

## Návod k použití

### **KPC/Metallo-B-Lactamase Confirm Kit (98006)** **KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit (98015)**

*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; KPC, MBL a OXA-48 u *Enterobacteriaceae*.

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

#### Princip testu

Čtyři kartuše s tabletami obsahující 10 µg Meropenemu (difundovatelné množství) samostatně a v kombinaci s inhibitory různých β-laktamáz. Inhibitory jsou přidány kvůli diferenciaci mezi izoláty s a bez mechanismů rezistence (vysvětlení níže). Navíc KPC/MBL a OXA-48 Kit (98015) také obsahuje jednu kartuš se 30 ug Temocilinu pro detekci OXA-48 nebo podobných produkujících izolátů.

Pokud má organismus sníženou citlivost ke karbapenemům, může to být ze tří pravděpodobných důvodů:

1. Organismus má hyperprodukcii AmpC. Díky pomalé hydrolyze karbapenemů enzymem AmpC, je AmpC pravděpodobně spojen s jiným mechanismem rezistence, jako je efluxová pumpa, ztráta porinu nebo jiné β-laktamázy. Enzym AmpC je inhibován kloxacilinem. Cloxacilin se používá k rozlišení mezi AmpC a KP, protože oba jsou inhibovány kyselinou boritou. Tento rozdíl ( $\geq 5$ mm) v zónách mezi Meropenemem a Meropenem + Cloxacilinem indikuje aktivitu AmpC.
2. Organismus produkuje metalo-β-laktamázu, která účinně hydrolyzuje karbapenemy. MBL jsou inhibovány kyselinou dipikolinovou a rozdíl ve velikosti zóny ( $\geq 5$ mm) mezi Meropenemem a Meropenem + DPA indikuje přítomnost MBL. DPA nemá žádnou (na rozdíl od EDTA) vnitřní antimikrobiální aktivitu a tím je výsledek s touto látkou snadněji interpretovatelný.
3. Organismus produkuje enzym KPC. KPC enzymy jsou inhibovány kyselinou fenylboritou. Nicméně kyselina fenylboritá inhibuje také AmpC a z důvodu zvýšení specifčnosti soupravy, je zahrnuta i kombinace s Cloxacilinem pro rozlišení těchto dvou typů. Takže rozdíl v zónách ( $\geq 4$  mm) u Meropenem + kyselina fenylboritá, ale žádný rozdíl ( $< 4$  mm) u Meropenem + Cloxacilin naznačuje přítomnost enzymu KPC.
4. *Enterobacteriaceae* produkují oxacilinázu (OXA-48 nebo podobnou). Negativní výsledky všech synergických testů a žádná inhibiční zóna u Temocilinu 30 ug je u OXA-48 pravděpodobná. Vedle toho, tyto izoláty jsou vysoce rezistentní na Piperacilin-tazobactam. Prosím, všimněte se: pokud jak Meropenem, tak všechny kombinace nemají žádnou inhibiční zónu, test Temocilinu není validní a výsledek je neprůkazný. Test Temocilinu je **validní pouze pro *Enterobacteriaceae***.

#### 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

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice  
Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

[www.rosco.dk](http://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](mailto:info@rosco.dk) nebo Fax: +45 43 52 73 74

### Obsah balení

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

1. Meropenem 10 µg, kód MRP10
2. Meropenem 10 µg + Kys. fenyloboritá (KPC a AmpC inhibitor), kód MRPBO
3. Meropenem 10 µg + Cloxacilin (AmpC inhibitor), kód MRPCX
4. Meropenem 10 µg + Kys. dipikolinová (Metallo-β-Laktamáza inhibitor), kód MRDPDP
5. Temocilin 30 µg (pouze u OXA-48 Confirm Kitu 98015)

### Uchovávání / manipulace

Uchovávejte při 2-8 °C v dodané krabici nebo neotevřené kartuši do data expirace uvedeného na štítku. Než sundáte víčko z kartuše, nechejte ji při pokojové teplotě po dobu 30-60 minut. Jakmile je kartuš otevřená a zvláště když je dána do dávkovače, je třeba ji nechat při pokojové teplotě maximálně 2 měsíce. Pokud je to nezbytné a kartuš je otevřena více jak 2 měsíce, uchovávejte ji při teplotě 2-8 °C. Vždy kartuš uzavírejte zeleným víčkem a nikdy nevkládejte dávkovač do chladničky. Pokud kartuše uchováváme v chladničce, vždy by měly být před vlastním použitím přizpůsobeny pokojové teplotě.

### 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 všechen biologicky nebezpečný odpad sterilizujte. Nahlédněte do Bezpečnostního listu pro daný produkt.

### Potřebný, ale nedodávaný materiál

Standardní mikrobiologické pomůcky, jako jsou kličky, kultivační média, inkubátor, atd. a biochemické reagenty.

### Postup

S použitím čerstvé, čisté kultury připravte suspenzi testovaného organismu odpovídající 0,5 McFarlanda  
S použitím sterilního tamponu nebo Drigalskiho špachtle rozetřete suspenzi rovnoměrně po celém povrchu Mueller Hinton agaru pro testování citlivosti.

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. Uvědomte si, že na jedné misce lze provést více než jeden test Confirm Kit.

Inkubujte při 35 ± 1 °C po dobu 18 ± 2 hodiny (přes noc)

Změřte a zaznamenejte průměr inhibiční zóny. Chybějící zóna kolem tablety odpovídá 9 mm inhibiční zóně.

### Interpretace výsledků

Výsledky jsou interpretovány porovnáním inhibičních zón kolem různých tablet.

1. Porovnejte zónu inhibice u tablety Meropenemu 10 µg se zónami inhibice každé tablety Meropenem 10 µg + inhibitor. Pokud jsou všechny zóny navzájem v rozmezí 3 mm od sebe, výsledek je, že organismus nemá KPC nebo MBL aktivitu.
2. Změřte inhibiční zónu kolem Meropenem 10 µg (MRP10) a porovnejte se zónou okolo Meropenem 10 µg + Cloxacilin (MRPCX) a okolo Meropenem + Kys. fenyloboritá (MRPBO).

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice  
Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

Pokud je zóna pro tabletu MRPCX  $\geq 5$  mm a zóna MRPBO  $\geq 4$  mm než zóna samotného léku, respektive, organismus projevuje pouze aktivitu AmpC. AmpC je

pravděpodobně hyperprodukována a/nebo spojena se ztrátou porinu a/nebo efluxovou pumpou.

3. Změřte inhibiční zónu okolo Meropenem 10  $\mu$ g (MRP10) a porovnejte se zónou okolo Meropenem 10  $\mu$ g + kyselina fenylboritá (MRPBO) a Meropenem + Cloxacilin (MRPCX). Pokud je zóna kombinované tablety MRPBO  $\geq 4$  mm a MRPCX  $\leq 3$  mm než zóna samotného léku, organismus projevuje pouze aktivitu KPC.

*A/nebo*

Změřte inhibiční zóny okolo dvojkombinačních disků MRPBO a MRPCX: pokud je zóna okolo disku MRPBO  $\geq 4$  mm než zóna okolo disku MRPCX, pak je izolát KPS pozitivní.

4. Změřte inhibiční zónu okolo Meropenem 10  $\mu$ g (MRP10) a porovnejte se zónou okolo Meropenem 10  $\mu$ g + DPA (MRPDP). Pokud je zóna okolo MRPDP  $\geq 5$  mm v porovnání s jednoduchým diskem, organismus je pozitivní na aktivitu metalo-  $\beta$ -laktamázy. Testujte pouze izoláty rezistentní i Cefprozimu. Izoláty citlivé na Cefprozim mohou být MBL falešně pozitivní.
5. Porovnejte zónu okolo Temocilinu 30  $\mu$ g. Pokud inhibiční zóna není, pak je kmen předběžně OXA-48 (nebo podobné) pozitivní. V 80% případech je OXA-48 provázena CTX-M, ESBL. Detekce je možná použitím CAZ/Klavulanát nebo Meropenem + Tazobactam.
6. Je možné, aby organismus byl pozitivní na více než jeden mechanismus rezistence. Takže pokud je například hodnota v bodě 4)  $\geq 5$  mm a v bodě 3) je  $\geq 4$  mm, pak je organismus pozitivní jak na MBL, tak na KPC aktivitu, ačkoliv v některých případech může MBL maskovat KPC, takže ji v přítomnosti MBL může být obtížné detekovat. Žádná z kombinací mechanismů rezistence není nemožná a na jedné misce lze testovat více než jeden Confirm Kit.
7. Pro pomoc při interpretaci použijte Tabulku 1.

Izoláty, které produkují jak KPC, tak MBL na stejné izolaci byly popsány v Německu a Řecku. Rosco Diagnostica vyvinula trojkombinační tabletu: Meropenem + fenylboritá kyselina + dipikolinová kyselina, která umožňuje identifikaci obou enzymů (porovnání inhibičních zón Meropenem + DPA a Meropenem + fenylboritá kyselina, respektive). Trojkombinace pro detekci KPC+MBL(68912) je dostupná pro test na jednom izolátu (Tabulka 2).

### **Kontrola kvality**

Ačkoliv ROSCO Diagnostica A/S vyrábí zdaleka nejstabilnější difúzní disky (tablety), je nezbytné provádět pravidelnou kontrolu kvality. Ta by se měla dělat nejméně na jednom mikroorganismu pro ověření pozitivní reakce a nejméně na jednom organismu pro ověření negativní reakce. Zóny inhibice získané s použitím kombinovaných tablet plus samotných karbapenemových tablet proti negativní kontrole (tj. *E. coli* ATCC 25922), by měly být v rozmezí 3 mm.

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice  
Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

**Tabulka 1**

		Meropenem + kys. boritá MRPBO	Meropenem + DPA MRPDP	Meropenem + Cloxacilin MRPCX	Temocilin 30 ug
AmpC + ztráta porinu	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4 mm a	≤ 3 mm	≥ 5 mm	≥ 12 mm
ESBL + ztráta Porinu (a)	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 12 mm
KPC	Meropenem 10µg MRP10	≥ 4 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	různé
	Meropenem + Cloxacilin (MRPCX)	≥ 4 mm	-	-	-
MβL	Meropenem 10µg MRP10	< 4 mm	≥ 5 mm	≤ 3 mm	různé
OXA-48 a podobné	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Zádná Inhibiční zóna
OXA-48 + ESBL (a)	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Zádná Inhibiční zóna

(a): synergie CAZ/Klavulanát

Žádná AmpC, KPC nebo MBL: Všechny zóny v kombinacích jsou navzájem v rozmezí 3 mm od sebe. OXA-48 vykazuje negativní výsledky u KPC+MBL Confirm Kitu, ale je Temocilin rezistentní (žádná zóna okolo Temocilinu 30 ug).

<b>Tabulka 2</b>		Trojkombinace MER+DPA+BO Dvojitý inhibitor
KPC	MRPDP	≥ 4 mm
MBL	MRPBO	≥ 4 mm
KPC + MBL	MRPDP	≥ 4 mm a
	MRPBO	≥ 4 mm

**Literatura:** [www.rosco.dk](http://www.rosco.dk)

Revize: DBV0034H

Datum vydání: 02. 04. 2013

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

**BioVendor – Laboratorní medicína a.s.**

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice  
Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: [info@biovendor.cz](mailto:info@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)