

## Conferma di KPC, MBL in *P. aeruginosa*/Acinetobacter Kit per identificazione delle Beta-Lattamasi

**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 e MBL in *Pseudomonas Aeruginosa* e di MBL in *Acinetobacter* spp.

**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 10 µg di Meropenem e 10 µg di Imipenem (quantità diffusibile) da soli 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).

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

**1. L'organismo produce una Metallo-beta-lattamasi che inibisce efficacemente i carbapenemi.**

Le MBL sono inibite dall'Acido Dipicolinico. La tavoletta di Acido Dipicolinico viene posizionata fra le tavolette di Meropenem 10 µg e di Imipenem 10 µg. La sinergia (zona fantasma) fra Imipenem e/o Meropenem e DPA indica la presenza di una MBL.

**2. La sinergia (zona fantasma) fra Imipenem e/o Meropenem e DPA è particolarmente utile quando gli isolati non mostrano alcuna zona di inibizione intorno a Meropenem 10 µg e/o Imipenem 10 µg**

**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 combinazione con Cloxacillina ad alta concentrazione per distinguere tra le due resistenze. Quindi 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 Il rendimento del test di sinergia con l'Acido Dipicolinico** viene migliorata dall'uso delle piastre con terreno Mc Conkey Agar invece di Mueller-Hinton.

### Contenuto e formulazione:

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

1. Meropenem 10 µg, cod. MRP10
2. Meropenem 10 µg + Acido Fenilboronico (inibitore di KPC e AmpC), cod.MRPBO
3. Meropenem 10 µg + Cloxacillina alta conc.(inibitore di AmpC), cod. MPCXH
4. Imipenem 10 µg cod. IMI10
5. Acido Dipicolinico (DPA)

**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 inoculata, 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 della zona 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/o Meropenem 10 µg

**Interpretazione dei risultati:**

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

1. Misurare la zona di inibizione attorno a Meropenem 10 µg (MRP10) e confrontarla con le zone intorno alle due tavolette di Meropenem + Cloxacillina (MPCXH) e Meropenem + Acido Fenilboronico (MRPBO). Se la zona attorno a MRPBO è ≥ 4mm e la zona attorno a MPCXH è < 3 mm rispetto alla tavoletta singola, l'organismo dimostra attività KPC. *E/o* Confrontare le zone di inibizione delle tavolette con le due combinazioni MRPBO e MPCXH: se la zona attorno a MRPBO è ≥ 4mm rispetto alla zona attorno a MPCXH, l'isolato è KPC positivo.
2. Testare solo gli isolati Cefotaxime resistenti, gli isolati Cefotaxime sensibili possono dare falsa positività per MBL.

3. Controllare se c'è sinergismo tra DPA e Imipenem 10 µg e/o Meropenem 10 µg.

**NOTA:** la differenza tra la zona di inibizione intorno a Meropenem 10 mg+ Cloxacillina ad alta concentrazione e la zona di inibizione intorno a Meropenem 10 mg può essere utilizzata per lo screening di **P.aeruginosa produttrice di carbapenemasi**. Se la zona attorno alla combinazione è  $\geq$  di 5 mm rispetto alla zona intorno al Meropenem da solo, la colonia NON produce carbapenemasi

4. Usare le tavole 1 e 2 per aiutarsi nell'interpretazione.

#### 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:

- *P. aeruginosa* ATTC 10145/CCUG 59626, MBL positiva
- *K. pneumonia* CCUG 58547, MBL positiva
- *K. pneumoniae* NCTC 13439, MBL positiva
- *K. pneumonia* CCUG 56233, KPC positiva
- *K. pneumoniae* NCTC 13438, KPC positiva

	Mc Conkey agar		Meropenem +Acido Fenilboronico.MRPBO	Meropenem+Cloxacillina Alta conc. MPCXH	DPA
NO carbapenemasi	P.aeruginosa	Meropenem 10 ug MRP10	---	$\geq$ 5 mm	
KPC	P.aeruginosa	Meropenem 10 ug MRP10	$\geq$ 4 mm	< 3 mm	
		Meropenem+Cloxacillina Alta conc. MPCXH	$\geq$ 4 mm		
MBL	P.aeruginosa	Imipenem 10 ug IMI10	---	---	sinergismo
	Acinetobacter		---	---	sinergismo

**NON AmpC, KPC né MBL** se le differenze fra tutte le zone di inibizione sono entro i 2 mm.

Non essendoci fino ad ora abbastanza esperienza nella rilevazione di KPC in *Acinetobacter* spp, non è chiaro se questo kit sia in grado di identificarlo.

**Bibliografia:**

1. Dongeun 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.
2. Fournier D et al: A convenient method to screen for carbapenemase – producing *P. aeruginosa*. J. Clin Microbiol. **51**, 3846-3848, 2013.

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](mailto:info@rosco.dk), Fax +45 43 52 73 74, oppure essere consultate e/o stampate dal sito [www.rosco.dk](http://www.rosco.dk).

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

**Confezione**

**2398020 KPC/ MBL in P.aeruginosa/Acinetobacter Confirm kit 50 test**

**CND:** W01040805

