

## RAPID POLYMYXIN NP

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

Ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik, nur für die professionelle Verwendung  
CPB 0405\_DE\_2018-02



### I - VERWENDUNGSZWECK

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

### 2 - EINFÜHRUNG

Die Entwicklung von Bakterien, die gegen mehrere Antibiotikagruppen resistent sind (sogenannte multiresistente Bakterien oder Erreger, MRE), ist durch die dramatische Verringerung der therapeutischen Behandlungsoptionen und einem Anstieg der Mortalitätsrate in den Intensivstationen für das öffentliche Gesundheitswesen eine große Herausforderung. Unter den MRE sind die Enterobakterien (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* und andere Arten) die Haupterreger. Sie sind für die meisten der ambulant erworbenen Infektionen (des Harntrakts, der Lunge, intraabdominelle Infektionen und Blutstrominfektionen) und der nosokomialen Infektionen verantwortlich. Außerdem gibt es weltweit vermehrt Berichte, die Fälle von erworbenen Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Penizilline, Cephalosporine, Monobactame) und dem erweiterten Spektrum der Carbapeneme, Aminoglykoside und Chinolone beschreiben.

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 Erreger gelten.

Der zunehmende Einsatz von Colistin führt jedoch heute zur Entstehung und Vermehrung neuer multiresistenter Enterobakterienstämme, die gegen Colistin und Carbapeneme resistent sind und stellt eine neue Bedrohung für den Fortbestand eines wirksamen therapeutischen Arsenal dar. Daher bedarf es einer Untersuchung der Fälle, so dass Behandlungsschwierigkeiten nachgewiesen werden und Infektionsrisiken in einem klinischen Umfeld benötigen eine schnelle 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 ist schnell, 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 Träger colistinresistenten Stämmen, 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 (1-2-3) 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 - REAGENZIEREN

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 µg/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
Verschlusssystem: 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 sollte von kürzlich erhaltenen Kolonien durchgeführt werden (15 bis 24 Stunden Inkubation). Enterobakterien aus Blutproben können direkt aus monomikrobiellen Blutkulturen getestet werden, die unter aeroben oder anaeroben Bedingungen inkubiert wurden.

### 7 - VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER REAGENZIEREN

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.

Wenn das RP TC-Reagenz zur Kalibrierung von Inokula aus isolierten Kolonien verwendet wird, muss es so lange gelagert werden, bis das letzte Reagenz RP Medium des Kits verwendet wird.

Das RP TC Reagenz ist lichtgeschützt bei +2 +8°C zu lagern.

### 8 - NICHT MITGELIEFERTE BENÖTIGTE REAGENZIEREN UND MATERIALIEN

Behälter für kontaminierte Abfälle

Densitometer

Pipette und Spitzen

Inkubator für +36°C/+/-2°C

### 9 - VORGEHENSWEISE

#### 9.1 - TEST VON ISOLIERTEN KOLONIEN AUF GELOSE

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 µL nicht angeimpftes RP Medium

-25 µL 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 µl oder einer verschlossenen Pasteurpipette anstechen.

Diese in ein Fläschchen RP NaCl geben und gut homogenisieren.

• **Standardisierung des Inokulums :**

Es wird empfohlen, das Inokulum mit einem Densitometer zu standardisieren. Eine RP-TC-Fläschchen wird jedoch unter den Bedingungen guter Gebrauchspraktiken zur Verfügung gestellt (siehe Absatz Fläschchen RP TC).

- **Mithilfe eines Densitometers**

Mit dem Densitometer überprüfen, ob die Trübung des angeimpften Mediums zwischen 3 und 3,5 McFarland (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.

Wenn der McF weniger als 3 beträgt (ungenügendes Inokulum), das

Fläschchen erneut animpfen, bis ein McF zwischen 3 und 3,5 erreicht ist. Wenn der McF höher als 3,5 liegt (Inokulum zu dicht), mit einem neuen RP NaCl-Fläschchen verdünnen, bis die Trübung korrekt ist. Zu diesem Zweck sind 2 zusätzliche RP-NaCl-Flaschen in der Box enthalten, die nach Gebrauch entsorgt werden müssen.

Im Falle der Inkompatibilität des mitgelieferten RP NaCl Fläschchens mit dem Densitometer wird empfohlen:- den Inhalt in ein mit dem Gerät kompatiblen Röhrchen umzufüllen,einen Wert von 0 McF zu erreichen, - einen Wert von 0 McF zu erreichen, - dann die Kolonien hinzuzufügen, bis der McF 3-3,5 erreicht hat  
**- Im Vergleich zum Fläschchen RP TC**

Dieses visuelle Ableseverfahren kann subjektiv sein und erfordert eine gute Laborpraxis, um das zuverlässige Erreichen eines 3-3,5 McF in dem inokulierten RP NaCl-Fläschchen sicherzustellen.

Um zu gewährleisten, dass die erwartete optische Dichte des inokulierten RP-NaCl-Fläschchens im Vergleich zu der Trübung des gelieferten RP-TC erhalten wird, ist es notwendig, das Verfahren zur Erzeugung der Trübung des Inokulums zu validieren.

#### Methodik

Die Trübung des angeimpften Mediums an die der Trübungskontrolle RP TC anpassen, dabei die schwarzen Strichmarkierungen auf dem Etikett des Fläschchens benutzen. Falls erforderlich, um die Störung zu korrigieren, wie zuvor beschrieben vorgehen.

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

-500 µL 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 Ables- und Interpretationsbedingungen des Endergebnisses Abschnitt 10 - Ablesung und Auswertung).

#### 9.2 - TEST VON POSITIVER HEMOCULTURE BROTH

Der Test darf nur auf der Grundlage einer positiven monomikrobiellen Blutkultur durchgeführt werden, die ein Enterobakterium (davon ausgenommen sind insbesondere *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*) enthält, die durch MALDI TOF identifiziert wurden.

Bringen Sie die Reagenzien für 10 Minuten auf Raumtemperatur (+18 + 25 ° C). Inkubiere das RP-Medium für 10 Minuten bei 37 ° C vor.

Entfernen Sie den Klebstoff, der den unteren Teil der Galerie bedeckt (Wells 1,2 und 3).

#### Vorbereitung der negativen Kontrolle:

In Vertiefung C-1 verteilen:

- 75 µL Medium ungeschützt RP

- 25 µl RP NaCl nicht inokuliert

#### Zubereitung der Bakteriensuspension in der NaCl RP-Flasche:

Transfer von 300 & mgr; l monomikrobieller positiver Blutkultur zu RP NaCl-Flacon

Gut mischen

#### Präparation des Inokulums im RP-Medium und Verteilung in der Galerie:

Übertragen Sie 500 µL RP NaCl beimpft in die RP-Medium-Fläschchen Homogenisiere und spende das inokulierte Medium RP:

- 100 µl in der Vertiefung Test 2 (einschließlich Colistin)

- 100 & mgr; l in Vertiefung 3 der bakteriellen Wachstumskontrolle C + (ohne Colistin)

Decken Sie die Galerie ab, indem Sie die Abdeckung des "Schließsystems" aktivieren. Identifizieren Sie die Galerie mit der getesteten Probe.

Inkubieren Sie den Tunnel bei +36 +/- 2 ° C für **2 bis 4 Stunden**. Eine prämiere Beobachtung kann nach 2 Stunden Inkubation durchgeführt werden (siehe Bedingung der Auslegung des Endergebnisses Ziffer 10 - Lesung und Auslegung).

#### 10 - ABLESUNG UND AUSWERTUNG

Das Ablesen der Ergebnisse beruht auf der Identifizierung und dem Vergleich der Farbe der Test-Vertiefung 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, das die Entwicklung des Bakterienstammes 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 Test-Vertiefung (Vertiefung Nr. 2) ablesen:

1/Wenn die Vertiefung TEST 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.

#### Inokulum aus positiven Blutkulturen

Machen Sie eine erste Beobachtung nach 2 Stunden Inkubation.

Wenn die positive Kontrollvertiefung C + (Vertiefung Nr. 3, Kontrolle des Bakterienwachstums) eine gelbe Drehung zeigt, dann führen Sie eine Ablesung des Well-Tests durch (Vertiefung Nr. 2):

1 / Ist die TEST-Vertiefung gelb (oder gelb / orange) und heller als die C-negative Kontrollvertiefung (Vertiefung Nr. 1), dann ist der Stamm gegenüber Colistin resistent

2 / Wenn die TEST-Vertiefung orange ist (orange Farbe der Intensität, die der Vertiefung C-Nr. 1 entspricht), inkubiere die Galerie erneut für 2 Stunden, um eine neue Messung durchzuführen. Das Endergebnis wird nach 4 Stunden Inkubation gemacht.

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).

- *Escherichia coli* NCTC 13846 (mcr1-positiv), Colistin-**resistenter** Stamm nach 2 Stunden Inkubation (Vertiefung C-orange, **Test-Vertiefung gelb**, Vertiefung C+ gelb).

#### 12 - FEHLERURSACHEN - BESONDERE FÄLLE

Die Inokulation der Wells sollte innerhalb von 60 Minuten nach Beendigung der Bakteriensuspension bei der Trübung von Mc F 3-3,5 in dem RP NaCl-Reagenz erfolgen.

Die Farbverschiebung der positiven Kontrolle (Vertiefung # 3) der Galerie vor den 2 Stunden Inkubation bedeutet nicht, dass die Ergebnisse der Testvertiefungen interpretierbar sind.

Ein zu frühzeitiges Ablesen vor Ablauf der empfohlenen 2 Stunden Bebrütungsdauer 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.

Die Inkubationszeiten für das Ablesen der Endergebnisse dürfen nicht überschritten werden: **3 stunden für die Tests aus Inokulum aus isolierten Kolonien und 4 stunden für solche aus positive Blutkulturen.**

**Bei Blutkulturen ist unbedingt die empfohlene Inkubationszeit von 2 bis 4 stunden einzuhalten.**

Das gleichzeitige Vorhandensein eines sensiblen Stammes und eines resistenten Stammes der gleichen Enterobakterienspezies in der Bouillon der Blutkultur maskiert den Nachweis des resistenten Stammes nicht.

Das Vorhandensein eines Stammes von Enterobakterien, die gegenüber Colistin sensibel sind, kann den Nachweis der Resistenz einer anderen Art von Enterobakterien, die von Natur aus resistent sind und gleichzeitig in der Blutkultur vorliegen, maskieren.

Blutproben sollten aus monomikrobiellen Blutkulturen getestet werden.

#### 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)

Im Falle einer Inokulation aus positiven Hämokulturen beeinträchtigt die Sedimentation von roten Blutkörperchen am Boden der Vertiefungen das Ablesen und die Interpretation der Farbverschiebung nicht.

Zum Testen von isolierten Kolonien garantiert die Beimpfung des Tests aus einem standardisierten Inokulum zwischen 3 und 3,5 McF die Testleistung.

Die Nachweisgrenze (oder analytische Empfindlichkeit) beträgt 10<sup>7</sup> CFU /ml; dies entspricht der Mindestbakterienbelastung, die erforderlich ist, um Colistin-resistente Stämme in einer Blutprobe nachzuweisen. Eine Bakteriedichte von weniger als 10<sup>7</sup>CFU / ml in der Bouillon der Blutkultur kann falsch negative Ergebnisse ergeben.

## 14 - LEISTUNGSPARAMETER

### 14.1 - LEISTUNG DES TESTS VON ISOLIERTEN KOLONIEN

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 morgani</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	
Erworbene 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 Bebrütungsdauer ausgewertet. Der klinische Konkordanzprozentsatz des Rapid Polymyxin NP Test 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.

### 14.2 - LEISTUNG DES TESTS AUS POSITIVEN BLUTKULTUREN

Gesamtleistungen, die durch die Kombination der beiden Arten von Blutkulturprotokollen erzielt werden:

Leistung	Klinische Blutkultur	Angereicherte Blutkulturen*	Gesamt
Empfindlichkeit	66,7%	98%	96,3%
Spezifität	100%	100%	100%

\* angereichert: Blutkulturen, die mit Enterobakterienstämmen, die gegenüber Colistin empfindlich oder resistent sind, ergänzt werden

#### • Leistung des Tests, die auf der Grundlage positiver klinischer Blutkulturen durchgeführt wurden

27 positive klinische Blutkulturen in Flaschen von aeroben und anaeroben Kulturen (BD BACTEC™ Plus Aerobic / F und Plus-Anaerobic / F) von unduplizierten Patientenproben enthalten waren, wurden von Becton Dickinson FX nachgewiesen und vom CHUV Lausanne, Schweiz, Pr. G. Greub, analysiert. Die Verteilung der Spezies getestet ist 19 *Escherichia coli*, 2 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Klebsiella oxytoca*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Proteus mirabilis* und 1 *Serratia marcescens*.

Zwei Stämme von natürlicher Resistenz gegen Colistin (*Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*) ergaben übereinstimmend positive Ergebnisse innerhalb von 4 Stunden nach der Inkubation für jede aerobe und anaerobe Kulturbedingung.

Ein Colistin-resistenter *Klebsiella pneumoniae*-Stamm (MIC = 8 mg / L) wurde innerhalb von 4 Stunden nach der Inkubation des Tests nicht nachgewiesen (falsch-negatives Ergebnis).

Bei klinischen Blutkulturen beträgt die Sensitivität des Tests 66,7% und die Spezifität 100%.

Bakteriendichte aller Blutkulturbrühen in dieser Studie getestet wurde, war  $\geq 10^7$  KBE / ml, mit Ausnahme von zwei anaeroben Fläschchen  $10^6$  KBE / mL.

#### • Leistung des Tests aus angereicherten Blutkulturen:

Um resistentere Stämme zu testen, wurde ein angereichertes Blutkulturprotokoll vom CHUV durchgeführt.

Von den 72 getesteten Stämmen enthielten 51 resistente Stämme verschiedene Colistinresistenz-Genotypen und 21 Stämme waren sensibel. Für jeden Stamm wurden aerobe und anaerobe Flaschen

getestet.

Von den 51 resistenten Stämmen wurde eine einzelne Diskordanz mit dem *E. coli*-Stamm MCR-1 beobachtet (falsch negatives Ergebnis). Für angereicherten Blutkulturen beträgt die Empfindlichkeit des Tests 98% und die Spezifität 100%.

## 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 - Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. 2016 Rapid detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures. J Clin Microbiol 54:2273-2277.

4 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 10th ed. Document M07–A10. Wayne (PA): The Institute; January 2015.

5 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th edition. Document M100–28. Wayne (PA): The Institute; 2018.

6 - Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2017. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, V1.0 mars 2017.

Änderungen gegenüber der vorigen Version sind grau unterstrichen.



**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>