologique jetable et la plonger jusqu'au fond du tube semi-rigide contenant le tampon.
3. Bien mélanger avant de retirer l'anse.
4. Insérer fermement le compte-goutte sur le tube.
5. Vortexer la préparation pour homogénéiser. L'entièreté de la colonie bactérienne doit être en suspension dans le tampon.
6. Retourner le tube et ajouter lentement 3 gouttes dans le puits de chacune des deux cassettes marquées (i) KPC, OXA-48, OXA-163, et (ii) NDM et VIM. Alternativement, ajouter 100µl avec une micropipette aux deux cassettes.
7. Laisser réagir au maximum 15 minutes et lire le résultat.



Un résultat positif peut être déclaré plus tôt dès l'instant où la ligne de contrôle et la ligne de test apparaissent.

Ne pas tenir compte de l'apparition de nouvelles lignes une fois le temps de réaction dépassé.

Les résultats doivent être lus sur une tigette encore humide.

IX. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats doivent être interprétés comme suit pour chacune des deux cassettes :

Test négatif : une bande de couleur pourpre apparaît dans la fenêtre de lecture au niveau de la ligne Contrôle (C). Aucune autre ligne n'est présente.

Test positif : en plus d'une bande pourpre sur la ligne de contrôle (C), une bande pourpre apparaît à une des lignes de test (KPC ou 163 ou 48) sur la cassette marquée (i) KPC, OXA-48, OXA-163 ou à l'une des lignes de test (V ou N) sur la cassette marquée (ii) NDM et VIM. L'intensité des lignes tests peut varier en fonction de la quantité d'antigènes présente dans l'échantillon ainsi que du type de variant. Un signal faible sur une ligne Test (OXA-48, OXA-163, KPC, NDM ou VIM) doit être interprété comme un résultat positif.

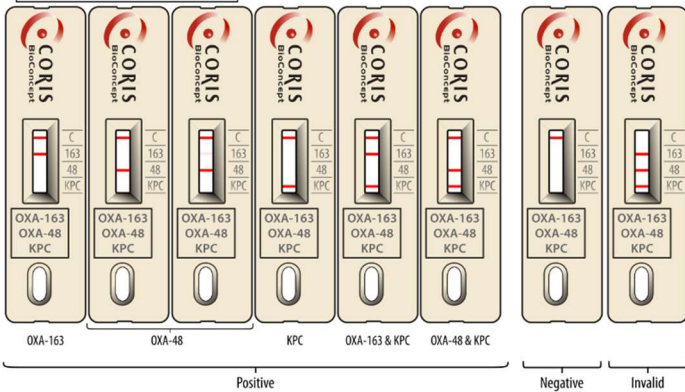
Si une ligne de test positive apparaît à côté de la marque KPC, l'échantillon contient une carbapénémase KPC ; à côté de la marque 48, l'échantillon contient l'OXA-48 ou un variant OXA-48 ; à côté de la marque 163, l'échantillon contient un variant OXA-163 (ou un variant apparenté type OXA-247, 405 ou 438) ; à côté de la marque N, l'échantillon contient une carbapénémase NDM et à côté de la marque V, une carbapénémase VIM est présent dans l'échantillon. Une combinaison de plusieurs lignes tests positives est possible. Dans ce cas, l'échantillon contient plusieurs carbapénémases.

Néanmoins, dans le cas d'une ligne de test OXA-48 très positive, un faible signal peut apparaître sur la ligne de test OXA-163. Dans ce cas, le test doit être interprété comme un résultat positif OXA-48 et négatif OXA-163.

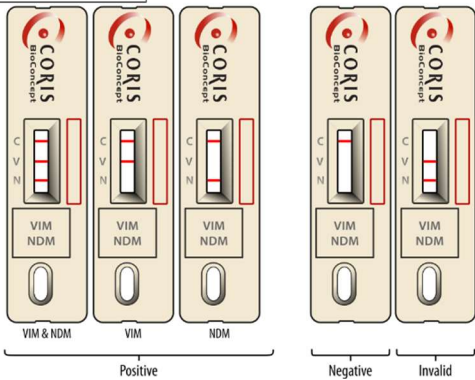
Test invalide : aucune bande pourpre n'apparaît au niveau de la ligne Contrôle (C). L'absence de la ligne contrôle (C) rend le résultat ininterprétable. Dans ce cas, l'échantillon doit être re-testé avec deux nouvelles cassettes.

Note : après séchage, une très légère ombre peut apparaître au niveau de la ligne test. Il ne faut pas en tenir compte dans l'interprétation des résultats.

Cassette 1 : OXA-48 & OXA-163 & KPC



Cassette 2 : VIM & NDM



X. PERFORMANCES

A. Limite de détection

La limite de détectabilité a été définie avec des préparations de protéines recombinantes OXA-48, OXA-163, KPC, NDM et VIM purifiées et a été évaluée à 0,125 ng/mL, 0,49 ng/mL, 0,625 ng/mL, 0,25 ng/mL et 0,23 ng/mL, respectivement.

B. Etude prospective (basée sur la trousse RESIST-3 O.K.N. K-SeT)

Le test cassette OXA-48 et KPC a été validé par comparaison avec une méthode de référence moléculaire (y compris le séquençage) dans le Centre National de Référence des *Enterobacteriaceae* multi-résistants (Belgique) dans une étude prospective réalisée sur 173 isolats cliniques consécutifs soupçonnés de CPE (de Juillet à Septembre 2016).

Cassette OXA-48 et KPC	Positif	Négatif	Total
Résultat OXA-48 Positif	69	0	69
Résultat OXA-48 Négatif	0	104	104
Total	69	104	173

Intervalle de confiance à 95%¹

Sensibilité:	100%	(95.7 à 100 %)
Spécificité:	100%	(97.2 à 100 %)
Valeur Prédictive Positive:	100%	(95.7 à 100 %)
Valeur Prédictive Négative:	100%	(97.2 à 100 %)
Concordance:	100%	(173/173)

Cassette OXA-48 et KPC	Positif	Négatif	Total
Résultat KPC Positif	9	0	9
Résultat KPC Négatif	0	164	164
Total	9	164	173

Intervalle de confiance à 95%¹

Sensibilité:	100%	(68.4 à 100 %)
Spécificité:	100%	(98.2 à 100 %)
Valeur Prédictive Positive:	100%	(68.4 à 100 %)
Valeur Prédictive Négative:	100%	(98.2 à 100 %)
Concordance:	100%	(173/173)

C. Validation sur une collection de souches de référence

Les carbapénémases de type OXA-48 et OXA-163 du test K-SeT ont été évaluées sur une collection de 75 souches cliniques entièrement caractérisées dans le Laboratoire National de Référence de la résistance aux antibiotiques (Argentine).

75 souches	50 souches testées positives en OXA-48 et OXA-163	17 souches porteuses d'une carbapénémase OXA-48 et variants	OXA-48, OXA-162, OXA-181, OXA-232, OXA-244 de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
		33 souches porteuses de variants OXA-163	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> , <i>Kluyvera georgiana</i>

25 souches testées négatives pour OXA-48 et OXA-163	14 souches porteuses d'une carbapénémase non-OXA-48	GES-5, IMP-8, KPC-2, KPC-3, NDM-1, VIM-1, VIM-2, SPM-1, OXA-23, OXA-58, OXA-72, OXA-143, Sme, IMI
	11 souches non porteuses de carbapénémases	Incluant OXA-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, CMY-2, GES-1 + OXA-2, AmpC + porines, CTX-M + porines

D. Etude rétrospective

Le test cassette NDM et VIM a été validé par comparaison avec une méthode moléculaire de référence dans le Centre National de Référence des *Enterobacteriaceae* multi-résistants (Belgique) dans une étude rétrospective sur une collection de souches de référence.

Cassette NDM et VIM	Positif	Négatif	Total
Résultat NDM Positif	24	0	24
Résultat NDM Négatif	0	95	95
Total	24	95	119

Intervalle de confiance à 95%¹

Sensibilité:	100%	(82.8 à 100 %)
Spécificité:	100%	(95.2 à 100 %)
Valeur Prédictive Positive:	100%	(82.8 à 100 %)
Valeur Prédictive Négative:	100%	(95.2 à 100 %)
Concordance:	100%	(119/119)

Cassette NDM et VIM	Positif	Négatif	Total
Résultat VIM Positif	38	0	38
Résultat VIM Négatif	1*	80	81
Total	39	80	119

*: le résultat faussement négatif est une colonie de *P. aeruginosa* porteuse des gènes VIM-5 et NDM-1. Cette colonie a été détectée comme NDM-positif mais VIM-négatif. La production de VIM-5 par cette bactérie n'a pas été évaluée.

Intervalle de confiance à 95%¹

Sensibilité:	97.4%	(84.9 à 99.9 %)
Spécificité:	100%	(94.3 à 100 %)
Valeur Prédictive Positive:	100%	(88.6 à 100 %)
Valeur Prédictive Négative:	98.8%	(92.4 à 99.9 %)
Concordance:	99.2%	(118/119)

E. Précision

Des essais de répétabilité intra-lot ont été menés en répétant 15 fois des mesures sur des échantillons positifs et des tampons. Les résultats ont été confirmés dans 100% des cas. Des essais de répétabilité inter-lots ont été menés sur 3 lots de production différents et dans les mêmes conditions d'échantillons que ci-dessus. Les résultats ont été confirmés dans 100% des cas.

XI. LIMITES DE LA TROUSSE

Il s'agit d'un test qualitatif qui ne permet pas de quantifier la quantité d'antigènes présente dans l'échantillon. Le contexte clinique et tous les autres résultats (anamnèse) doivent être pris en considération pour établir le diagnostic.

Un test positif ne permet pas d'éliminer la possibilité de présence d'autres mécanismes de résistance aux antibiotiques.

XII. PROBLEMES TECHNIQUES / RECLAMATIONS

Si vous rencontrez un problème technique ou si les performances ne correspondent pas à celles indiquées dans cette notice.

- Notez le numéro de lot du kit concerné
- Si possible, conservez l'échantillon ayant posé problème au congélateur, le temps de la gestion du problème
- Contactez Coris BioConcept (client.care@corisbio.com) ou votre distributeur local

XIII. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

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

Dernière révision: 07 AOÛT 2019

REF	Numéro de catalogue	Fabriqu	Fabriqu par
IVD	Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i>	Temp	Limites de températures
Σ	Contenu suffisant pour <n> tests	LOT	Numéro de lot
i	Lire le manuel d'instructions	ⓧ	Usage unique
☂	Conserver au sec	⌚	A utiliser avant
DIL SPE	Diluant (specimen)	CONT NaN ₃	Contient de l'azide de sodium

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