

KPC, MBL and OXA- 48 Confirm kit

Kit per conferma delle Carbapenemasi

Impiego Previsto: Le tavolette vengono utilizzate per l'identificazione in vitro dei meccanismi di resistenza microbica con il metodo della diffusione su agar. Il fine è quello di confermare il meccanismo per mezzo del quale l'organismo ha sviluppato resistenza verso specifici agenti antimicrobici. Questo kit è adatto all'identificazione delle carbapenemasi; KPC, MBL e OXA-48 nelle Enterobacteriaceae

Utilizzatori previsti: Da utilizzarsi solamente da personale professionale e opportunamente addestrato a lavorare con agent microbici e con test di diffusione da dischetti .

Principio del test: Il Kit è composto da quattro cartucce di tavolette contenenti 10 µg di Meropenem (quantità diffusibile) da solo e in combinazione con inibitori di diverse beta-lattamasi. Gli inibitori sono in grado di discriminare gli isolati dotati o meno di meccanismi di resistenza (vedi istruzioni in calce). Il kit contiene anche una cartuccia di tavolette di 30 µg di Temocillina per identificare gli organismi produttori di OXA 48 o similari.

Se un organismo mostra ridotta sensibilità ai Carbapenemi questo può dipendere da 4 ragioni:

- 1. L'organismo è un iper produttore di AmpC,** Poiché l'AmpC da solo è lento ad idrolizzare i carbapenemi, probabilmente esso è potenziato da altri meccanismi di resistenza quali la pompa di efflusso, perdita di porina o altre beta-lattamasi. L'enzima AmpC è inibito dalla Cloxacillina. La Cloxacillina viene utilizzata per distinguere tra AmpC e KPC dal momento che entrambi sono inibiti dall'Acido Fenilboronico. Ne consegue che una differenza (≥5 mm) nell'estensione delle zone di Meropenem e Meropenem+Cloxacillina indica L'attività dell'AmpC.
- 2. L'organismo produce una beta-lattamasi che inibisce efficacemente i carbapenemi.** Le MBL sono inibite dall'Acido Dipicolinico ed una differenza (≥5 mm) nell'estensione delle zone di Meropenem e Meropenem+DPA indica la presenza di MBL. Il DPA al contrario dell'EDTA non ha intrinseca attività antimicrobica e questo rende più facilmente identificabili questi composti.
- 3 L'organismo produce l'enzima KPC.** I KPC sono inibiti dall'Acido Fenilboronico. Questo però inibisce anche le AmpC, quindi per aumentare la specificità del kit è stata introdotta la tavoletta di Meropenem in combinazione con Cloxacillina. Una differenza (≥4 mm) nell'estensione delle zone di Meropenem e Meropenem+ Acido Fenilboronico ma nessuna differenza (>4 mm) nell'estensione delle zone di Meropenem e Meropenem+Cloxacillina indica la presenza di un enzima KPC.
- 4 Le Enterobacteriaceae producono una oxacillinasi (OXA – 48 o similare).** Un risultato negativo di tutte le prove di sinergia e nessuna zona di inibizione con la tavoletta di Temocillina 30 µg, è indicativo della presenza di una OXA 48 o similare. Inoltre questi organismi sono altamente resistenti all'associazione Piperacillina+Tazobactam. **NOTA:** se né Meropenem né alcuna delle combinazioni mostra zone di inibizione, il test alla Temocillina non è valido e il risultato è nullo. Il test alla Temocillina è valido SOLO per le Enterobacteriaceae.

Contenuto e formulazione:

5 cartucce, formulate per ottenere la massima stabilità, ciascuna contenente 50 tavolette:

1. Meropenem 10 µg, cod. MRP10
2. Meropenem 30 µg + Acido Fenilboronico (inibitore di KPC e AmpC), cod.MRPBO
3. Meropenem 30 µg + Cloxacillina (inibitore di AmpC), cod. MRPCX
4. Meropenem 30 µg + Clavulanato + Acido Dipicolinico (inibitore di MBL), cod. MRDPD
5. Temocillina 30 µg

Conservazione/Utilizzazione: conservare a 2-8 °C nella confezione originale o nelle cartucce non aperte fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Lasciare le cartucce a temperatura ambiente per 30-60 minuti prima di rimuovere il coperchio. Dopo che la cartuccia è stata aperta e posta nel dispensatore, può essere tenuta a temperatura ambiente sino a 2 mesi. Se si utilizza la cartuccia per un periodo superiore a 2 mesi, può essere conservata a 2-8 °C. Sigillare sempre le cartucce con il coperchio originale verde e non mettere mai il dispenser nel frigorifero. Quando vengono conservate a 2-8 °C le cartucce devono essere portate a T ambiente come descritto sopra prima dell'uso.

Precauzioni:

Solamente per uso diagnostico *in vitro*. Adottare precauzioni di sicurezza e lavorare in condizioni di sterilità quando si maneggia materiale a potenziale rischio biologico. Da utilizzarsi solamente da personale professionale e opportunamente addestrato.

Sterilizzare tutti i rifiuti dopo l'utilizzo e prima dello smaltimento. Fare riferimento alla Scheda di Sicurezza del Prodotto.

Materiali richiesti, ma non forniti:

Attrezzature microbiologiche standard come anse sterili, terreni di coltura, incubatori ecc. e reagenti biochimici.

Procedura:

1. Utilizzando una coltura pura e fresca preparare una sospensione dell'organismo da esaminare equivalente allo standard di McFarland 0,5
2. Utilizzando un tampone sterile o una spatola di Drigalski distribuire la sospensione in modo uniforme su tutta la superficie di una piastra di Mueller Hinton susceptibility agar.
3. Utilizzando una pinzetta o un dispensatore, deporre una tavoletta per tipo sulla superficie della piastra inocolata, assicurandosi che ci sia spazio sufficiente tra le singole tavolette per permettere l'adeguata misurazione delle zone di inibizione. Si può utilizzare più di un ConfirmID sulla stessa piastra.
4. Incubare a 35±1 °C per 18±2 ore (overnight)
5. Misurare e registrare il diametro della zona di inibizione. Nessuna zona attorno alla tavoletta corrisponde ad una misura di 9 mm (diametro della tavoletta).

Interpretazione dei risultati:

I risultati vengono interpretati confrontando le zone di inibizione delle diverse tavolette.

1. Confrontare la zona di inibizione della tavoletta di Meropenem 10 µg con le zone di inibizione di ciascuna delle tavolette con le combinazioni di Meropenem 30 µg + inibitore. Se tutte le differenze tra le zone sono entro i 3 mm l'una dall'altra, l'organismo non esprime attività KPC né MBL

2. Misurare la zona di inibizione attorno a Meropenem 10 µg (MRP10) e confrontarla con le zone intorno alle due tavolette di Meropenem 30 µg + Cloxacillina (MRPCX) e Meropenem 30 µg + Acido Fenilboronico (MRPBO): Se la zona attorno a MRPCX è ≥ 5 mm e la zona attorno a MRPBO è ≥ 4 mm rispetto alla tavoletta singola, l'organismo dimostra solo attività AmpC. L'AmpC è probabilmente iper-prodotto o associato a perdita di porina e/o pompa di efflusso.
3. Misurare la zona di inibizione attorno a Meropenem 10 µg (MRP10) e confrontarla con le zone intorno alle due tavolette di Meropenem 30 µg + Acido Fenilboronico (MRPBO) e Meropenem 30 µg + Cloxacillina (MRPCX). Se la zona attorno a MRPBO è ≥ 4 mm e la zona attorno a MRPCX è ≤ 3 mm rispetto alla tavoletta singola, l'organismo dimostra attività KPC.
Paragonare le due zone intorno alle tavolette MRPBO e MRPCX: se la zona attorno a MRPBO è ≥ 4 mm della zona attorno a MRPCX, l'isolato è KPC positivo.
4. Misurare la zona di inibizione attorno a Meropenem 10 µg (MRP10) e Meropenem+DPA (MRDPD). Se la zona attorno a MRDPD è ≥ 5 mm rispetto alla tavoletta singola, l'organismo è positivo per attività di beta-lattamasi. Testare solo gli organismi Ceftazidime resistenti. Con i ceppi Ceftazidime sensibili si possono ottenere falsi MBL positivi.
5. Alcuni isolati che mostrano una MIC ≤ 0.25 ug/mL (zona di inibizione al Meropenem 10 ug > 25 mm) possono essere produttori di carbapenemasi (Metallo beta-lattamasi VIM-1 o similari) e possono essere difficili da identificare con il kit di conferma KBL-MBL. Per riconoscere questi isolati utilizzare Imipenem 10 ug e Meropenem 10 ug e porre una tavoletta di Acido Dipicolinico (DPA) tra loro a una distanza di 10 mm da ciascuno. Il sinergismo tra DPA e Imipenem e/o Meropenem indica una MBL.
6. Osservare la zona intorno alla Neo Sensitabs Temocillina 10 ug. Se non c'è zona di inibizione, il ceppo è presumibilmente produttore di OXA-48 o similari. Nell'80 % di questi casi l'OXA-48 è accompagnato da un CTX-M, ESBL. Questo può essere identificato mediante l'uso di CAZ/Clavulanato o Meropenem+Tazobactam
7. E' possibile che un organismo sia positivo per più di un meccanismo di resistenza. Per esempio se il valore al punto 4 è ≥ 5 mm e il valore al punto 3 è ≥ 4 mm, l'organismo è positivo sia per MBL che per KPC, sebbene in molti casi l'MBL possa mascherare la KPC rendendo difficile la sua identificazione. Nessuna combinazione di meccanismi di resistenza può essere esclusa a priori e sulla stessa piastra si possono utilizzare diversi kit di conferma.
8. Utilizzare la tabella 1 per l'interpretazione delle piastre.
Ceppi produttori sia KPC che MBL nello stesso isolato sono stati descritti in Grecia ed in Germania. Rosco Diagnostica ha sviluppato una tavoletta a tripla combinazione contenente Meropenem+Acido Fenilboronico+Acido Dipicolinico che permette l'identificazione di entrambi gli enzimi (confronto con le zone di inibizione di Meropenem e DPA e Meropenem e PBO rispettivamente). Queste tavolette (cod.2368912) sono disponibili per l'identificazione di KPC+MBL nello stesso isolato (tabella 2).

Controllo di Qualità:

Sebbene ROSCO Diagnostica A/S produca le tavolette a diffusione più stabili, è comunque necessario eseguire regolarmente i controlli di qualità. Procedere utilizzando almeno un organismo che produca una reazione positiva ed uno che produca una reazione negativa. Le zone di inibizione ottenute con le tavolette multiple a confronto con quelle contenenti i soli Carbapenemi, utilizzando un organismo per il controllo negativo (es. *E. coli* ATCC 25922), dovrebbero mostrare differenze al massimo di 3 mm. Differenze maggiori indicano che il prodotto ha perso attività e non deve essere utilizzato.

I seguenti ceppi possono essere utilizzati per il C.Q. positivo:

- Klebs. pneumoniae ATCC BAA-1705, KPC positiva
- Klebs. pneumoniae ATCC BAA-2146, MBL positiva
- Klebs. pneumoniae NCTC 13438, KPC positiva
- Klebs. pneumoniae NCTC 13439, MBL positiva

può essere utilizzata per il C.Q. positivo:

- Klebs. pneumoniae ATCC 700603

Tabella 1

		Meropenem +Acido Fenilboronico.MRPBO	Meropenem+DPA MRPDP	Meropenem+Cloxacillina MRPCX	Temocillina 30 ug
AmpC + perdita di porina	Meropenem 10 ug MRP10	≥ 4 mm	≤ 3 mm	≥ 5 mm	≥ 12 mm
ESBL + perdita di porina (a)	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 12 mm
KPC	Meropenem 10 ug MRP10	≥ 4 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Variabile
	Meropenem+ Cloxacillina (MRPCX)	≥ 4 mm	--	--	--
MBL	Meropenem 10 ug MRP10	< 4 mm	≥ 5 mm	≤ 3 mm	Variabile
OXA-48 e simili	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Nessuna inibizione
OXA-48 +ESBL (a)	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Nessuna inibizione

(a) : sinergismo CAZ/Ac. Clavulanico

Assenza sia di ESBL che di KPC che di AmpC: tutte le zone entro 3mm l'una dall'altra.

OXA -48: negativo con test di Conferma per KPC+MBL ma Temocillino-resistente (nessuna inibizione attorno alla pastiglia Neo-Sensitabs di Temocillina 30 ug).≥

Reference

Le descrizioni dettagliate ROSCO per la identificazione dei meccanismi di resistenza: “ ROSCO’s User’s Guide for Detection of Resistance Mechanisms” in lingua inglese e Le User’s Guide sempre in lingua inglese possono essere richieste ai nostri uffici o direttamente a ROSCO Diagnostica A/S: E-mail: info@rosco.dk, Fax +45 43 52 73 74, oppure essere consultate e/o stampate dal sito www.rosco.dk.

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

Confezione

2398015 KPC, MBL and OXA- 48 Confirm kit 50 test

CND: W01040805

