

Total MBL Confirm kit

Solo per uso diagnostico in vitro

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.

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 cinque cartucce di tavolette contenenti: Meropenem 10µg (quantità diffusibile), Acido Dipicolinico (DPA), Imipenem 10 µg, Imipenem+DPA and Imipenem+EDTA. Le Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter spp. Produttori di Metallo beta-lattamasi (MBL), idrolizzano efficientemente i carbapenemi. Le MBL vengono inibite dall'Acido Diicolinico (DPA). Il DPA di per sé non ha attività antimicrobica al contrario dell'Acido Etilene diamino tetra acetico (EDTA), e i risultati sono facilmente interpretabili. L'utilizzo di due carbapenemici in combinazione con DPA permette l'identificazione di tutte le specie di MBL. Il test di sinergia tra DPA e Imipenem 1 µg o Meropenem 10 µg è particolarmente utile quando gli isolati NON mostrano alcuna zona di inibizione intorno ai due antibiotici. L'effetto della sinergia causato dall'DPA viene esaltato dall'uso del terreno **Mc Conkey agar** al posto del Mueller-Hinton. Quindi utilizzare **Mc Conkey agar**.

Contenuto e formulazione:

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

1. Meropenem 10 µg, cod. MRP10
2. Acido Dipicolinico (inibitore di MBL), cod. DPA
3. Imipenem 10 µg, cod. IMI10
4. Imipenem 10 µg + Acido Dipicolinico, cod. IM+DP
5. Imipenem 10 µg + EDTA, cod.IM10E

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 **Mc Conkey agar**. Iso-sensitest Agar non deve essere utilizzato (falsi negativi)
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.

NOTA: *la pastiglia di DPA va posta fra Imipenem 10µg e Meropenem 10 µg ad una distanza di circa 5 mm (tra i margini) se l'isolato non mostra zona di inibizione intorno ai due antibiotici. Se invece le zone intorno a Imipenem e/o Meropenem sono >15 mm, la pastiglia di DPA va posta ad una distanza di circa 10 mm da margine a margine.*

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).
6. Verificare se c'è o meno sinergismo tra DPA e Imipenem 10 µg e Meropenem 10 µg

Interpretazione dei risultati:

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

Confrontare la zona di inibizione intorno a Imipenem 10 µg con la zona di inibizione di Imipenem 10 µg +DPA e Imipenem 10 µg + EDTA. Se le differenze sono < a 3 mm, l'organismo non esprime attività MBL. Verificare se c'è sinergismo tra DPA e Imipenem 10 µg e/o Meropenem 10 µg.

Per Enterobacteriaceae:

Confrontare le zone di inibizione di Imipenem e Imipenem + DPA. Se la differenza tra le zone è ≥ 5 mm (IM+DP – IMI10), l'isolato esprime attività MBL.

Il sinergismo tra DPA e Imipenem 10 µg o Meropenem 10 µg indica che l'isolato è MBL positivo.

Per Pseudomonas aeruginosa/Acinetobacter spp.:

Confrontare le zone di inibizione di Imipenem e Imipenem + DPA. Se la differenza tra le zone è ≥ 5 mm (IM+DP – IMI10), l'isolato esprime attività MBL.

Confrontare con la zona di inibizione della combinazione con EDTA. Se la differenza è ≥ 8 mm l'isolato è MBL positivo.

Per Acinetobacter and oxacillinasi:

Le oxacillinasi sono influenzate dall'EDTA e determinano un debole sinergismo tra Imipenem e EDTA mentre il DPA non ha alcun effetto. Questo può servire a individuare le oxacillinasi in Acinetobacter (vedi tabella 3)

Utilizzare le tabelle 1,2 e 3 per aiutarsi l'interpretazione delle piastre.

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-2146, MBL positiva
- Klebs. pneumoniae NCTC 13438, MBL positiva

Tabella 1: Enterobacteriaceae

		DPA	Imipenem + DPA IM+DP	Imipenem+EDTA IM10E
MBL	Meropenem 10 µg MRP10	Sinergismo	---	---
MBL	Imipenem 10 µg IMI10	Sinergismo	≥5mm	≥10mm

Tabella 2: Pseudomonas aeruginosa. Mc Conkey agar Acinetobacter spp. Mc Conkey agar

		DPA	Imipenem + DPA IM+DP	Imipenem+EDTA IM10E
MBL	Imipenem 10 µg IMI10	Sinergismo	≥5mm oppure	≥10mm
MBL	Meropenem 10 µg MRP10	Sinergismo	---	---

Tabella 3: Acinetobacter e Oxacillinasi

		Imipenem + DPA IM+DP	Imipenem+EDTA IM10E
Oxacillinasi	Imipenem 10 µg IMI10	≤ 3mm e	4-7 mm

NON MBL: tutte le aree di inibizione entro i 3 mm di differenza l'una dall'altra.

Bibliografia

Dongeon Yong et al: Evaluation of double disk potentiation and disk potentiation tests using Dipicolinic acid for detection of MBL – producing Pseudomonas spp and Acinetobacter spp. J. Clin. Microbiol. 50, 3227-3232, 2012.

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:

2398016

Total MBL Confirm kit

50 test

CND: W01040805