

RAPID POLYMYXIN NP

Bestimmung der Sensibilität und Resistenz
von Enterobakterien gegenüber Polymyxinen
10 Tests (REF 23000)

Ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik, nur für die professionelle Verwendung

CPB 0405_DE-2016-12



1 - VERWENDUNGSZWECK

Der Rapid Polymyxin NP test ermöglicht die Bestimmung der Sensibilität und der Resistenz von Enterobakterien gegenüber Polymyxinen (Polymyxin E oder Colistin und Polymyxin B) aus einer Bakterienkultur auf Agarplatten.

2 - EINFÜHRUNG

Die Entwicklung von gegen mehrere Antibiotikagruppen multiresistenten Bakterien (sogenannte multiresistente Bakterien oder Erreger, MRE) sind eine große Herausforderung für das öffentliche Gesundheitswesen, verringern in dramatischem Ausmaß die therapeutischen Behandlungsoptionen und steigern die Mortalitätsrate in den Intensivstationen. Unter den MRE stellen die Enterobakterien (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* und andere Arten) die bedeutendste Infektionsquelle für MRE mit gramnegativen Bazillen dar. Sie sind für die Mehrheit der ambulant erworbenen Infektionen (des Harntrakts, der Lunge, intraabdominale Infektionen und Blutstrominfektionen) und der nosokomialen Infektionen verantwortlich. Zudem wird weltweit zunehmend von ihren erworbenen Resistenzen gegenüber β -Lactam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine, Monobactame) und dem erweiterten Spektrum der Aminoglykoside und Chinolone berichtet.

Die Entwicklung der MRE-Bakterien hat das Interesse an einer alten Antibiotikagruppe neu geweckt, den Polymyxinen (Polymyxin E oder Colistin und Polymyxin B), die im Allgemeinen als letzter Ausweg zur Behandlung multiresistenter Keime gelten. Der zunehmende Einsatz von Colistin führt jedoch heute zum Entstehen und zur Vermehrung neuer multiresistenter Enterobakterienstämme, die gegen Colistin und Carbapeneme resistent sind und stellt eine neue Bedrohung für den Fortbestand eines wirksamen therapeutischen Arsenal dar. Die Kontrolle therapeutischer Sackgassen und die Beherrschung der Infektionsrisiken im klinischen Kontext bedürfen also einer schnellen Evaluierung der Sensibilitäts- und Resistenzprofile der gegen Colistin resistenten Bakterienstämme.

Die zurzeit verfügbaren Methoden für diese Sensibilitäts- oder Resistenzbestimmung gegenüber Colistin sind noch nicht für den klinischen und Krankenhausbedarf geeignet. Sie werden als langwierig, langsam (24 Stunden, MHK-Bestimmung im flüssigen Milieu) oder wenig zuverlässig bewertet, wie im Fall der Agardiffusions-Methoden. Der Rapid Polymyxin NP Test ermöglicht die hochsensible und spezifische Bestimmung der Resistenz von Enterobakterien gegenüber Colistin in weniger als 3 Stunden. Der Test braucht wenig Zeit, ist einfach durchzuführen, problemlos abzulesen und für alle Analyselabore geeignet. Die Detektionsmethode des Tests ermittelt die gesamten phänotypischen Resistenzen im Flüssigmedium, Dies erlaubt die sofortige Anwendung einer geeigneten Antibiotikatherapie und die Identifizierung von Patienten, die Träger von colistinresistenten Stämmen sind, um so das Risiko einer epidemischen Ausbreitung zu begrenzen.

3 - TESTPRINZIP

Der Rapid Polymyxin NP Test stützt sich auf das von Nordmann, Jayol und Poirel (1-2) beschriebene Verfahren. Diese im flüssigen Medium angewendete Methode stützt sich auf den

kolorimetrischen Schnellnachweis des mit dem Bakterienwachstum zusammenhängenden Glukosemetabolismus, bei Vorhandensein einer bestimmten Colistinkonzentration.

Die durch dieses Wachstum bedingte Ansäuerung des Kulturmilieus wird durch den Farbumschlag des pH-Indikators von Orange (Phenolrot) zu Gelb optisch dargestellt.

4 – REAGENZIEN

Beschreibung	Menge
RP NaCl : Fläschchen mit 3 ml Flüssigmedium mit 0.85 g/L NaCl für die Vorbereitung des Inokulums	12
RP Medium : Fläschchen mit 1,5 mL Kulturmedium für Enterobakterien, auf der Basis von Mueller-Hinton-Bouillon (25 g/L) kationen-adjustiert, Glukose in 10g/L, Phenolrot (50 mg/L) als pH-Indikator	10
RP Colistin Testtablett : Tablett mit einer negativen Kontrollvertiefung C-, eine Testvertiefung mit Colistin in der Konzentration 2 μ g/mL und eine Kontrollvertiefung für Bakterienwachstum C+. Testtablett verpackt in Aluminiumbeutel mit Trockenmittel.	10
RP TC (Turbidity Control) Trübungskontrolle Fläschchen mit 3 mL Bariumsulfatlösung zur Trübungskontrolle	1
Verschlussystem : Schutzdeckel des angeimpften Testtablets aus transparentem Plastik	10

5 - VORSICHTSMASSNAHMEN BEIM GEBRAUCH

Die Reagenzien dieser Box sind ausschließlich für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt und dürfen nur von entsprechend qualifizierten Personen gehandhabt werden.

Von den Probenentnahmen, den Bakterienkulturen und den angeimpften Reagenzien geht eine potenzielle Infektionsgefahr aus. Sie müssen mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen und unter Einhaltung der im entsprechenden Land geltenden Hygienevorschriften und Regelungen für diese Art von Produkten gehandhabt werden.

Der Gebrauch einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank wird empfohlen.

Die Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Die Reagenzien sind bei einer Temperatur zwischen +2 und +8°C zu lagern.

Beschädigte oder vor dem Gebrauch nicht ordnungsgemäß gelagerte Reagenzien nicht mehr verwenden.

Fläschchen mit RP Medium, die Anzeichen von Flüssigkeitsaustritten aufweisen, nicht mehr verwenden.

Die mit dem Rapid Polymyxin NP Test gewonnenen Ergebnisse geben Aufschluss über die Sensibilität oder die Resistenz der in der Probenentnahme vorhandenen Enterobakterienstämme gegenüber **Colistin, sie dürfen jedoch keinesfalls allein für die klinische Diagnostik herangezogen werden.** Diese muss vom Arzt entsprechend den biologischen Ergebnissen und den klinischen Symptomen durchgeführt werden.

6 - ENTNAHME DER PROBEN

Die zu testenden Mikroorganismen sollten vorzugsweise auf nicht-sauren Kulturmedien des Typs Luria Bertani, Mueller-Hinton-Agar, Columbia-Agar mit 5% Schafblut, Chocolat-Agar mit PolyViteX, Eosin-Methylen-Blau-Agar oder chromogenem Agar isoliert werden. Medien des Typs Drigalski-Agar sind von dieser Liste ausgeschlossen. Der Test muss mit vor kurzem gewonnenen Kolonien (15 bis 24 Stunden Inkubationszeit) durchgeführt werden.

7 - VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER REAGENZIEN

Alle gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig. Das Kit und die Reagenzien sind in ihrer Originalverpackung bei einer Aufbewahrung bei +2 +8°C bis zu dem auf der Box angegebenen Verfallsdatum stabil. Die Reagenzien RP Medium und RP NaCl sind für den Einmalgebrauch bestimmt.

Das RP TC Reagenz dient als Referenz zur Kalibrierung der Inokula aus den isolierten Kolonien für alle Tests des Kits. Es sollte bis zum Gebrauch des letzten Reagenz RP Medium des Kits aufbewahrt werden. Das RP TC Reagenz ist lichtgeschützt bei +2 und +8°C zu lagern.

8 - NICHT MITGELIEFERTER BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Behälter für kontaminierte Abfälle

Fakultativ: Densitometer

Pipette und Spitzen

Inkubator für +36°C/+2°C

9 - VORGEHENSWEISE

Der Phänotyp der GRAM-negativen Bakterien muss durch die Durchführung einer GRAM-Färbung überprüft werden.

Der Test darf ausschließlich mit als Enterobakterien identifizierten Kolonien durchgeführt werden, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* müssen hier ausgeschlossen werden.

Die Reagenzien für 10 Minuten auf Umgebungstemperatur bringen. Das RP Medium für 10 Minuten bei 37°C vorinkubieren.

Den Schutzfilm vom unteren Teil des Testtablets abziehen (Vertiefungen 1, 2 und 3).

Vorbereitung der Negativkontrolle:

In die Vertiefung C- Nr. 1 sind zu verteilen:

-75 μ L nicht angeimpftes RP Medium

-25 μ L nicht angeimpftes RP NaCl

Vorbereitung der Bakterien suspension in dem Fläschchen RP NaCl :

Drei bis vier identische isolierte Kolonien mit Hilfe einer Öse von 10 μ L oder einer verschlossenen Pasteurpipette anstechen.

Diese in ein Fläschchen RP NaCl geben und gut homogenisieren.

Die Herstellung eines standardisierten Inokulums kann auf zwei Arten erfolgen:

- Im Vergleich zum Fläschchen RP TC

Die Trübung des angeimpften Mediums an die der Trübungskontrolle RP TC anpassen, dabei die schwarzen Strichmarkierungen auf dem Etikett des Fläschchens benutzen.

Wenn das Medium klarer ist (ungenügendes Inokulum), das Fläschchen erneut animpfen, bis eine der Trübungskontrolle gleiche Trübung auftritt.

Wenn das Medium undurchsichtiger ist (zu starkes Inokulieren), mithilfe eines neuen Fläschchens RP NaCl verdünnen, bis die richtige Trübung erreicht ist.

Zu diesem Zweck sind in der Box 2 zusätzliche Fläschchen RP NaCl enthalten, die nach dem Gebrauch entsorgt werden müssen.

- Mithilfe eines Densitometers

Mit dem Densitometer überprüfen, ob die Trübung des angeimpften Mediums zwischen 3 und 3,5 Mac Farland (McF) liegt. Falls notwendig, die Trübung wie vorher beschrieben ausgleichen. Der niedrigste Densitometer-Wert, der durch das Drehen des Fläschchens im Gerät erzielt wird, muss dabei berücksichtigt werden.

Im Falle der Inkompatibilität des mitgelieferten RP NaCl Fläschchens mit dem Densitometer wird empfohlen:

den Inhalt in ein zmit dem Gerät kompatiblen Röhrchen umzufüllen, einen Wert von 0 McF zu erreichen, dann die Kolonien hinzuzufügen, bis der McF 3-3,5 erreicht hat.

Vorbereitung des Inokulums im RP Medium und Verteilung auf dem Testtablett:

-500 μ L angeimpftes RP NaCl in ein Fläschchen RP Medium geben.

-Gut homogenisieren und das angeimpfte RP Medium aufteilen:

-100 µL in die Vertiefung Test Nr. 2 geben (die das Colistin enthält)
 -100 µL in die Kontrollvertiefung Nr. 3 für Bakterienwachstum C+ geben (ohne Colistin)
 Das Testtablett mit dem Deckel des Verschlusssystems abdecken und diesen einrasten lassen.
 Das Testtablett mit den Referenzen der getesteten Probe kennzeichnen.
 Das Testtablett 2 bis 3 Stunden bei +36 +/- 2 °C bebrüten.
 Eine erste Beobachtung kann nach 2 Stunden Inkubationszeit erfolgen (siehe die Ablese- und Interpretationsbedingungen des Endergebnisses Abschnitt 10 - Ablesung und Auswertung).

10 - ABLESUNG UND AUSWERTUNG

Das Ablesen der Ergebnisse beruht auf der Identifizierung und dem Vergleich der Farbe der Test-Vertiefung Test mit den Kontrollvertiefungen C + und C-.

Negativkontrolle zur Ablesung (negative Kontrollvertiefung C-Nr.1):

Die negative Kontrollvertiefung Nr. 1 (C-) weist die ursprüngliche Farbe des Mediums (orange) auf. Die Bewertung der Farbänderung der Test-Vertiefung erfolgt durch den Vergleich mit dieser Kontrolle. Wenn die Vertiefung C- die Farbe Gelb anzeigt, ist sie ungültig. In diesem Fall das Ergebnis nicht auswerten und den Test wiederholen.

Validierung (positive Kontrollvertiefung C+ Nr. 3) :

Überprüfen, ob das Medium der Bakterienwachstumskontrollvertiefung (C+) in Gelb umgeschlagen ist.

Ablesen und Auswertung der Vertiefung Test Nr. 2:

Eine Farbänderung des ursprünglich orangen Mediums in gelb/orange oder gelb zeigt die Fähigkeit des Stamms, sich bei einer Colistinkonzentration von 2 µg /mL zu entwickeln.

Tritt hingegen keinerlei Farbänderung des Mediums ein, zeigt dies an, dass die Entwicklung des Bakterienstamms bei einer Colistinkonzentration von 2 µg /mL gehemmt ist.

Inokulum aus isolierten Kolonien

Eine erste Beobachtung nach 2 Stunden Bebrütung durchführen.

Wenn die positive Kontrollvertiefung C+ (Vertiefung Nr. 3, Kontrolle des Bakterienwachstums) einen Farbumschlag zu Gelb aufweist, die Vertiefung Test (Vertiefung Nr. 2) ablesen:

1/Wenn die Test-Vertiefung gelb ist (oder gelb/orange und von hellerer Farbe als die negative Kontrollvertiefung C- (Vertiefung Nr. 1), ist der Stamm gegen Colistin resistent

2/Wenn die Test-Vertiefung orange ist (orange Farbe in derselben Intensität wie die der Kontrollvertiefung C- Nr. 1), das Testtablett eine Stunde bebrüten und dann erneut ablesen. Das endgültige Ergebnis erscheint nach 3 Stunden Bebrütung.

Zurzeit ist für Enterobakterien keine kritische Konzentration gemäß des Referenzsystems des CLSI (3-4) verfügbar. Die Sensibilität und Resistenz der Stämme gegenüber Colistin werden gemäß den vom Referenzsystem EUCAST empfohlenen Auswertungskriterien eingestuft (5):

- ein Enterobakterienstamm mit einer MHK von ≤ 2 µg/mL gegenüber Colistin wird als sensibel eingestuft (das Bakterienwachstum wird gehemmt; orange Färbung des Mediums).
- ein Enterobakterienstamm mit einer MHK von >2 µg/mL gegenüber Colistin wird als resistent eingestuft (Bakterienwachstum wird nicht gehemmt; gelb/orange oder gelbe Färbung des Mediums).

11 - QUALITÄTSKONTROLLE

Eine Kontrolle des Tests kann mithilfe von Stammsammlungen durchgeführt werden:

- *Escherichia coli* ATCC 25922, gegenüber Colistin **sensibler** Stamm nach 2 Stunden Bebrütung (Vertiefung C- orange, **Test-Vertiefung orange**, Positivkontrolle gelb)
- *Proteus mirabilis* ATCC 25933, gegenüber Colistin **resistenter** Stamm nach 2 Stunden Bebrütung (Vertiefung C- orange, **Test-Vertiefung gelb**, Positivkontrolle gelb).

12 - FEHLERURSACHEN - BESONDERE FÄLLE

Die Animpfung der Vertiefungen muss 15 bis 60 Minuten nach der Herstellung der Bakteriensuspension in RP NaCl Lösung und der Trübungskontrolle (3-3,5 McFarland) erfolgen.
 Der Farbumschlag der Positivkontrolle des Testtablets vor dem Ablauf von 2 Stunden Bebrütungszeitdauer bedeutet nicht, dass die Ergebnisse der Vertiefungen schon auswertbar sind.
 Ein zu frühzeitiges Ablesen vor Ablauf der empfohlenen 2 Stunden Bebrütungszeitdauer kann zu einem fehlerhaften Ergebnis führen und damit zu einer falschen Sensibilität gegenüber Colistin bei einem resistenten Stamm.

Wenn die Positivkontrolle des Testtablets nicht den erwarteten Farbumschlag (gelb) zeigt, kann keine der Vertiefungen ausgewertet werden. Es muss ein neuer Test durchgeführt werden.
 Auch darf die Bebrütungszeitdauer für das Ablesen der endgültigen Ergebnisse keinesfalls überschritten werden: 3 Stunden für die mit einem Inokulum aus isolierten Kolonien durchgeführten Tests.

13 - GRENZEN DER METHODE

Bakterienkolonien, die auf angesäuerten Agarmedien, z.B. Drigalski, MacConkey oder bromocresol purple (BCP) Agarmedien, sind mit dem Rapid Polymyxin NP Test nicht kompatibel. Es ist unbedingt erforderlich, vorher eine Umpflanzung auf ein geeignetes Medium durchzuführen (siehe Abschnitt 6 - Sammlung der Proben)

14 - LEISTUNGSPARAMETER

Die Evaluierung der Leistungsparameter des Rapid Polymyxin NP Tests wurde in der Abteilung Zunehmende Antibiotikaresistenzen (INSERM, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Freiburg, Schweiz), im Vergleich zur Methode der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) im Flüssigmedium (Mikrodilution in kationen-adjustierter Mueller-Hinton-Bouillon wurde wie in der Leitlinie des Clinical Laboratory Standard Institute (3,4) beschrieben angewendet) als Referenzmethode durchgeführt.

Die Bakterien der Studie stammen aus verschiedenen klinischen Probenentnahmen internationaler Herkunft und verteilen sich auf die folgenden Arten:

Art	Getestete Anzahl	Art	Getestete Anzahl	Art	Getestete Anzahl
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	113	<i>Enterobacter absuriae</i>	2	<i>Proteus stuartii</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	40	<i>Morganella morganii</i>	2	<i>Proteus vulgaris</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	16	<i>Proteus mirabilis</i>	2	<i>Salmonella concord</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	8	<i>Proteus rettgeri</i>	2	<i>Salmonella isangi</i>	1
<i>Citrobacter koseri</i>	8	<i>Salmonella enterica</i>	2		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	<i>Serratia marcescens</i>	2		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	<i>Salmonella sp.</i>	2		

Aus den repräsentativsten Enterobakterienarten mit 78 gegenüber Colistin sensiblen Stämmen und 141 gegenüber Colistin resistenten Stämmen wurden 219 Enterobakterienstämme ausgewählt. Bei den resistenten Stämmen wurden verschiedene molekulare Resistenzmechanismen gegenüber Polymyxinen untersucht (auf Chromosomenebene, auf Plasmidebene, intrinsisch oder unbestimmt). Die MHK der Stämme gegenüber Colistin und ihr Resistenzmechanismus sind folgendermaßen verteilt:

MHK (µg/mL)	0,125	0,25	0,5	<1	1	2	4	8	16	>16	32	64	128	>128
Anzahl der Stämme	9	1	1	60	3	4	8	18	19	10	21	33	20	12

Resistenzmechanismen			Anzahl der Stämme
Intrinsische Resistenz (natürlich)			10
Erworben e Resistenz	auf Chromosomenebene	Heteroresistenz	2
		Mutation Gen MgrB	70
		Mutation Gen PhoP oder Q	2
		Mutation Gen PmrA oder B	10
	auf Plasmidebene	Mutation Gen mcr -1	30
Unbekannte Mechanismen			17

Die Bakterienstämme wurden erneut für 18 - 24 Stunden auf Agarmedium (Luria Bertani, Mueller Hinton, Columbia 5 % Blut) isoliert, um Rapid Polymyxin NP parallel zu der Bestimmung der MHK mit dem Verfahren der Mikrodilution des CLSI zu testen.

Der Rapid Polymyxin NP Test wurde nach 2 und nach 3 Stunden Bebrütungszeitdauer ausgewertet.

Der klinische Konkordanzprozentsatz des Rapid Polymyxin NP Tests beträgt 97,7% im Vergleich zur MHK-Methode im Flüssigmedium. Die Sensibilität des Tests liegt bei 99,3% und die Spezifität beträgt 94,9%.

Es werden 4 gravierende Abweichungen (MHK zwischen 1 und 2 µg/mL) und eine sehr gravierende Abweichung festgestellt (beim Stamm *Klebsiella pneumoniae* mit MHK 8 µg/mL, dessen Resistenzmechanismus nicht bekannt ist).

Der klinische Konkordanzprozentsatz, nahe einer Verdünnung, liegt bei 99,1 %. Er bleibt bei 1 DM und 1DTM.

Alle Stämme wiesen nach 2 Stunden Bebrütung ein auswertbares Testergebnis auf. Zudem war das Profil der sensiblen Stämme auch nach 3 Stunden Bebrütung stabil.

15 - ENTSORGUNG DER ABFÄLLE

Die Abfälle müssen unter Einhaltung der im entsprechenden Land geltenden Hygienevorschriften und Gesetzgebung für diese Art von Reagenzien entsorgt werden.

16 - REFERENZEN

- 1 - Nordmann P, Jayol A, Poirel L. 2016. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 22:1038-1043
- 2 - Nordmann P, Jayol A, Poirel LI, EP15305409.3: «Test for determining susceptibility to resistance to polymyxins in Enterobacteriaceae», 20th March 2015
- 3 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 9th ed. Document M07–A9. Wayne (PA): The Institute; January 2012.
- 4 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. Document M100–S24. Wayne (PA): The Institute; 2014.
- 5 - Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2015. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, V.1.0 janvier 2015.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19, allée d'Athènes

83870 SIGNES - FRANKREICH

Tel. : 33 (0)4 94 88 55 00

Fax : 33 (0)4 94 32 82 61

<http://www.elitechgroup.com>

