

IMPREGNOWANE KRAŻKI DO WYKRYWANIA METALO-BETA-LAKTAMAZ (MBL) Rurka 50 krażków

TEST PRZESIEWOWY DO WYKRYWANIA METALO-BETA-LAKTAMAZ

1-ZASTOSOWANIE KLINICZNE

Karbapenemy (imipenem, meropenem, ertapenem, itp.) to grupa antybiotyków stosowanych z wyboru w leczeniu infekcji wywołanych przez wielooporne pałeczki gramujemne (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, enterobakterie, itp.). Opisano dwa typy enzymów hydrolizujących (karbapenemaz), niwelujących działanie karbapenemów: karbapenemazy serynowe i metalo-beta-laktamazy (MBL) (5). Obydwa enzymy zapewniają odporność na działanie antybiotyków tej grupy. Wykrywanie szczepów bakteryjnych wytwarzających metalo-beta-laktamazy (MBL), umożliwia w razie konieczności modyfikację wdrożonego leczenia oraz implementację środków bezpieczeństwa zapobiegających wystąpieniu zakażeń szpitalnych i rozprzestrzenianiu się wspomnianych szczepów bakteryjnych (4).

2- ZASADA METODY

Metallo-beta-laktamazy (MBL) to enzymy należące do klasy B wg. klasyfikacji molekularnej Amblera (1, 4). Ich aktywność jest uzależniona od obecności dwuwartościowych kationów, takich jak na przykład cynk. Dzięki temu, aktywność MBL można hamować za pomocą odczynników chelatujących, takich jak EDTA (kwas wersenowy), które łączą się z kationami cynku.

Metoda ta polega na porównaniu aktywności *in vitro* krażka impregnowanego antybiotykiem należącym do grupy karbapenemów, (imipenem lub meropenem) do krażka impregnowanego tym samym antybiotykiem połączonym z inhibitorem enzymu metalo-beta-laktamazy: EDTA, wobec szczepu bakteryjnego zidentyfikowanego do poziomu gatunku.

W przypadku bakterii wytwarzających ten enzym, aktywność *in vitro* krażka zawierającego karbapenem i EDTA jest wyższa niż krażka z samym karbapenem. EDTA blokuje działanie MBL. Dzięki temu antybiotyk może oddziaływać na bakterie.

Wyboru stężeń karbapenemu i EDTA dokonano na podstawie publikacji naukowych (6) i zwalidowano je.

3- OPAKOWANIA

6,5 mm krażki wykonane z wysokiej jakości bibuły impregnowanej roztworem antybiotyku/inhibitor o dokładnie określonym stężeniu.

Krażki z każdej strony są wyraźnie oznakowane 4 literowym symbolem.

Nazwa	SI żenle	S mbol	O akowanie	Nr katalogowy
Imi enem+EDTA	10/930	EIPM	1 x 50 kr żków	67936
Mero enem+EDTA	10/930	EMEM	1 x 50 kr żków	67966

4- PRZECZOWYWANIE

Podana data ważności odnosi się wyłącznie do krażków w nie otwieranym opakowaniu, przechowywanym zgodnie z zaleceniami producenta. Data ważności i numer serii znajdują się na etykiecie (na rurce z krażkami oraz na opakowaniu zewnętrznym).

- Rurki z krażkami należy przechowywać w oryginalnym opakowaniu w temp. +2-8°C, w suchym miejscu.
- Przed otwarciem opakowanie z krażkami przenieść i pozostawić w temp. pokojowej (do godziny). Po wyjęciu potrzebnej liczby krażków, pozostałe schować do +2-8°C.
- Nie używać krażków po upływie terminu przydatności.
- Nie używać krażków, które były pozostawione w temp. pokojowej (18-30°C) ponad 8 godzin, lub poddane wielokrotnym zmianom temperatury (z chłodni do temp. pokojowej), ewentualnie nastawić antybiogramy wzorcowe przed dalszym użytkowaniem's..
- Krażki pozostające w dyspenserze powinny być przechowywane w temp. +2-8°C, w suchym miejscu, z **pochłaniaczem wilgoci** wewnątrz.
- Zwalidowano przechowywanie krażków w otwartym opakowaniu w dyspenserze, z pochłaniaczem wilgoci, w temp. +2-8°C w suchym miejscu. Okres stabilności, wyrażony w tygodniach, oznaczony jest we wnętrzu piktogramu:

S-INNE NIEZBĘDNE MATERIAŁY

- o Dyspenser krążków. na 7 krążków nr kat. # 50294
na 12-16 krążków nr kat. # 50295
- o Podłoża mikrobiologiczne do testu antybiotykooporności : Muel/er-Hinton
Szczepy wzorcowe bakterii
- o Wzorzec gęstości inokulum: 0.5 w skali McFarlanda lub inna metoda weryfikacji gęstości zawiesiny
- o Sprzęt laboratoryjny do oznaczania wrażliwości na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krążkową

6-ZALECENIA DLA UŻYTKOWNIKA

Należy postępować zgodnie z najnowszymi, stosownymi zaleceniami CLSI (7). Wyniki uzyskane z wykorzystaniem impregnowanych krążków, zależą nie tylko od stężenia substancji w krążku, ale także od stosowania właściwego inokulum, zalecanego podłoża, warunków przechowywania i innych czynników.

Należy przestrzegać zasad bezpieczeństwa pracy z materiałem zakaźnym. Wykorzystane hodowle i wszystkie zanieczyszczone nimi materiały poddać sterylizacji.

7- PROCEDURA

Krążków nie należy używać do przeprowadzania testów bezpośrednio na próbkach klinicznych.

Przygotowanie inokulum:

Zapoznaj się z rekomendacjami CLSI/NCCLS dotyczącymi uzyskiwania inokulum o gęstości 0.5 MacFarland'a z czystej, młodej hodowli, CLSI (7). Identyfikacja szczepu jest istotnym elementem uzyskania wyniku. Występowanie metalo-beta-laktamaz opisano jedynie dla: entrobakterii, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* (4, 5).

Inokulacja podłóża Muel/er-Hinton:

Patrz technika opisana przez CLSI (7). Czas i temperatura inkubacji zależą również od odpowiednich zaleceń: 16-20 godzin w temperaturze 35-37°C są zazwyczaj uznawane za satysfakcjonujące.

Nakładanie krążków:

Wyboru preferencyjnie używanej kombinacji krążków można dokonać na podstawie wyniku identyfikacji szczepu, niemniej biorąc pod uwagę czułość i swoistość metody, wyniki badań przeglądowych będą optymalne przy stosowaniu obu kombinacji oraz odpowiednio krążka z samym karbapenemem.

Nanieść krążek z imipenemem 10 ~g (kod produktu 66568) oraz krążek z **Imipenem + EDTA** (kod produktu 67936) na powierzchnię odpowiedniego podłoża na płytce (Muel/er-Hinton), zaszczipionego czystym szczepem bakteryjnym.

Nanieść krążek z meropenem 10 ~g (kod produktu 67048) i **meropenem + EDTA** (kod produktu 67966) na powierzchnię Odpowiedniego podłoża na płytce (Muel/er-Hinton), zaszczipionego czystym szczepem bakteryjnym.

Krążek z karbapenem oraz z kombinacją karbapenem/EDTA należy testować z użyciem tego samego inokulum aby uzyskać wiarygodny wynik pomiaru różnicy wielkości strefy.

Minimalna, rekomendowana odległość, mierzona od środka do środka krążka, to 3 cm.

8- INTERPRETACJA WYNIKÓW

Należy precyzyjnie zmierzyć średnicę stref zahamowania Obserwowaną wokół każdego z nałożonych krążków:

- o **Meropenem + EDTA (EMEM)** i sam meropenem (**MEM**)
- o **Imipenem + EDTA (EIPM)** i sam imipenem (**IPM**)
- o Szczep bakteryjny jest uznawany za potencjalnie wytwarzający metalo-beta-laktamazę, jeśli różnica średnic pomiędzy krążkiem zawierającym kombinację a krążkiem z samym karbapenemem jest większa lub równa 4 mm.
- o Każdy dodatni wynik oznacza potencjalną obecność metalo-beta-laktamazy, ale nie jest wystarczający do stwierdzenia tego fenotypu odporności. Jedyną techniką potwierdzającą jest genotypowa nie badanego szczepu. Określenie MIC (minimalnego stężenia hamującego) dla samego karbapenemu i karbapenemu + EDTA poświadcza wynik uzyskany w doświadczeniu z krążkami.

9- Charakterystyka testu

W zewnętrznej ewaluacji, obejmującej panel szczepów genotypowanych, ustalono próg wykrywalności metalo-beta-laktamaz dla szczepów je wytwarzających, czułość różnych kombinacji w krążkach i swoistość każdej z nich.

Panel testowanych szczepów bakteryjnych obejmował 28 szczepów o znanych genotypach, wytwarzających metalobeta-laktamazę i 43 szczepy o znanych genotypach, niewytwarzające metalo-beta-laktamazę:

Testowane szczepy	MBI+ In =28)	MBI- (n =43)			
		Oksacylina	Karbapenemazy klasy A	Inne mechanizmy	Kontrola ujemna
Enterobakterie	10	3	7	2	
<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Chryseobacterium</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	15		2	2	10
<i>Acinetobacter</i> spp.	3	12			5
Suma	28	15	9	4	15

Czułość i swoistość metody dla obu kombinacji krążków została przedstawiona w poniższej tabeli:

Szczepy enterobakterii	czułość %	swoistość %
Krażki imipenem+EDTA	40	100
Krażki meropenem+EDTA	80	85
Szczepy <i>Pseudomonas</i>/<i>Acinetobacter</i>	czułość %	% swoistość
Krażki imipenem+EDTA	72	97
Krażki meropenem+EDTA	100	35

Na podstawie uzyskanych wyników czułości i swoistości, w celu stwierdzenia wytwarzania metalo-beta-laktamaz w szczepach *Pseudomonas*/*Acinetobacter* i enterobakterii, zaleca się przeprowadzenie testu dla obu kombinacji krążków, **Imipenem+EDTA** i **meropenem+EDTA**. Podniesiona zostanie tym samym skuteczność metody przeglądowej.

W tabeli poniżej pokazano propozycję schematu decyzyjnego pomocnego w interpretacji wyników skryningu.

	Wynik z krażka IPM+EDTA	Wynik z krażka MEM+EDTA	Obecność MBI
Enterobakterie	+	+	Bardzo wysokie prawdopodobieństwo
	-	-	Niskie prawdopodobieństwo
	+	-	Bardzo wysokie prawdopodobieństwo
	-	+	Wysokie prawdopodobieństwo
<i>Acinetobacter</i> / <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	Bardzo wysokie prawdopodobieństwo
	-	-	Brak prawdopodobieństwa
	+	-	Wysokie (9) prawdopodobieństwo
	-	+	Niskie prawdopodobieństwo

Dodatnie lub ujemne wyniki odpowiadają różnicy średnic uzyskanych poprzez równoczesne oznaczenie dla krażka z samym karbapenem i jego kombinacją z EDTA.

10- KONTROLA JAKOŚCI

Aktywność krążków meropenem + EDTA i imipenem+EDTA powinna być systematycznie kontrolowana z użyciem następujących szczepów:

- o Szczep rekombinowany *Escherichia coli* Vim-4 wymieniony przez Kryterium akceptacji jest różnica średnicy pomiędzy krażkami meropenemu i meropenemu + EDTA oraz pomiędzy krażkami imipenemu i imipenemu+EDTA równa przynajmniej 4 mm.
- o Szczep *Escherichia coli* AICC 25922.

11- KONTROLA JAKOŚCI PRODUCENTA

Każdy produkt został przygotowany zgodnie z naszym systemem jakości, poczynając od materiałów wyjściowych, aż do ostatecznego produktu komercyjnego.

Każda seria ostatecznego produktu podlega oznaczeniu kontrolnemu i jest dopuszczona do użytku, jeśli spełnia wymagane kryteria. posiada protokoły produkcji i kontroli jakości każdej serii.

12- OGRANICZENIA METODY

Szczep bakteryjny musi zostać zidentyfikowany; obecność metalo-beta-laktamaz nie została potwierdzona dla bakterii Gram-dodatnich.

Działanie kombinacji karbapenem + EDTA było ewaluowane z użyciem krążków z samymi karbapenemami od tego samego producenta (10 ~g imipenemu, kod produktu 66568 i 10 ~g meropenemu, kod produktu 67048). Oznaczenie należy wykonywać stosując pojedyncze i połączone krażki od tego samego producenta.

Potwierdzenie wyników dodatnich poprzez genotypowanie jest konieczne do precyzyjnej identyfikacji właściwości enzymu odpowiadającego za oporność na karbapenemy.
Obecność mikrokotoni w strefie zahamowania wzrostu nie powinna być uwzględniana podczas odczytu średnicy i interpretacji wyników.

Falszywie dodatnie reakcje obserwowano w związku z permeabilizującym działaniem samego EDTA (3, 4).

13- LITERATURA

1. Ayres HM, Furr JR, Russell AD. 1999. Effects of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. Lett Appl Microbiol. 28: 13-6.
2. Denny B., West P., Panigrahi D. 2003. Effects of permeabilizers on antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter* spp. J. microbial Immunol Infect. 36:72-0.
3. Walsh T. R., Toleman M. A., Poiret L., Nordmann P. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? Clin. Microb. Rev. 18: 306-325.
4. Oueenan AM., Bush K. 2007. Carbapenemases: the Versatile β -lactamases Clin. Microb. Rev. 20: 440-458
5. Ambler R.P 1980. The structure of β -lactamases. Phi I. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 289: 321-331.
6. Pitout J.D.D., Gregson D. B., Poiret L., McClure J., Le P., Church D. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- β -lactamases in a large centralized laboratory. J. Clin. Microbiol. 43: 3129-3135.
7. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard - Ninth edition CLSI Document. M-A9.