

Kit per l'identificazione delle Beta-lattamasi

2398006 - KPC/Metallo-B-Lactamase Confirm Kit

2398010 - KPC+MBL detection Kit

2398015 - KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit

Solo per uso diagnostico in vitro

Revisione: DBV0034J del 09/02/2017

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

Distributore: Biolife Italiana

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** e MBL in **Bacterioides spp** (12).

NON usare con Pseudomonas (usare il kit cod. 2398025).

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: Quattro cartucce di compresse contenenti 10 mg di Meropenem (quantità diffusibile) da sole e in combinazione con inibitori di diverse beta-lattamasi. Gli inibitori vengono aggiunti per discriminare gli isolati con e senza meccanismi di resistenza (vedi spiegazione sotto). Inoltre, il kit KPC / MBL e OXA-48 Confirm (98015) contiene anche una cartuccia di 30 µg di compresse di Temocillina per rilevare i produttori di OXA-48 o simili. Se un organismo mostra una ridotta sensibilità ai carbapenemi, ci possono essere quattro probabili ragioni:

1. L'organismo iper produce AmpC. A causa della lenta idrolisi di carbapenemi dell'enzima AmpC, l'AmpC è probabilmente accoppiato ad altri meccanismi di resistenza come pompe di efflusso, perdita di porine o altre beta-lattamasi. L'enzima AmpC è inibito dalla cloxacillina. La cloxacillina è usata per distinguere tra AmpC e KPC poiché entrambi sono inibiti dall'acido fenilboronico. Quindi, una differenza (≥ 5 mm) nelle zone tra Meropenem e Meropenem + Cloxacillina indica l'attività AmpC.
2. L'organismo produce una metallo β -lattamasi che idrolizza i carbapenemi in modo efficiente. Le MBL sono inibite dall'acido dipicolinico e una differenza (≥ 5 mm) nella dimensione delle zone tra Meropenem e Meropenem + DPA indica la presenza di un MBL. Il DPA (contrariamente all'EDTA) non ha attività antimicrobica intrinseca e quindi i risultati con questo inibitore sono più facilmente interpretabili.
3. L'organismo produce un enzima KPC. Gli enzimi KPC sono inibiti da Acido Fenilboronico. Tuttavia, l'acido fenilboronico inibisce anche l'AmpC e per aumentare la specificità del Kit e distinguere tra i due, è inclusa la combinazione con Cloxacillina. Quindi, una differenza (≥ 4 mm) con l'alone di Meropenem + Acido Fenilboronico ma nessuna differenza (< 4 mm) con quello di Meropenem + Cloxacillina indica la presenza di un enzima KPC.
4. Le Enterobacteriaceae producono una oxacillinasi (OXA-48 o simile). Un risultato negativo di tutti i test di sinergia e nessuna zona di inibizione con Temocillina 30 µg è presuntivo di un OXA-48 o simile. Inoltre, questi isolati sono altamente resistenti a Piperacillina + tazobactam. Si prega di notare: se sia il Meropenem che tutte le combinazioni non mostrano alcuna zona di inibizione, il test di Temocillina non è valido e il risultato inconcludente. Il test della Temocillina è valido solo per Enterobacteriaceae.

Istruzioni dettagliate: Le istruzioni dettagliate per l'uso di ROSCO per il rilevamento dei meccanismi di resistenza dovrebbero essere disponibili nei laboratori che lavorano con i prodotti diagnostici di ROSCO. L'ultima versione dell'istruzione per l'uso può essere consultata e / o stampata dal sito web di ROSCO www.rosco.dk

La Guida per l'utente può essere ottenuta su richiesta gratuitamente dal proprio distributore locale o direttamente da ROSCO.

E-mail: info@rosco.dk

Telefono: +45 43 99 33 77

Contenuto e formulazione: 4 o 5 cartucce di compresse, formulate per la massima stabilità, ciascuna contenente circa 50 compresse:

1. Meropenem 10 µg, MRP10
2. Meropenem 10 µg + Phenylboronic Acid (inibitore di KPC and AmpC r), MRPBO
3. Meropenem 10 µg + Cloxacillin (inibitore di AmpC), MRPCX
4. Meropenem 10 µg + Dipicolinic acid (inibitore di Metallo-β-Lactamase), MRPDP.
5. Temocillin 30 ug (solo in OXA-48 Confirm kit 98015)

Conservazione/Utilizzazione: conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Sigillare sempre le cartucce con il coperchio originale verde e non mettere mai il dispenser nel frigorifero. Lasciare le cartucce a temperatura ambiente per 30-60 minuti prima di rimuovere il coperchio. Le cartucce possono essere aperte e richiuse più volte durante l'uso, senza alterare la shelf-life delle compresse. La lunga durata di conservazione è dovuta all'uso di sostanze cristalline.

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 inoculata, 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 Kit di Conferma sulla stessa piastra.
4. Incubare a 35±1 °C per 18±2 ore (overnight)
5. Misurare e registrare **il diametro** delle zone 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 compressa di Meropenem 10 µg con le zone di inibizione di ciascuna delle compresse di Meropenem + inibitore. Se tutte le zone differiscono per meno di 3 mm l'una dall'altra, l'organismo non esprime attività di KPC né attività di MBL.
2. Misurare la zona di inibizione attorno a Meropenem 10 µg (MRP10) e confrontare con le zone attorno alle due compresse con combinazione; Meropenem + Cloxacillin (MRPCX) e Meropenem + Phenylboronic (MRPBO): Se la differenza tra il singolo disco e la zona intorno a MRPCX è ≥ 5mm mentre quella con la zona intorno a MRPBO è ≥ 4mm, l'organismo sta dimostrando solo Attività AmpC. L'AmpC è probabilmente iper-prodotto e / o accoppiato con perdita di porcellane e / o pompe di efflusso.
3. Misurare la zona di inibizione attorno a Meropenem 10 µg (MRP10) e confrontare con le zone intorno a Meropenem + Phenylboronic Acid (MRPBO) e Meropenem + Cloxacillina (MRPCX): Se la zona intorno a MRPBO è ≥ 4mm e la zona intorno a MRPCX è ≤ 3mm rispetto al disco singolo, l'organismo dimostra l'attività di KPC. Confrontare inoltre le zone intorno ai due dischi combinati MRPBO e MRPCX: se la zona intorno al disco MRPBO è ≥ 4 mm rispetto alla zona attorno al disco MRPCX, l'isolato è KPC positivo.
4. Misurare la zona di inibizione attorno a Meropenem 10 µg (MRP10) e Meropenem + DPA (MRPDP): se la zona intorno a MRPDP è ≥ 5mm in confronto con il singolo disco, l'organismo è positivo per attività di Metallo-βLactamase. Testare solo gli isolati resistenti a ceftazidime. Con isolati sensibili a ceftazidime si possono ottenere falsi MBL positivi.

5. Alcuni isolati che mostrano MIC di Meropenem $\leq 0,25 \mu\text{g} / \text{ml}$ (zona di inibizione intorno a Meropenem $10 \mu\text{g} > 25 \text{ mm}$) possono essere produttori di carbapenemasi (metallo β lattamasi VIM-1 o simili) che possono essere difficili da rilevare con il KPC, MBL Confirm kit. Per rilevare questi isolati, utilizzare Imipenem $10\mu\text{g}$ e Meropenem $10 \mu\text{g}$ e posizionare un Diatabs di acido dipicolinico (DPA) tra di loro, a una distanza di 10 mm da bordo a bordo. Un sinergismo (zona fantasma) tra DPA e Imipenem e / o Meropenem indica una MBL.
6. Considerare la zona intorno a Temocillin $30 \mu\text{g}$. Se non ci sono zone di inibizione, il ceppo presuntivamente è OXA-48 (o simile) positivo. Nell'80% dei casi OXA-48 è accompagnato da un CTX-M, ESBL che può essere rilevato usando CAZ / Clavulanato o Meropenem + Tazobactam.
7. È possibile che un organismo sia positivo per più di un meccanismo di resistenza. Quindi, se ad esempio, il valore al punto 4) è $\geq 5\text{mm}$ e il valore al punto 3) è $\geq 4 \text{ mm}$, l'organismo è sia positivo per l'attività MBL che per la KPC, sebbene in molti casi l'MBL possa mascherare il KPC rendendolo difficile rilevare. Nessuna combinazione di meccanismi di resistenza è impossibile e più di un kit di conferma può essere testato sulla stessa piastra.
8. Utilizzare la tabella 1 come aiuto per l'interpretazione.
Isolati che elaborano sia KPC che MBL sono stati descritti in Grecia e Germania. ROSCO ha sviluppato una compressa con tripla combinazione: Meropenem + Fenilboronico + Dipicolinico (68912) che consente l'identificazione di entrambi gli enzimi (confronto con le zone di inibizione di Meropenem + DPA e Meropenem + fenilboronico rispettivamente). Il triplo disco è disponibile per il rilevamento 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. negativo:

- Klebs. pneumoniae ATCC 700603

Tabella 1 Enterobacteriaceae		Meropenem +Acido Fenilboronico.MRPBO	Meropenem+DPA MRPDP	Meropenem+Cloxacillina MRPCX	Temocillina 30 ug
AmpC + perdita di porina	Meropenem 10 ug MRP10	$\geq 4 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	$\geq 5 \text{ mm}$	$\geq 12\text{mm}$
ESBL + perdita di porina (a)	Meropenem 10 ug MRP10	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	$\geq 12\text{mm}$
KPC	Meropenem 10 ug MRP10	$\geq 4 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	Variabile
	Meropenem+ Cloxacillina (MRPCX)	$\geq 4 \text{ mm}$	--	--	--
MBL	Meropenem 10 ug MRP10	$< 4 \text{ mm}$	$\geq 5 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	Variabile
OXA-48 e simili	Meropenem 10 ug MRP10	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 12 \text{ mm}$
OXA- 48+ESBL (a)	Meropenem 10 ug MRP10	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 3 \text{ mm}$	$\leq 12 \text{ mm}$

(a) : sinergismo CAZ/Ac. Clavulanico
 Né AmpC, KPC né MβL: tutte le zone entro 3 mm l'una dall'altra.
 OXA-48 mostra risultati negativi con il kit KPC + MBL Confirm, ma è resistente alla Temocillina (nessuna zona intorno a Temocillin 30 ug).

Tabella 2 Enterobacteriaceae		Triple Disk: MER + DPA + BO Doppio inibitore	Temocillina 30 ug
KPC	MRPDP	≥4 mm	
MBL	MRPBO	≥4 mm	
KPC + MBL	MRPDP	≥4 mm <u>e</u>	
	MRPBO	≥4 mm	
MBL + OXA-48	MRPDP	<=3 mm	<=12 mm
	MRPBO	>=4 mm	<=12 mm

Tabella 3 Anaerobi (B.fragilis)			
		MRPBO	MRPDP
MBL	Meropenem 10 ug	< 4mm	>= 5mm
	MRP10		

Commenti:

Pantel et al (7) hanno valutato le prestazioni del kit 98015 per il rilevamento di Enterobacteriaceae produttrici di carbapenemasi e hanno riscontrato una sensibilità del 98,8% e una specificità del 93,1%. Il test ROSCO ha rilevato tutte le carbapenemasi di classe A e D includendo 5 OXA-48 con basso MIC di imipenem (0,25 - 0,38 ug / ml) e 16 produttori MBL (tipi NDM e VIM). Il test è facile da implementare (meno di 30 minuti di preparazione) e a basso costo. L'interpretazione è semplice e può essere rilevata la coespressione di diverse carbapenemasi.

Willey et al (8) hanno confrontato la Neo-Sensitabs Temocillin 30 ug con il corrispondente Di MAST: Dischi per la rilevazione della resistenza a Temocillina come markers per le carbapenemasi di classe D. Gli autori hanno concluso che i Neo-Sensitabs di ROSCO avevano una sensibilità del 100% e una specificità del 100%, mentre i dischi MAST (3 lotti diversi) hanno mostrato una sensibilità del 100% ma una specificità del 71-82%. La minore specificità può essere spiegata dall'instabilità della temocillina nei dischi di carta, dove è presente in una forma amorfa, mentre nei Neo-Sensitab è cristallina.

Dortet et al (9) hanno valutato l'algoritmo proposto dalla SFM (CA) per lo screening dei produttori di carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae. Con l'uso di Temocillina 30ug (TEMO), Ticarcillina + Clav 75 + 10 ug (TCC) e Imipenem 10 ug (IMI10) è possibile. I ceppi di Enterobacteriaceae che mostrano zone >= 15 mm con TEMO e TCC e >= 22 mm con IMI10 non sono produttori di carbapenemasi.

Hammerum et al (10) riportano per la prima volta in Danimarca un'epidemia di Citrobacter freundii produttore di NDM-1 trasmesso in vivo ad altre Enterobacteriaceae (utilizzando il kit 98015).

Karatuna et al (11) hanno confrontato il Mast D7OC e il kit Rosco 98015 per il rilevamento di carbapenemasi in Enterobacteriaceae. Per isolati produttori di OXA-48 + MBL i dischi Mast hanno rilevato il 75% dei doppi enzimi e il kit Rosco 98015 ne ha rilevato il 100%.

Schwensen et al (12) hanno utilizzato il kit KPC / MBL Confirm (98006) per il rilevamento fenotipico della metallo-beta-lattamasi di cfiA in Bacteroides fragilis. Concludono che il kit di conferma Rosco KPC / MBL ha rilevato tutti i B.fragilis produttori di MBL con un cut off di 4 mm di differenza tra le zone di inibizione.

Bibliografia:

1.Kemble S et al: Validation of ROSCO Diffusion discs for identification of carbapenem resistance mechanisms in a clinical laboratory. Presentation 1394 IDWeek. Philadelphia, USA, 2014.

2. Giske CG et al: A sensitive and specific phenotypic assay for detection of MBL and KPC in *K. pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with phenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 17, 552-556, 2011. 6 | 6
3. Ambrettii et al: Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of Class A and Class B carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Microbial Drug Res* 19,212-215, 2013.
4. Miriagou V et al: Combined disk methods for the detection of KPC and or VIM positive *K. pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect* E412-E415, 2013.
5. Giakkoupi P et al: Evaluation of the modified KPC+MBL Confirm kit for the phenotypic detection of Class A and B carbapenemases in *K. pneumoniae* isolates. Presented at the ECCMID 2012.
6. Pillai P et al: Triple disk assay for phenotypic detection of predominant carbapenemases. *Indian J Med Research* 138, 1025-1026, 2013.
7. Pantel A. et al: Evaluation of two phenotypic screening tests for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 53, 3359- 3362, 2015.
8. Willey BM et al: Comparison of ROSCO tablets and MAST disks for detecting Temocillin resistance as a marker for Class D and B carbapenemase-producing organisms. ICAAC 2015, September 17-21, Presentation D-184.
9. Dortet L et al: Prospective evaluation of an algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* oct 12, 2015 (ahead of print).
10. Hammerum AM et al: Use of WGS data for investigation of a long term NDM1 producing *Citrobacter freundii* outbreak and secondary in vivo spread of ndm-1 gene to *E. coli*, *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*. *J. Antimicrob Chemother* 71,3117-3124,2016.
11. Karatuna O et al: Evaluation of the performances of Mast and Rosco phenotypic carbapenemase detection kits for *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates carrying carbapenemase genes. Poster EV0433, ECCMID 2016.
12. Schwensen SA et al: Phenotypic detection of the *cfiA* MBL in *Bacteroides fragilis* with the meropenem-EDTA double-ended Etest and the ROSCO KPC/MBL Confirm kit. *J Antimicrob Chemother* 72, 437-440, 2017.

CND: W01040805

CE