

Neo-Rapid CARB Kit

Kit per la rilevazione di meccanismi di resistenza

2398024

Solo per uso diagnostico in vitro

Revisione: DBV0040M del 13/02/2017

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

Distributore: Biolife Italiana

Impiego Previsto:

Le compresse sono utilizzate per lo screening in vitro di batteri produttori di carbapenemasi. Il metodo è applicabile alle *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.*

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

Principio del test:

I batteri potenzialmente produttori di Carbapenemasi vengono solitamente valutati per mezzo dei test di sensibilità ai Carbapenem (Imipenem, Meropenem and Ertapenem). Una riduzione della zona di inibizione intorno a questi carbapenem indica la probabile produzione di Carbapenemasi. Un metodo rapido è costituito dalla identificazione dell'idrolisi dell'anello beta-lattamico di un carbapenemico in presenza di un indicatore. Utilizzando questo principio, ROSCO Diagnostica ha messo a punto un nuovo Diatab: Imipenem (x2) + Indicatore (CARB). Il test si esegue rapidamente e la lettura del risultato è possibile già tra 15 minuti e un' ora dopo l'inizio della reazione.

L'utilizzo di questo kit nello screening di routine delle Carbapenemasi consente di risparmiare tempo e fatica.

L'aumentato contenuto di imipenem nel kit Neo-Rapid CARB determina lo sviluppo di un colore deciso rendendo più evidente l'identificazione dei campioni positivi e aumentando così la sensibilità del metodo.

La stabilità dell'Imipenem nel Rosco Diatabs (3 anni), è molto più estesa di quella della soluzione di Imipenem (2-4 giorni) dei prodotti concorrenti (es. CARBA-NP).

Istruzioni dettagliate:

Le istruzioni dettagliate per l'uso delle DIATABS "Instruction for Use of DIATABS" dovrebbero essere presenti in ogni laboratorio che lavori con i prodotti Rosco.

L'ultima edizione delle Istruzioni può essere consultata o stampata dal sito di Rosco: www.roesco.dk

Ulteriori informazioni s' possono trovare nella "ROSCO's User's Guide for detection of Resistance Mechanisms" in lingua inglese.

Le guide possono essere richieste ai distributori locali o direttamente a ROSCO.

E-mail: info@roesco.dk

Telefono: +45 43 99 33 77

Contenuto e formulazione:

- Due flaconi contenenti ciascuno 25 tavolette da 6 mm di: Imipenem (x2) + Indicatore (CARB) per un totale di 50 test.
- Un flacone contenente 50 tavolette da 6 mm di: Controllo Negativo CARB

Conservazione/Utilizzazione:

Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Le cartucce devono restare chiuse quando conservate. Chiudere sempre le cartucce con il coperchio verde originale e non posizionare mai il dispensatore in frigorifero. Lasciare i flaconi a temperatura ambiente per 30-60 minuti prima di aprire il coperchio.

Le cartucce possono essere aperte e richiuso più volte durante l'uso, senza che ciò influisca sulla durata di conservazione. La lunga durata è dovuta all'uso di sostanze cristallizzate.

Precauzioni:

Solamente per uso diagnostico *in vitro*. Adottare precauzioni di sicurezza e utilizzare tecniche asettiche quando si lavora con materiale a potenziale rischio biologico. Da utilizzarsi solamente da personale professionale e opportunamente addestrato. Sterilizzare tutti i rifiuti dopo l'utilizzo e prima di eliminarli. Fare riferimento alla Scheda di Sicurezza del Prodotto.

Materiali richiesti, ma non forniti:

Reagente di Estrazione per le Proteine Batteriche: Lysis Buffer B-PER II (Sol. di Triton X-100 al 10% in TRIS-HCl).

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

Procedura:

- Utilizzare sempre colture pure e fresche. In alternativa inoculare /Incubare 2 volte prima del test.
- Le colonie devono essere prelevate dai seguenti terreni: Columbia Blood Agar, TSA agar o Mueller-Hinton Agar marca BD. Altre marche di agar MH devono essere integrate con ZnSO₄ a una concentrazione finale di 70 mg / litro.
Gli ioni di zinco nell'agar MH sono assolutamente necessari per la rilevazione di metallo-beta-lattamasi VIM e NDM. Alcuni agar MH, come quelli di Biomerieux, non contengono abbastanza ioni di zinco e danno risultati falsi negativi.
NON usare colonie provenienti da terreni selettivi (Drigalski, Mc Conkey).

Willey et al (9) hanno scoperto che l'uso di 200 µl di NaCl 0,9% da solo (senza tampone di lis) a pH 8,5 aggiustato con NaOH 0,01 N ha dato risultati migliori rispetto alla miscela di soluzione salina e tampone di lis e sicuramente molto meglio del nuovo Rapidec Carba NP.

Pasteran et al (16) hanno scoperto che l'uso di Triton X-100 allo 0,1% invece del tampone di lisi, ha fornito una migliore rilevazione dei produttori di carbapenemasi direttamente da colture batteriche. Questa procedura sarà efficace anche nel rilevamento di oxacillinas in *Acinetobacter*. Nel caso di *Acinetobacter*, utilizzare 2 ansate da 10 µL di batteri.

Utilizzare il protocollo 1 o il protocollo 2.

Protocollo 1:

Aggiungere una ansata da 10 uL dell'organismo da testare (prelevata dall'antibiogramma) a 200 uL di NaCl allo 0.9% aggiustato a pH 8.5 con NaOH 0,01N. Diluire 2 mL di soluzione di TritonX-100 al 10% in 10 mL di acqua e aggiungere 10 uL di questa soluzione alla sospensione batterica.

Protocollo 2:

Aggiungere una ansata da 10 uL dell'organismo da testare a una miscela di 150 uL di NaCl allo 0.9% + 50 uL di Tampone di Lisi TRIS-HCl (B-PER II). Non occorre regolare il pH.

Agitare la sospensione per 1 minuto e mantenere a T ambiente per 30 minuti.

Aggiungere una pastiglia di Imipenem (x2) + Indicatore (CARB) e chiudere la provetta. Agitare dolcemente per fare in modo che la pastiglia si adagi sul fondo del tubo.

Incubare a 35/37 °C per 15 minuti, 30 minuti e 1 ora rispettivamente.

Ripetere lo stesso processo con la pastiglia di Controllo Negativo CARB

Emocolture:

Protocollo 1:

Trasferire 0,5 ml di emocultura positiva in 2 provette e aggiungere 50 µL di soluzione Triton X-100 al 10% in ciascuna provetta, agitare su Vortex e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare a 13.000xg per 2 minuti ed eliminare il surnatante. Risospingere il pellet batterico in 500 µL di acqua distillata (le colonie batteriche devono essere adeguatamente risospese). Centrifugare a 13.000 x g per 2 minuti ed eliminare il surnatante. Risospingere il pellet batterico in 200 µL di NaCl 0,9 a pH 8,5 oppure in 150 µL di NaCl 0,9% +50 µL di tampone di lisi TRIS-HCl.

Ad una delle provette aggiungere la compressa di Imipenem(x2)+indicatore (CARB) e all'altra provetta aggiungere il CARB Negative Control Diatabs. Agitare dolcemente per fare in modo che la pastiglia si adagi sul fondo del tubo e incubare per 15 minuti, 30 minuti o 1 ora a 37 gradi Celsius.

Fernandez et al (19) hanno prelevato 8 gocce ($\pm 200 \mu\text{L}$) dai flaconi di emocultura positive, hanno inoculato 2 piastre MH e incubato a 37 gradi in atmosfera di CO₂ per 4 ore. Il test Carba NP è stato eseguito su tutte le Enterobacteriacee, utilizzando quanto più inoculo possibile dalle 2 piastre di agar MH. Questa procedura rapida può essere utilizzata con il kit 98024.

Urine:

Prelevare 10 mL di urine positive per bacilli Gram negativi e centrifugare. Sospingere il pellet batterico in una miscela di 200 µL di soluzione NaCl allo 0,9% a pH 8,5 e seguire la procedura indicata.

Interpretazione dei risultati:

Un cambiamento di colore dal rosso al giallo indica una reazione positiva, indicando che il ceppo in esame possiede una carbapenemasi. Se la reazione è positiva dopo 15 minuti o 30 minuti, il test è terminato (non è necessario incubare ulteriormente), perché le reazioni positive potrebbero svanire. La positività entro 15 minuti indica alti livelli di espressione del gene della carbapenemasi. In alcuni casi, dopo l'incubazione si ottiene un colore arancio giallastro o giallo chiaro. Anche questo è un risultato positivo se il controllo negativo rimane rosso. I positivi sono quei test che mostrano un cambiamento di colore (in giallastro) rispetto al controllo negativo durante il periodo di incubazione (max 1 ora). Se il controllo negativo CARB mostra un colore giallo chiaro, riportare il risultato come non interpretabile, indipendentemente dal risultato di Imipenem(x2)+Indicatore(CARB).

Se i risultati sono difficili da interpretare (13) utilizzare le seguenti modifiche:

1) tenere la provetta in orientamento verticale sopra il livello degli occhi e ispezionare il fondo della compressa per individuare il colore giallo (positivo) e 2) confrontare le provette del test e quelle del controllo negativo osservandoli fianco a fianco, inclinati delicatamente in posizione orizzontale ed esaminati in piena luce sopra uno sfondo bianco. Se il risultato rimane poco chiaro, ripetere il test con un inoculo più pesante. AbdelGhani et al (13) in uno studio comparativo con Carba NP, hanno scoperto che il kit Neo-Rapid CARB (98024) mostrava una specificità del 100% e una sensibilità del 99%. Huber et al in Australia (17) hanno riscontrato una sensibilità del 98% e una specificità del 95-100% con il kit Neo-Rapid CARB (98024).

Bou Casals J (15) critica lo studio comparativo di Doret et al sui test colorimetrici rapidi. Doret et al hanno trasferito un brevetto per NP Carba a Bio-Merieux. Doret e colleghi hanno utilizzato un kit obsoleto (98021) nel loro studio, mentre il kit 98024: kit Neo-Rapid CARB ha sostituito il kit 98021 più di 6 mesi fa. Bou Casals riferisce che il kit 98024 contiene il doppio di imipenem del 98021 e utilizza molto meno tamponi di lisi rispetto al suo predecessore e ha una durata di conservazione di oltre 2 anni. Paulussen(18) in uno studio comparativo del kit Neo-Rapid CARB rispetto a Rapidec CARBA NP e altri, ha riscontrato una sensibilità del 98% e una specificità del 100%, mentre il Rapidec ha mostrato una specificità dell'84,2%.

Nota: Sospettare la produzione di OXA-48, quando l'isolato presenta un livello elevato di resistenza alla temocillina (Temocillina 30 µg Neo-Sensitabs, zona < 12 mm). Alcune beta-lattamasi OXA-48-like non sono vere carbapenemasi (OXA-136, OXA-405) e mostreranno un risultato negativo con il test. Possono essere differenziate dalle vere carbapenemasi perché mostrano sensibilità alla temocillina (zona > 12 mm), mentre le carbapenemasi OXA-48-like sono resistenti alla temocillina.

Controllo di Qualità:

DIATABS	Positivo	Negativo
Imipenem (x2) + Indicator (CARB)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BAA 1705	<i>E. coli</i> ATCC 25922

Referenze:

- Nordmann P et al. Rapid detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1503-1507, 2012.
- Nordmann P et al. Rapid detection of carbapenemase production in *Pseudomonas*. Presentation CI-078, ICAAC, 2012.
- Tijet N et al :" Evaluation of the Carba NP Test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Ps aeruginosa*." *Antimicr Ag. Chemother* **57**,4578-4580,2013
- Williams A. et al : Direct detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp from positive blood cultures.BSAC Spring Meeting 20-03-2014.
- Doret L et al : Impact of isolation medium for detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test.J. Med Microbiol **63**,772-776,2014.

La User's Guide in lingua inglese può essere richiesta ai nostri uffici o direttamente a ROSCO Diagnostica A/S: E-mail: info@rosco.dk, o consultata e/o stampata dal sito www.rosco.dk. Qui si possono trovare anche ulteriori informazioni nella "ROSCO's User's Guide for Detection of Resistance Mechanisms" in lingua inglese.

Confezione

2398024 Neo-Rapid CARB Screen Kit 50 test