

NÁVOD K POUŽITÍ

Detekce KPC, MBL a oxacilináz u *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter* spp. (98025)

Revize: DBV0044E

Datum vydání: 10.02.2017

Určeno pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

Skupina produktů: Soupravy pro identifikaci beta-laktamázy

Výrobce: ROSCO Diagnostica A/S, Taastrupgaardsvej 30, DK-2630 Taastrup, Denmark.

Účel použití: Tablety se používají pro *in vitro* identifikaci mechanismu antimikrobiální rezistence metodou tablety na agaru/diskové difúze pro potvrzení mechanismu, kterým mikroorganismus získal rezistenci ke specifickým antimikrobiálním látkám. Souprava je určena pro detekci

- karbapenemáz typu KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemase) a metalobetalaktamáz (MBL) u *Pseudomonas aeruginosa*
- metalobetalaktamáz (MBL) a oxacilináz u *Acinetobacter* spp.
- neměla by být používána pro *Enterobacteriaceae* (použijte soupravu s kat. č. 98015)

Doporučuje se používat v kombinaci s Mueller-Hinton agarem.

Určeno pro: Určeno pro profesionální použití a pro personál školený pro práci s mikroorganismy a pro testování diskové difúze.

Princip testu: Pět kartuší s tabletami obsahující Imipenem 10 ug a Imipenem v kombinaci s inhibitory různých β -laktamáz. Inhibitory jsou přidány kvůli diferenciaci mezi izoláty s a bez mechanismů rezistence (vysvětlení níže).

Redukovaná citlivost na karbapenemázy je sledovatelná, pokud:

1. Organismus produkuje metalo- β -laktamázu, která efektivně hydrolyzuje karbapenemy. MBL jsou inhibovány dipikolinovou kyselinou (DPA) a EDTA. Synergie (stínová zóna) mezi Imipenem a Imipenem + DPA a/nebo EDTA indikuje přítomnost MBL. Pokud není kolem Imipenem 10 ug žádná zóna, synergie by měla být zkontrolována v menší vzdálenosti mezi Imipenem 10 ug a Imipenem + DPA.
2. Organismus produkuje KPC enzym. KPC enzymy jsou inhibovány fenylboritou kyselinou. Nicméně, kyselina fenylboritá také inhibuje AmpC (třída C cefalosporináz). Pro zvýšení specifčnosti je proto součástí soupravy Cloxacilin High (inhibitor AmpC). Různé inhibiční zóny mezi Imipenem + kyselinou fenylboritou a Imipenem + Cloxacilem High tedy indikují přítomnost KPC enzymu.

Podrobný návod: ROSCO podrobný návod k použití pro detekci mechanismů rezistence by měl být dostupný v každé laboratoři pracující s produktem ROSCO.

Poslední vydání návodu k použití lze shlédnout a/nebo vytisknout z webové stránky firmy ROSCO www.rosco.dk. Rovněž lze nalézt více informací v Uživatelském manuálu.

Návod k použití a Uživatelský manuál lze získat zdarma na vyžádání od vašeho distributora nebo od ROSCO Diagnostica A/S: E-mail: info@rosco.dk nebo Fax: +45 43 52 73 74

Obsah balení:

5 kartuší, vytvořených pro maximální stabilitu, každá obsahující přibližně 50 tablet:

Imipenem 10 μ g, kód IMI10

Imipenem 10 μ g + kys. fenyloborítá (KPC a AmpC inhibitor), kód IMPBO

Imipenem 10 μ g + Cloxacillin High (AmpC inhibitor), kód IPCX4

Imipenem 10 μ g + Dipikolinová kyselina, kód IM+DP

Imipenem + EDTA, kód IM10E

Uchovávání / manipulace:

Uchovávejte při 2-8 °C v dodané krabici nebo neotevřené kartuši do data expirace uvedeného na štítku. Kartuše by měly být během skladování uzavřené. Kartuše vždy uzavřete originálním zeleným víčkem a nekládejte je do lednice v dispenzoru.

Než sundáte víčko z kartuše, nechte ji při pokojové teplotě po dobu 30-60 minut. Kartuše mohou být během používání opětovně otevřeny a zavřeny, aniž by to ovlivnilo jejich skladovatelnost.

Dlouhá životnost je docílena použitím krystalických substancí.

Bezpečnostní opatření: Pouze pro diagnostické použití *in vitro*. Při práci s potenciálně biologicky nebezpečným materiálem je třeba zachovávat bezpečnostní opatření a aseptické zacházení. Pro použití pouze správně školeným a kvalifikovaným laboratorním personálem. Před likvidací všech biologicky nebezpečný odpad sterilizujte. Nahlédněte do Bezpečnostního listu pro daný produkt.

Potřebný, ale nedodávaný materiál: Biochemické reagentie a standardní mikrobiologické pomůcky, jako jsou kličky, kultivační média, inkubátor, atd.

Postup:

1. S použitím čerstvé, čisté kultury připravte suspenzi testovaného organismu odpovídající 0,5 McFarlanda.
2. S použitím sterilního tamponu nebo Drigalskiho špachtle rozetřete suspenzi rovnoměrně po celém povrchu Mueller-Hinton agaru. **Nesmí být použit Iso-sensitest agar (falešná negativita).**
3. S použitím dávkovače na jednu kartuš umístěte jednu od každé tablety na inokulovaný povrch agaru tak, aby byl mezi tabletami dostatečný prostor pro správné naměření inhibičních zón. Poznámka: v případě, že izoláty nevykazují žádnou inhibiční zónu kolem IMI10, test je nutno opakovat. IMI10 a IM + DP by měly být umístěny ve vzdálenosti cca 5 mm (synergie).
4. Inkubujte při 35 \pm 1 °C po dobu 18 \pm 2 hodiny (přes noc)
5. Změřte a zaznamenejte průměr inhibiční zóny. Chybějící zóna kolem tablety odpovídá 9 mm inhibiční zóně.

6. Pokud izoláty nevykazují žádnou zónu kolem Imipenemu 10 ug (průměr zóny 9 mm = šířka disku), zaznamenejte synergismus (stínovou zónu) nebo ne-synergismus mezi imipenem a imipenem + 10ug DPA.

Interpretace výsledků:

Výsledky jsou interpretovány porovnáním inhibičních zón kolem různých tablet.

Pro *Pseudomonas aeruginosa*:

1. Změřte inhibiční zóny kolem tablety Imipenem 10 ug (IMI10) a porovnejte ji se zónami kolem tablet Imipenem + fenylboritá kyselina (IMPBO) a Imipenem + Cloxacilin High (IPCX4). V případě, že rozdíl zón:

- IMPBO a IMI10 je ≥ 4 mm
- IPCX4 a IMI10 je < 3 mm

vykazuje organismus KPC aktivitu.

Poznámka: Je-li IPCX4 zóna ≥ 5 mm než IMI10, kmeny neprodukují karbapenemázy. (netestovat touto soupravou).

2. Změřte inhibiční zónu kolem tablety Imipenem 10 ug (IMI10) a porovnat ji se zónami tablet Imipenem + DPA (IM+DP) a imipenem + EDTA (IM10E). Pokud rozdíl zón kolem:

- IM + DP a IMI10 je ≥ 5 mm
- a / nebo
- IM10E a IMI10 je ≥ 8 mm

izolát produkuje metalo-beta-laktamázy.

Není-li žádná zóna inhibice u tablety IMI10 (9 mm) a

- inhibiční zóna IM + DP je ≥ 12 mm
- inhibiční zóna IM10E je ≥ 13 mm

je indikován synergismus, takže výsledek je pozitivní.

Poznámka: Testujte pouze ceftazidim rezistentní izoláty. V opačném případě mohou být výsledky falešně MBL-pozitivní (pokud je izolát Ceftazidim citlivý).

Heinrichs a kol (5) ukázali vhodnost použití kombinace Imipenem + DPA (ne meropenem + DPA) pro detekci MBL v *Pseudomonas aeruginosa*, s citlivostí 99% a specificitou 95%.

Meropenem + DPA je vhodné použít pro detekci MBL u *Enterobacteriaceae* (souprava R98015).

Pro *Acinetobacter* spp.

1. Stejná metodika, která platí pro detekci MBL u *Ps. Aeruginosa*.
2. Oxacilinázy jsou ovlivněny EDTA, což vede ke slabému synergismu mezi tabletami Imipenem + EDTA, zatímco u DPA není žádný vliv. Toho lze využít pro detekci oxacilináz u *Acinetobacter* spp.

Při odečítání výsledků používejte tabulku (viz níže).

Kontrola kvality: Kontrola kvality by se měla dělat nejméně na jednom mikroorganismu pro ověření pozitivní reakce a nejméně na jednom organismu pro ověření negativní reakce.

Doporučené kmeny pro provedení pozitivní a negativní kontroly jsou následující:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145/CCUG 59626, MBL pozitivní

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10141, MBL pozitivní (je možné použít pro oba, *Ps. aeruginosa* i *Acinetobacter*)

Klebsiella pneumoniae CCUG 58547, MBL pozitivní

Klebsiella pneumoniae NCTC 13439, MBL pozitivní

Klebsiella pneumoniae CCUG 56233, KPC pozitivní

Klebsiella pneumoniae NCTC 13438, KPC pozitivní /MBL negativní

Zdroje:

1. J. Bou Casals (2012) Stable combination discs of imipenem and dipicolinic acid, for phenotypic detection of metallo-beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. ECCMID. Presentation 304. Available at: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=3521
2. Fournier D., Garnier P., Jeannot K., Mille A., Gomez A. S. and Plésiat P. (2013) A Convenient Method To Screen for Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. vol. 51, no. 11, 3846-3848.
3. Fournier D., Garnier P., Jeannot K. and Plésiat P. (2013) Evaluation of nine phenotypic tests for the detection of metallo beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. ECCMID eP689. Available at: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=6253
4. Yong D., Lee Y., Jeong S. H., Lee K. and Chong Y. (2012) Evaluation of Double-Disk Potentiation and Disk Potentiation Tests Using Dipicolinic Acid for Detection of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol. vol. 50, no. 10, 3227-3232.
5. Heinrichs A et al: Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 34, 1467-1474, 2015.

Tabulka pro interpretaci výsledků

Bakterie	Rozdíl zón ve srovnání s Imipenem 10 ug				β -laktamáza
	IMPBO	IPCX4	IM+DP	IM10E	
<i>Ps. aeruginosa</i>		≥ 5 mm			Žádná produkce karbapenemáz
	≥ 4 mm	≤ 3 mm			KPC
<i>Acinetobacter</i> spp.			≥ 5 mm nebo stínová zóna	≥ 8 mm	MBL
			≥ 5 mm nebo stínová zóna	≥ 8 mm	MBL
			≤ 3 mm	4-7 mm	oxacilináza

Zkratky

IMI10: Imipenem 10 μ g

IMPBO: Imipenem 10 μ g + kyselina fenylboritá

IPCX4: Imipenem 10 μ g + Cloxacillin High

IM+DP: Imipenem 10 μ g + Dipikolinová kyselina

IM10E: Imipenem + EDTA

KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemase

MBL: Metallo-beta-lactamase