

Teste de aglutinação em látex da proteína de ligação à penicilina (PBP2')

REF DR0900A.....

50

PT

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Este teste consiste num ensaio rápido de aglutinação em látex, visando a deteção da proteína PBP2' (também denominada PBP2a)⁷ em isolados de estafilococos, como uma medida auxiliar para a identificação de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e de estafilococos coagulase negativa resistentes à meticilina.

2. PRINCÍPIOS DO TESTE

Os estafilococos são a principal causa de infeções nosocomiais e infeções adquiridas na comunidade a nível global². Em muitas instituições, aproximadamente 25% a 50% das estirpes de *S. aureus* e 75% dos estafilococos coagulase negativa (CoNS) são resistentes à meticilina¹². Os MRSA são especialmente preocupantes atendendo à facilidade com a qual certas estirpes epidémicas se propagam e colonizam doentes debilitados. O tratamento de estirpes sensíveis com penicilinas resistentes às penicilinasas (PRP) representa o procedimento indicado, visto que os medicamentos beta-lactâmicos são absorvidos mais facilmente pelos fluidos e tecidos do corpo, causam menos complicações resultantes do tratamento e não afetam organismos resistentes à vancomicina. Como tal, uma identificação fiável da resistência à meticilina é um fator importante.

As estirpes de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida às PRP são categorizadas da seguinte forma:

- iii(i) estirpe de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) que produzem a proteína de ligação à penicilina PBP2' com afinidade reduzida, com codificação pelo gene mecA^{3,6}
- ii(ii) estirpe de *S. aureus* no limiar de resistência à meticilina (BORSA), cuja resistência se atribui, regra geral, à hiperprodução de beta-lactamase do tipo A¹⁰
- (iii) estirpes com PBP modificadas devido a uma alteração na capacidade de ligação à penicilina ou à hiperprodução de PBP (MODSA)^{1,2}. O isolamento de estirpes MODSA é raro e a respetiva resposta clínica à terapia de beta-lactamase ainda não foi alvo de um estudo aprofundado. Desta forma, para efeitos clínicos, salvo raras exceções, a presença da PBP2' é responsável pela resistência à meticilina no tratamento de infeções por *S. aureus* e CoNS^{2,6}.

O fenótipo de resistente à meticilina pode ser extremamente heterogéneo, dificultando a sua deteção através de métodos de teste de suscetibilidade antimicrobial convencionais, tais como a Concentração Inibitória Mínima (CIM), difusão de disco e ágar. A precisão destes métodos é afetada pelo volume de inóculo, tempo e temperatura de incubação, meio, pH, concentração de sal e outros fatores^{8,9}. Adicionalmente, estes métodos de cultura requerem um período de incubação de 24 horas de forma a produzirem resultados precisos. Frequentemente, os CoNS produzem quantidades mais reduzidas da PBP2' e requerem a indução por exposição a uma das PRP, para produzirem uma quantidade suficiente de produto que permita a deteção^{2,3,12}.

A deteção do gene mecA foi considerada a "norma de excelência" para a determinação da resistência à meticilina, devido ao respetivo nível de precisão. No entanto, este método requer uma mão de obra intensiva e a sua realização é também dispendiosa^{3,6}. O Oxoid PBP2' Latex Test conta com a vantagem da deteção direta da proteína PBP2' realizada num curto espaço de tempo e com recurso a uma mão de obra mínima. Este teste tem o potencial de ser ainda mais preciso do que a deteção do gene mecA, uma vez que os resultados de falsos positivos não irão ocorrer em estirpes que possuam o mecA, mas que sejam incapazes de produzir o produto da proteína do gene. Adicionalmente, o ensaio não deteta estirpes que sejam hiperprodutoras de beta-lactamase ou de PBP.

O Oxoid PBP2' Test foi avaliado previamente à escala global, tendo demonstrado a sua alta sensibilidade e especificidade^{8,5,11}.

As partículas de látex sensibilizadas com um anticorpo monoclonal contra a PBP2' irão reagir especificamente aos estafilococos resistentes à meticilina, resultando numa aglutinação visível a olho nu.

3. COMPONENTES DO KIT

TEST LATEX	DR0901: partículas de látex sintéticas de teste sensibilizadas com um anticorpo monoclonal contra a PBP2'
CONTROL LATEX	DR0902: partículas de látex sintéticas de controlo revestidas com partículas sensibilizadas com um anticorpo monoclonal de coelho da mesma subclasse IgG, não apresentando qualquer reatividade com proteínas de <i>S. aureus</i>
EXTRACTION REAGENT 1	DR0903: reagente de extração 1
EXTRACTION REAGENT 2	DR0904: reagente de extração 2
	Cartões de teste Varetas de mistura Folheto de instruções

4. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas e ponteiros (50 µl)
- Ansa microbiológica (5 µl/1 µl)
- Banho-maria ou placa de aquecimento
- Centrífuga (1500 x g)
- Tubos de microcentrifugação (tampa de segurança)
- Desinfetante adequado para o uso em laboratório

5. PRECAUÇÕES

IVD Este produto destina-se apenas para uso em diagnóstico in vitro.

O tempo de aquecimento deve ser de três minutos. Um aquecimento com duração superior a cinco minutos pode resultar num decréscimo de sensibilidade. Um aquecimento com duração de um minuto, ou inferior, pode resultar numa aglutinação não específica. Ao remover o sobrenadante para a utilização no teste precedente à centrifugação, retire a pipeta cuidadosamente para evitar a concentração de material sólido no fundo do tubo. A transferência de material sólido pode causar uma aglutinação não específica. Agite bem os reagentes em látex para homogeneizar a suspensão antes da respetiva utilização.

Os reagentes contêm 0,095% de azida de sódio como conservante. A azida de sódio é tóxica e pode reagir com a canalização de chumbo ou cobre, resultando na formação de azidas metálicas que são explosivas mediante detonação por contacto. Para prevenir a acumulação de azidas em canalizações, proceda à descarga juntamente com água em abundância imediatamente após a eliminação dos resíduos.

Uma vez que os materiais de espécimes podem conter organismos patogénicos, adote as medidas de precaução necessárias aquando da respetiva manipulação. O procedimento de extração pode não matar as bactérias e, como tal, o processo de extração deve ser realizado atendendo às mesmas medidas de segurança.

Os reagentes de extração 1 e 2 contêm um irritante ligeiro e um ácido fraco. Evite o contacto direto recorrendo à utilização de equipamento de proteção adequado. Caso o material entre em contacto com a pele, as membranas mucosas ou os olhos, enxague de imediato a área afetada com água em abundância.

6. ARMAZENAMENTO

 Armazene o kit a uma temperatura de 2–8 °C. Nestas condições, os reagentes irão reter a respetiva reatividade até à expiração do prazo de validade indicado na caixa.

7. PROCEDIMENTOS DE CONTROLO

Para cada novo lote do kit, e semanalmente a partir da utilização de cada novo lote, os seguintes procedimentos de controlo têm de ser efetuados.

- Controlo positivo**
Utilize uma estirpe de MRSA conhecida como ATCC® 43300 (Thermo Scientific Culti-Loops™ R4609022). Siga o método indicado no procedimento do teste. Assegure que a aglutinação ocorre num espaço de 3 minutos.
- Controlo negativo**
Utilize uma estirpe de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) como ATCC® 25923 ou ATCC® 29213 (Thermo Scientific Culti-Loops® R4607010 ou R4607011). Siga o método indicado no procedimento do teste. Assegure-se de que não ocorre qualquer aglutinação num espaço de 3 minutos. Não utilize o teste caso as reações com os organismos de controlo não estejam corretas.
- Não utilize kits cujo prazo de validade tenha expirado.

8. NOTA DE PROCEDIMENTO IMPORTANTE

Não permita que os reagentes fiquem contaminados ao deixar que a ponta do conta-gotas entre em contacto com o espécime no cartão de reação. Assegure-se de que as tampas estão encaixadas de forma segura após a utilização para prevenir a contaminação e secagem dos reagentes. Após a utilização, volte a armazenar o kit no frigorífico, assegurando-se de que os frascos são armazenados na vertical.

9. PREPARAÇÃO DA CULTURA

As colónias podem ser testadas a partir de qualquer um dos seguintes meios de cultura:

Ágar tripton de soja (TSA) com 5% de sangue de ovelha (TSA com sangue), ágar Columbia com 5% de sangue de ovelha, ágar Mueller-Hinton. Recomenda-se a utilização de culturas frescas (18–24 horas). No entanto, as culturas com 24–48 horas podem ser testadas, caso seja necessário obter um crescimento suficiente. Os dados relativos ao desempenho citados neste folheto foram gerados através destes meios, como parte da apresentação à North American Food and Drug Administration. Os registos mostram que o teste também é eficaz com colónias de *S. aureus* provenientes de ágar tripton de soja e ágar Columbia com 5% de sangue de cavalo, ágar Iso-Sensitest e DSTA. Estes meios são utilizados de forma comum na Europa, mas não na América do Norte e, como tal, não foram utilizados nos ensaios utilizados para gerar os dados apresentados na secção "Características de desempenho".

Requisitos especiais:

O teste PBP2' deve ser realizado exclusivamente em espécies de *Staphylococcus* (cocos Gram-positivos). Um teste de coagulase ou um teste equivalente deve ser realizado com o intuito de determinar se o isolado pertence à espécie *S. aureus* ou a uma outra espécie de *Staphylococcus*.

Preparação do inóculo:

Para *S. aureus*, o teste pode ser realizado a partir de colónias devidamente isoladas na placa de isolamento principal, caso exista um crescimento suficiente, ou a partir de uma subcultura do isolado. Não existem indícios de que as outras microbiotas presentes na placa possam interferir com o ensaio. Para estafilococos coagulase negativa, é necessária uma indução para a produção de PBP2' suficiente.

- Prepare uma suspensão em caldo do organismo equivalente a um padrão McFarland 1 e crie uma sementeira por riscado no TSA com sangue, no ágar sangue Columbia ou no ágar Mueller-Hinton. Alternativamente, inocule a placa de ágar com várias colónias e efetue o risco em quatro quadrantes.
- Coloque um disco de oxacilina (1 µg/ml) na sementeira de organismos ou no quadrante de inóculo principal.
- Proceda à incubação a 37 °C durante um período mínimo de 24 horas, mas não excedendo as 48 horas.

Cuidado: Para evitar resultados falsos negativos, não realize os testes a não ser que uma quantidade suficiente de inóculo se encontre disponível. Efetue sempre a colheita de organismos em proximidade ao disco.

10. MÉTODO DE TESTE

Procedimento de extração da PBP2'

- Adicione quatro gotas de Reagente de extração 1 a um tubo de microcentrifugação.
- Devem ser testadas aproximadamente 1,5 x 10⁹ (3–5 µl) células. Tal pode ser alcançado mediante o recurso a uma ansa esterilizada de 5 µl para remover um crescimento suficiente que preencha o diâmetro interno da ansa. Alternativamente, pode ser utilizada uma ansa esterilizada de 1 µl para remover várias colónias e recolher um amontoado de 1 mm de altura que cobre o diâmetro externo da ansa. Coloque a cultura de teste em suspensão num tubo de microcentrifugação. Recorra ao vórtex, caso se verifique a existência de aglomerados. Deve tornar-se visível uma suspensão muito túrbida.
- Coloque o tubo em água a ferver ou numa placa de aquecimento (ACIMA DOS 95 °C) e aqueça durante três minutos.
- Remova o tubo de microcentrifugação e deixe-o arrefecer à temperatura ambiente.
- Adicione uma gota de Reagente de extração 2 ao tubo e misture devidamente.
- Centrifugue a 1500 x g durante cinco minutos (ou seja, 3000 rpm num raio de rotação de 15 cm ou 4500 rpm num raio de rotação de 4,5 cm). Utilize o sobrenadante para o teste.

Procedimento de aglutinação em látex

- Para cada sobrenadante a ser testado, identifique um círculo do cartão de teste para o teste com Látex de teste e outro para o teste com Látex de controlo.
- Misture os reagentes de látex devidamente, agitando vigorosamente, de forma a homogeneizar o látex antes de cada utilização e adicione uma gota de Látex de teste ou Látex de controlo a cada um dos círculos identificados.
- Coloque 50 µl de sobrenadante no círculo de Teste e no círculo de Controlo, tendo o devido cuidado para evitar o contacto com o aglomerado. Misture minuciosamente o látex e o sobrenadante em cada círculo com uma vareta de mistura.
- Pegue no cartão e agite-o durante até três minutos e procure por aglutinação em condições de iluminação normais. Registe os resultados das reações do teste e do controlo.
- Descarte o cartão de reação em segurança num recipiente com desinfetante ou num recipiente próprio para resíduos infecciosos.

11. LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A aglutinação é verificada no Látex de teste, mas não no Látex de controlo, num espaço de 3 minutos	PBP2' positiva (MRSA)
Sem aglutinação em qualquer um dos reagentes de látex num espaço de 3 minutos	PBP2' negativa (MSSA)
A aglutinação é verificada no Látex de controlo num espaço de 3 minutos	Indeterminado

Intensidade da reação de aglutinação

Negativa (-)	= uma suspensão homogénea de partículas sem uma aglomeração visível
Positiva fraca (+)	= aglomerados pequenos, mas devidamente definidos, visíveis contra um fundo ofuscado
Positiva forte (+)	= aglomerados pequenos e grandes visíveis contra um fundo ligeiramente ofuscado ou aglomerados grandes visíveis contra um fundo muito transparente

N.B.: ocasionalmente, as reações negativas podem ter uma aparência granular fina ou as reações podem ser fibrosas. Nestes casos, o grau de transparência do fundo deve ser utilizado para interpretar o resultado. Um fundo opaco indica um resultado negativo, enquanto um fundo transparente deve ser interpretado como um resultado positivo.

12. LIMITAÇÕES

Os resultados indeterminados devem ser submetidos a um novo processo de teste com um extrato fresco. Caso o resultado volte a ser indeterminado, após a repetição do teste, a resistência à meticilina deverá ser determinada através de outros métodos. Os resultados falsos negativos podem ocorrer, caso a cultura utilizada para o teste seja insuficiente. Nestes casos, o teste deve ser repetido com uma quantidade suficiente de cultura.

Regra geral, os resultados verdadeiros positivos apresentam reações intensas. É sabido que a ocorrência de reações de falsos positivos é rara, mas estas limitam-se, regra geral, às reações fracas. Este tipo de resultados pode ser verificado através da repetição dos testes com uma cultura fresca.

Os *S. aureus* modificados (MODSA) e as estirpes de *S. aureus* no limiar da resistência (BORSA) não possuem a PBP2' e, como tal, a respetiva reação a este ensaio não é esperada.

Certas estirpes de organismos podem apresentar uma resistência reduzida à meticilina ou, em casos raros, estas podem produzir PBP2' em pequenas quantidades, dando origem a um resultado de falso negativo.

Devido às limitações na sensibilidade e especificidade dos métodos do teste de suscetibilidade do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para estafilococos coagulase negativa³, sobretudo para estirpes que não a *Staphylococcus epidermidis*, os resultados com o ensaio PBP2¹ podem não corresponder aos resultados do teste de suscetibilidade padrão. As estirpes com CIM $\geq 0,5$ µg/ml devem ser consideradas como resistentes à meticilina, independentemente dos resultados do ensaio PBP2¹.

13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

1. O Oxoid Penicillin-Binding Protein Latex Agglutination Test foi avaliado em quatro laboratórios diversificados a nível geográfico, com isolados clínicos frescos de *Staphylococcus aureus*. 201 isolados foram testados segundo os métodos do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e com o teste Oxoid PBP2¹ de cada um dos três meios. Foi verificado um falso positivo fraco numa reação de Oxoid Latex (negativo na repetição) resultante de um TSA com sangue. Todas as reações positivas foram fortes, exceto 3 reações fracas (mas positivas) resultantes de um ágar Mueller-Hinton. A sensibilidade do teste de látex na deteção de MRSA em cada meio foi de 100%; a especificidade foi de 99% para TSA com sangue e de 100% para testes provenientes de todos os outros meios.

Resultados dos testes a 201 isolados clínicos frescos de *S. aureus* provenientes de 4 laboratórios:

	MRSA	BORSA ^A	MSSA
N.º de testes	68	3	130
Crescimento em ágar-oxacilina-sal (NCCLS)	68	0	0
CIM ≥ 4 µg/ml (NCCLS)	68	0	0
Látex positivo em meio de TSA com sangue	68	0	1 (1) ^B
Látex positivo em meio de Columbia com sangue	68	0	0
Látex positivo em meio de Mueller-Hinton	68 (3) ^B	0	0

^A Os CIM correspondiam a 2 µg/ml e o mecA era negativo.

^B Número de reações fracas indicado entre parêntesis.

2. Teste das estirpes de provocação de *S. aureus* em três áreas distintas a nível geográfico:

Cada um dos três laboratórios examinou um conjunto de estirpes de provocação de *S. aureus* recolhidas anteriormente e comparou os resultados de PBP2¹ com os métodos de determinação de MRSA do NCCLS. Um total de 724 estirpes foi testado num meio TSA com sangue. A sensibilidade do teste Oxoid PBP2¹ foi de 98,5% e a respetiva especificidade foi de 100%. As sensibilidades da difusão de ágar e dos métodos CIM foram de 98,7% e 99,2% e as especificidades foram de 90,0% e 88,7%. Duas estirpes de MODSA foram também testadas separadamente; ambas as estirpes deram um resultado negativo com o teste de látex.

3. Teste dos estafilococos coagulase negativa

Dois laboratórios realizaram os testes de PBP2¹ em estafilococos coagulase negativa, após a indução com discos de oxacilina. Um laboratório testou 115 estirpes resistentes à meticilina e 45 estirpes suscetíveis à meticilina, incluindo 58 isolados clínicos frescos. A sensibilidade foi de 96,5% para testes num meio de TSA com sangue e 95,6% em ágar Mueller-Hinton. A especificidade foi de 100% num meio de TSA com sangue e 98% em ágar Mueller-Hinton. A obtenção de um bom inóculo provou ser mais difícil através do ágar Mueller-Hinton. O segundo laboratório testou 212 estirpes resistentes à meticilina e 203 estirpes suscetíveis à meticilina com uma sensibilidade de 99,5% e uma especificidade de 99,5%, recorrendo a um crescimento em ágar Columbia para o inóculo.

4. Reprodutibilidade

Dez estirpes com características bem definidas de *S. aureus* (3 MRSA, 3 MSSA, 3 BORSA e 1 MODSA) foram enviadas para três laboratórios diversificados a nível geográfico, tendo cada estirpe sido sujeita 5 vezes de forma codificada e cega. Os 150 resultados dos testes corresponderam aos resultados expectáveis para uma reprodutibilidade de 100%. As três estirpes mecA positivas deram resultados positivos a cada teste a que foram sujeitas (45/45 testes). As três estirpes MSSA e as três estirpes BORSA deram resultados negativos a cada teste a que foram sujeitas (90/90 testes). As estirpes MODSA continham uma CIM de 16 µg/ml face à oxacilina e deram um resultado negativo no Oxoid Latex Test, conforme o esperado, a cada teste a que foram sujeitas (15/15 testes).

14. REFERÊNCIAS

- Bignardi G.E., Woodford N., Chapman A., et al (1996). J. Antimicrobiol. Chemother., 37:53–63.
- Chambers H.F., (1997). Clin. Microbiol. Rev., 10:781–791.
- Gerberding J.L., Miick C., Liu H.H., et al (1991). Antimicrob. Agents Chemother., 35:2574–2579.
- Hussain Z., Stoakes L., Garrow S., et al (2000). J. Clin. Microbiol., 38:2051–2054.
- Louie L., Matsumura S.O., Choi E., et al (2000). J. Clin. Microbiol., 38:2170–2173.
- Murakami K., Minamide W., Wada K., et al (1991). J. Clin. Microbiol., 29:2240–2244.
- Nakatomi Y., and Sugiyama J., (1998). Microbiol. Immunol., 42:739–743.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000 Approved Standard Fifth Edition (M7-A5)). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Tenover F.C., Jones R.N., Swenson J.M., et al (1999). J. Clin. Microbiol., 37:4051–4058.
- Thornsbury C. and McDougal L. (1983). J. Clin. Microbiol., 18:1084–1091.
- Yamazumi T., Marshall S.A., Wilke W.W., et al (2001). J. Clin. Microbiol., 39:53–56.
- York M.K., Gibbs L., Chehab F., et al (1996). J. Clin. Microbiol., 34:249–253.

15. LEGENDA DOS SÍMBOLOS

	Número de catálogo
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consultar as instruções de utilização
	Limitações de temperatura (temp. de armazenamento)
	Conteúdo suficiente para <N> testes
	Código de lote (número de lote)
	Utilizar até (data de expiração)
	Fabricado por



O emblema ATCC Licensed

Derivative™, a marca nominativa ATCC Licensed Derivative® e as marcas do catálogo ATCC são marcas comerciais da ATCC. A Oxoid Limited detém uma licença para a utilização destas marcas comerciais e para a comercialização de produtos derivados de culturas da ATCC®.



Instruções de utilização X6555C, revistas, outubro de 2015 Impresso no Reino Unido



Oxoid Limited,
Wade Road,
Basingstoke,
Hampshire, RG24 8PW
Reino Unido

Para obter assistência técnica, contacte o seu distribuidor local.