

RAPID POLYMYXIN NP

Ανίχνευση της ευαισθησίας και της αντοχής των εντερο-βακτηριδίων σε πολυμυξίνες (καλλιέργειες αποικίας και αίματος)
10 δοκιμές (REF 23000)

CPB 0405-EL-2018-02

Για διάγνωση *in vitro* μόνο για επαγγελματική χρήση.

Οι δοκιμές είναι μόνο για μία χρήση.



1 - ΣΤΟΧΟΣ

Η δοκιμή Ταχεία NP Πολυμυξίνη μπορεί να ανιχνεύσει την ευαισθησία και την αντίσταση των εντερο-βακτηριδίων ενάντια σε πολυμυξίνες (πολυμυξίνη E ή κολιστίνη και πολυμυξίνη B) από την της βακτηριδιακής καλλιέργειας σε μέσο αгарόζης ή σε μια θετική καλλιέργεια αίματος.

2 - ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ

Η ανάπτυξη πολυ-ανθεκτικών βακτηριδίων σε πολλές οικογένειες τα αντιβιοτικά (τα λεγόμενα πολυδύναμα βακτηρίδια ή BMR) αντιπροσωπεύουν μια πρόκληση για τη δημόσια υγεία με τη δραστηρική μείωση των θεραπευτικών επιλογών και την αύξηση του ποσοστού θνησιμότητας στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Μεταξύ των BMR, τα εντεροβακτήρια (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ή άλλος άλλα- είναι η κύρια πηγή βακίλων BMR αρνητικό gram. Είναι υπεύθυνοι για τις περισσότερες κοινές λοιμώξεις κοινότητας (ουροποιητικό, πνευμονικό, ενδοκοιλιακό, αίμα) και νοσοκομειακές. Επιπλέον, απέκτησε την αντοχή τους σε β-λακτάμες (πενικιλίνες κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμη) και το εκτεταμένο φάσμα των αμινογλυκοσίδων και των κινολόνων εμφανίζονται όλο και περισσότερο στο κόσμο.

τα βακτήρια η BMR αναβίωσε το ενδιαφέρον έφερε σε αυτήν την εξέλιξη παλιά κατηγορία αντιβιοτικών, πολυμυξίνες (πολυμυξίνη E ή κολιστίνη και πολυμυξίνη B), τα οποία είναι γενικά θεωρούνται ως μόρια της έσχατης λύσης. Της κολιστίνης καθοδηγούμενα σήμερα στις Ωστόσο, η αυξανόμενη χρήση η εμφάνιση και η αναπαραγωγή της σειράς νέων στελεχών της Επίτοξας- πολυ-ανθεκτική σειρά με κολιστίνη και καρβαπενέμες, και συνιστά μια νέα απειλή για την ανθεκτικότητα ενός θεραπευτικού οπλοστασίου Ο έλεγχος τα θεραπευτικά αδιέξοδα και ο έλεγχος των κινδύνων λοιμώξεων σε κλινικές συνθήκες απαιτούν μια ταχεία αξιολόγηση των προφίλ ευαισθησίας και αντοχής των στελεχών βακτηριακής κολιστίνης. Οι διαθέσιμες μέθοδοι για τον προσδιορισμό αυτό η ευαισθησία ή η αντίσταση στην κολιστίνη δεν είναι προσαρμοσμένες σε κλινική και νοσοκομειακή φροντίδα Κρίνονται κουραστικά, μακρά (24 ώρες, MIC σε υγρό μέσο) ή ελλείπει αξιοπιστίας στην περίπτωση μεθόδους διάχυσης αгарόζης [άγαρ].

Η δοκιμή Ταχεία NP Πολυμυξίνη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντίστασης των εντερο-βακτηριδίων κολιστίνης σε λιγότερο από 3 ώρες και αυτό με ευαίσθητο και συγκεκριμένο τρόπο. Αυτή η δοκιμή είναι γρήγορη, εύκολη στη χρήση, εύκολη στην ανάγνωση και προσαρμογή σε όλα τα εργαστήρια ανάλυσης. Χρησιμοποιεί μια υγρή μέθοδο ανίχνευσης από το σύνολο της φαινοτυπικής αντίστασης, η οποία επιτρέπει την υλοποίηση σε άμεση θέση κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας ή ταυτοποίηση με τα άτομα με στελέχη ανθεκτικά στην κολιστίνη να περιοριστεί ο κίνδυνος διάχυσης επιδημικών

3 - ΑΡΧΗ

Η δοκιμή Ταχεία NP Πολυμυξίνη βασίζεται στην αρχή που περιγράφεται από τους Nordmann P, Jayol A. και Poirel L. (1-2-3). Αυτή η υγρή μέθοδος βασίζεται στην χρωματομετρική ανίχνευση για τον γρήγορο μεταβολισμό της γλυκόζης, που σχετίζεται με την βακτηριδιακή ανάπτυξη, παρουσία μιας καθορισμένης συγκέντρωσης κολιστίνης

Η οξίνιση του μέσου καλλιέργειας λόγω αυτής της ανάπτυξης εμφανίζεται με την αλλαγή χρώματος από πορτοκαλί σε κίτρινο της ένδειξης pH ερυθρό φαινόλης

4 – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Περιγραφή	ποσότητα
RP NaCl : Φλασκί 3 mL υγρού μέσου που περιέχει 0,85 g / L NaCl για την παρασκευή του εμβολίου	12
RP Medium : Μπουκάλι του 1,5 mL του μέσου του κουλτούρα για εντερο-βακτηρίδια, με βάση το ωμό O Mueller-Hinton (25 g / L) προσαρμοσμένο σε κατιόντα, γλυκόζη 10 g / L, και κόκκινη φαινόλη (50 mg / L) ως δείκτη pH	10
Γκαλερί RP Κολιστίνη : Γκαλερί που περιέχει ένα φρεάτιο του αρνητικό μάρτυρα C-, ένα φρεάτιο δοκιμής που περιέχει σε συγκέντρωση 2 µg / mL και ένα φρεάτιο ελέγχου βακτηριακής ανάπτυξης C +. Γκαλερί διαμορφωμένη σε τσάντα αλουμινίου με ενσωματωμένο ζηραντικό	10
RP TC (Turbidity Control) : Φλασκί με 3 mL του διαλύματος του θειικού βαρίου ως έλεγχο της θολότητας	1
Σύστημα κλεισίματος : Προστατευτικό κάλυμμα της γκαλερί σε σπόρο ημιδιαφανές πλαστικό	10

5 - ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τα αντιδραστήρια αυτού του kit προορίζονται για διάγνωση *in vitro* (σε δοκιμαστικό σωλήνα) μόνοι και πρέπει να γίνεται από εξουσιοδοτημένα άτομα. Δείγματα, βακτηριακές καλλιέργειες για τα εμβολιασμένα αντιδραστήρια είναι δυναμικά μολυσματικές, πρέπει να αντιμετωπίζονται με τις δευτευσιες προφυλάξεις κατά τη χρήση, τηρώντας τους κανόνες υγιεινής και τον κανονισμό στη χώρα χρήσης για αυτόν τον τύπο προϊόντος.

Είναι προτεινόμενη η χρήση μιας θέσης ασφαλείας μικροβιολογικά (PSM) να επιδιορθωθεί. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης. Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες μεταξύ +2 και +8°C.

Μην χρησιμοποιείτε προηγούμενως κατεστραμμένα ή κακώς συντηρημένα αντιδραστήρια.

Μην χρησιμοποιείτε φιαλίδια RP Medium που παρουσιάζουν σημεία διαρροών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη δοκιμή Ταχεία NP πολυμυξίνη μεταφράζει την ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στην κολιστίνη των εντεροβακτηριακών στελεχών αλλά τα οποία δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο τους για να εκτελέσουν μια κλινική διάγνωση. Αυτό πρέπει να πραγματοποιηθεί από το γιατρό στα βιολογικά αποτελέσματα και κλινικά συμπτώματα

6 - ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Οι μικροοργανισμοί που πρέπει να δοκιμάσετε έχουν απομονωθεί κατά προτίμηση σε μη όξινο μέσο καλλιέργειας τύπου Luria Bertani, Mueller Hinton, Columbia αгарόζη [άγαρ] 5% αίμα προβάτου, Αγαρόζη [άγαρ] σοκολάτας-PolyVitek, Ηωσίνη Με αгарόζη [άγαρ] με κυανό μεθυλενίου ή αгарόζη [άγαρ] χρωμογόνος. Εξαιρούνται από τη λίστα από αυτά τα μέσα, για παράδειγμα η αгарόζη [άγαρ] τύπου Drigalski. Η πραγματοποίηση πρέπει να διενεργείται δοκιμαστικά από πρόσφατα αποκτημένες αποικίες (15 ωρών σε επώαση 24 ωρών). Εντεροβακτήρια από δείγματα μπορούν να δοκιμαστούν απευθείας από μικρές καλλιέργειες αίματος, νομικροβιακά που επωάζονται υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες.

7 - ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Όλα τα αντιδραστήρια που παρέχονται είναι έτοιμα για εργασία. Το kit και τα αντιδραστήρια διατηρούνται στους +2°C +8°C στη δική τους συσκευασία πρωτότυπη που είναι: σταθερή μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο κουτί.

Τα RP αντιδραστήρια Το μέσο και RP NaCl είναι μόνο για μία χρήση.

Αν το αντιδραστήριο RP Το TC χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση του εμβολίου από το απομονωμένες αποικίες πρέπει να διατηρηθεί μέχρι τη χρήση του τελευταίου ενεργού μέσου RP του kit Φυλάσσετε. Το αντιδραστήριο RP TC πρέπει να προστατευμένο το φως, από φυλάσσεται στους +2°C +8°C και

8 - ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Δοχεία για μολυσμένα απόβλητα

Πυκνόμετρο

Σταγονόμετρο και κώνοι

Ο φούρνος πλήρως τις προδιαγραφές στους +36°C +/- 2°C

9 - ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

9.1. ΔΟΚΙΜΗ ΑΠΟ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΚΟΛΩΝΕΣ ΣΤΑ ΜΕΣΑ ΓΕΛΩΣΗΣ

Ο φαινότυπος των βακτηρίων με αρνητικό GRAM πρέπει να επαληθεύεται από την εκτέλεση μιας χρώσης κατά GRAM. Δοκιμή πρέπει να αναγνωρισμένες πραγματοποιείται μόνο από αποικίες ως Enterobacteria και με εξάιρεση ιδίως το *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*.

Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Προ-επίωση για 10 λεπτά στους 37°C το μέσο RP. Αφαιρέστε την κόλλα που καλύπτει το κάτω μέρος της γκαλερί (φρεάτια 1, 2 και 3).

• **Προετοιμασία του αρνητικού μάρτυρα:**

Διανομή στο φρεάτιο C- αριθ. 1

-75 µL RP Medium δεν εμβολιάστηκε

-25 µL RP NaCl δεν εμβολιάστηκε

• **παρασκευή του βακτηριακού αιωρήματος στη φιάλη RP NaCl :**

Κεντρίστε τρεις έως τέσσερις πανομοιότυπες απομονωμένες αποικίες χρησιμοποιώντας ένα 10 µl ή μια φραγμένη πιπέτα Pasteur NaCl και ομογενοποιήστε πλήρως. Αφαιρέστε τα σε μια φιάλη RP

• **Τυποποίηση του εμβολίου:**

Συνιστάται η τυποποίηση του εμβολίου με χρήση ενός πυκνόμετρου. Ωστόσο, μία φιάλη RP Το TC διατίθεται υπό συνθήκες ορθής πρακτικής χρήσης (βλ παράγραφο *φι-άλη RP TC*).

- **Χρησιμοποιώντας πυκνόμετρο**

Ελέγξτε με ένα πυκνόμετρο ότι εμβολιάστηκε η θολερότητα του μέσου είναι μεταξύ 3 και 3,5 Mac Farland (Mc F). Θα έπρεπε η χαμηλότερη τιμή που επιτυγχάνεται μετατρέποντας την φιάλη σε συσκευή. Εάν το Mc F είναι μικρότερο από 3 (ανεπαρκές ενοφθάλμισμα), επαναποθετήστε την *φι-άλη* έως ότου αποκτηθεί ένα McF μεταξύ 3 και 3,5. Αν είναι το Mc F μεγαλύτερη από 3,5 (εμβόλιο πάρα πολύ πλούσιο), αραιώστε με μια νέα φιάλη RP NaCl έως ότου ληφθεί σωστή αδιαφάνεια. 2 φιάλες RP NaCl περιλαμβάνονται επιπλέον αυτό το αποτέλεσμα στο κουτί και πρέπει να είναι απορρίπτεται μετά τη χρήση.

η φιάλη RP NaCl που παρέχεται και η πυκνότητα ασυμβατότητα μεταξύ μετρου, συνιστάται: να μεταφέρετε τα περιεχόμενα σε έναν σωλήνα συμβατό με τη συσκευή, να πάρετε μια τιμή στο 0 Mc F, κατόπιν προσθέστε τις αποικίες μέχρι να ληφθεί ένα 3-3,5 Mc F.

-**Ξε σύγκριση με τη φιάλη RP TC**

Αυτή η μέθοδος οπτικής ανίχνευσης μπορεί να είναι υποκειμενική και απαιτεί καλή εργαστηριακή πρακτική για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία της απόκτησης από 3-3,5 McF στην εμβολιασμένη φιάλη RP NaCl. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η επίτευξη της αναμενόμενης οπτικής πυκνότητας της φιάλης RP Το ενοφθάλμισμένο NaCl σε σύγκριση με τη διαταραχή του RP TC παρέχει, είναι απαραίτητο για την επικύρωση της διαδικασίας για την εκτέλεση της διαταραχής εμβολιασμού.

Μεθοδολογία:

Ρυθμίστε την αδιαφάνεια του μέσου σποράς σε αυτό του ελέγχου θολερότητας RP TC χρησιμοποιώντας τις μαύρες γραμμές της επικέτας της φιάλης. Αν ενδείκνυται για να ρυθμίσετε τη διαταραχή, λειτουργήστε όπως υποδείχθηκε προηγούμενως.

• Προετοιμασία του εμβολίου στο RP Medium και διανομή στη γκαλερί:

Μεταφέρετε 500 μl RP NaCl σπέρματος στη μέση φιάλη RP Medium.

-Με καλή ομογενοποίηση και διανομή του σπόρου Medium RP:

-100 μL στο δοκιμαστικό δείγμα 2 και 3 (που περιέχουν κολιστίνη)

-100 μL στην κυψελίδα αριθ. 3 ελέγχου βακτηριακής ανάπτυξης C+

(χωρίς κολιστίνη)

Καλύψτε τη γκαλερί εμπλέκοντας το κάλυμμα του "συστήματος κλεισίματος".

Προσδιορίστε τη συλλογή με τις αναφορές του δοκιμασμένου

δείγματος. Επώαστε τη σήραγγα στους +36 +/- 2°C για 2 έως 3

ώρες.

Μια πρώτη παρατήρηση μπορεί να γίνει μετά από επώαση 2 ωρών (βλ. προϋπόθεση ανάγνωσης και ερμηνείας της τελικής παραγράφου 10 - Ανάγνωση και ερμηνεία).

9.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΠΟ ΤΗ ΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΙΚΟΤΗΤΑ

Η δοκιμή πρέπει να διεξάγεται μόνο από μια θετική μονο-μικροβιακή καλλιέργεια αίματος που περιέχει εντεροβακτήρια (και εξαιρουμένων, ειδικότερα, *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*) που προσδιορίζονται από την MALDI TOF.

Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (+18 +25°C) για 10 λεπτά. Προ-επώαστε το μέσο RP για 10 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε την κόλλα που καλύπτει το κάτω μέρος της γκαλερί (φρεάτια 1, 2, και 3).

Προετοιμασία του αρνητικού μάρτυρα:

Διανομή στο φρεάτιο C- αριθ. 1

- 75 μL μη ενοφθαλμισμένο RP Medium

- 25 μL μη ενοφθαλμισμένου RP NaCl

Προπαρασκευή του βακτηριακού εναιωρήματος στην φιάλη RP NaCl:

Μεταφέρετε 300 μL μονομικροβιακής θετικής καλλιέργειας αίματος σε φλασκή RP NaCl

Αναμίξτε καλά

Προετοιμασία του εμβολίου στο RP Medium και διανομή στη γκαλερί:

Μεταφέρετε 500 μL RP NaCl εμβολιασμένα στο φιαλίδιο RP Medium αναμειξτε καλά και διανείμετε το εμβολιασμένο μέσο RP:

- 100 μL στην δοκιμασία φρεατίου 2 (συμπεριλαμβανομένης της κολιστίνης)

100 μL στην κυψελίδα αριθ. 3 ελέγχου βακτηριακής ανάπτυξης C + (χωρίς κολιστίνη)

Καλύψτε τη γκαλερί εμπλέκοντας το κάλυμμα του "συστήματος κλεισίματος". Προσδιορίστε τη συλλογή με το δοκιμασμένο δείγμα.

Επώαστε τη γκαλερί στους +36 +/- 2°C για 2 έως 4 ώρες. Μια πρώτη παρατήρηση μπορεί να γίνει μετά από 2 ώρες επώασης (βλ. Όρο ερμηνείας του τελικού αποτελέσματος, παράγραφος 10 - Ανάγνωση και ερμηνεία).

10 - ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων βασίζεται στην αναγνώριση και σύγκριση του χρώματος του δοκιμαστικού φρεατίου με εκείνα των φρεατίων C + και C-.

• **Αρνητικός έλεγχος ανάγνωσης (αρνητικό δείγμα ελέγχου C- αριθ. 1)** : Ο αρνητικός μάρτυρας αριθ. 1 (C-) έχει το αρχικό (κόκκινο) χρώμα του μέσου. Η εκτίμηση μιας αλλαγής χρώματος του φρεατίου δοκιμής γίνεται σε σχέση με αυτόν τον έλεγχο.

AV και το C- έχει κίτρινο χρώμα, είναι άκυρο. Σε αυτή την περίπτωση μην ερμηνεύσετε το αποτέλεσμα και επαναλάβετε τη δοκιμή.

• **Επικύρωση (φρεάτιο θετικού ελέγχου C + n ° 3)**:

Ελέγξτε ότι το μέσο που αντιστοιχεί στον έλεγχο ανάπτυξης βακτηρίων (C +) έχει γίνει κίτρινο.

Ανάγνωση και ερμηνεία του φρεατίου Δοκιμή αριθ. 2:

Μια αλλαγή στο χρώμα του μέσου, αρχικά πορτοκαλί, σε κίτρινο / πορτοκαλί ή κίτρινο, δείχνει την ικανότητα του στελέχους να αναπτυχθεί σε συγκέντρωση 2 μg / mL κολιστίνης.

Από την άλλη πλευρά, η απουσία αλλαγής χρώματος του μέσου υποδεικνύει ότι η ανάπτυξη του στελέχους αναστέλλεται σε συγκέντρωση 2 μg / mL κολιστίνης.

• Εμβόλιο από απομονωμένες αποικίες

Πραγματοποιήστε μια πρώτη παρατήρηση μετά από 2 ώρες επώασης. Εάν το φρεάτιο θετικού ελέγχου C + (φρεάτιο αριθ. 3, έλεγχος ανάπτυξης βακτηρίων) εμφανίζει κίτρινη στροφή, τότε πραγματοποιήστε ανάγνωση του φρεατίου δοκιμής (φρεάτιο αριθ. 2):

1 / εάν το φρεάτιο δοκιμής είναι κίτρινο (ή κίτρινο / πορτοκαλί και ελαφρύτερο σε χρώμα) ότι το φρεάτιο ελέγχει αρνητικό C- (φρεάτιο αριθ. 1) τότε το στέλεχος είναι ανθεκτικό στην κολιστίνη

2 / αν το φρεάτιο ΔΟΚΙΜΗ είναι πορτοκαλί (με ένταση πορτοκαλί χρώματος ίσο με Καλά C- αριθ. 1) και στη συνέχεια εκ νέου επώαση της γκαλερί για 1 ώρα για να εκτελέσετε μια νέα ανάγνωση. Το τελικό αποτέλεσμα γίνεται σε 3 ώρες επώασης.

• Εμβόλιο από θετικές καλλιέργειες αίματος

Πραγματοποιήστε μια πρώτη παρατήρηση μετά από 2 ώρες επώασης. Εάν το φρεάτιο θετικού ελέγχου C + (φρεάτιο αριθ. 3, έλεγχος ανάπτυξης βακτηρίων) εμφανίζει κίτρινη στροφή, τότε πραγματοποιήστε ανάγνωση του φρεατίου δοκιμής Δοκιμή (φρεάτιο αριθ. 2):

1/ εάν το φρεάτιο δοκιμής είναι κίτρινο (ή κίτρινο / πορτοκαλί και ελαφρύτερο σε χρώμα) ότι το φρεάτιο ελέγχει αρνητικό C- (φρεάτιο αριθ. 1) τότε το στέλεχος είναι ανθεκτικό στην κολιστίνη

2/ εάν το φρεάτιο ΔΟΚΙΜΗ είναι πορτοκαλί (με ένταση πορτοκαλί χρώματος ίσο με Καλά C- αριθ. 1) και στη συνέχεια εκ νέου επώαση της γκαλερί για 1 ώρα για να εκτελέσετε μια νέα ανάγνωση. Το τελικό αποτέλεσμα γίνεται σε 4 ώρες επώασης.

Δεν υπάρχουν επί του παρόντος διαθέσιμες κρίσιμες συγκεντρώσεις σύμφωνα με το CLSI (4-5) για τα εντεροβακτήρια. Επομένως, τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά στην κολιστίνη σύμφωνα με τα κριτήρια ερμηνείας που συνιστώνται από το πρότυπο EUCAST (6):

ένα στέλεχος εντεροβακτηρίου του MIC με κολιστίνη ≤ 2 μg / mL ορίζεται ως ευαίσθητο (ανασταλμένη βακτηριακή ανάπτυξη, χρώματος πορτοκαλί χρώματος του μέσου).

ένα στέλεχος enterobacterium από MIC σε MIC colistin > 2 μg / mL κατηγοριοποιείται ως ανθεκτικό (μη παρεμποδισμένη βακτηριακή ανάπτυξη, κίτρινο / πορτοκαλί ή κίτρινο χρώμα του μέσου).

11 - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ο έλεγχος της δοκιμής μπορεί να πραγματοποιηθεί με στελέχη συλλογής:

- *Escherichia coli* ATCC 25922, στέλεχος **ευαίσθητος** με κολιστίνη μετά από 2 ώρες επώασης (C-πορτοκαλί φρεάτιο, **πορτοκαλί δοκιμή καλά**κυψελίδα C + κίτρινο) - *Proteus mirabilis* ATCC 25933, στέλεχος **ανθεκτικός** με κολιστίνη μετά από 2 ώρες επώασης (C-πορτοκαλί φρεάτιο, **κίτρινο TEST** καλάφρεάτιο C + κίτρινο)

- *Escherichia coli* NCTC 13846 (θετικό mcr1), στέλεχος **ανθεκτικός** με κολιστίνη μετά από 2 ώρες επώασης (C-πορτοκαλί φρεάτιο, **κίτρινο TEST** καλάφρεάτιο C + κίτρινο).

12 - ΑΙΤΙΕΣ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ - ΕΙΔΙΚΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ

Ο εμβολιασμός των φρεατίων θα πρέπει να γίνει εντός 60 λεπτών μετά την ολοκλήρωση του βακτηριακού εναιωρήματος με θολερότητα του McF 3-3.5 στο αντιδραστήριο RP NaCl.

Η μετατόπιση χρώματος του θετικού μάρτυρα (φρεάτιο αριθ. 3) της γκαλερί πριν από τις 2 ώρες επώασης δεν σημαίνει ότι τα αποτελέσματα των δοκιμαστικών φρεατίων είναι ερμηνεύσιμα.

Μια πρόωρη ανάγνωση πριν από τη συνιστώμενη επώαση 2 ωρών μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένο αποτέλεσμα: μια ψευδή ευαισθησία στην κολιστίνη για ένα ανθεκτικό στέλεχος.

Εάν ο θετικός έλεγχος της γκαλερί (φρεάτιο αριθ. 3) δεν δείχνει την αναμενόμενη χρωματική στροφή (κίτρινη), τότε δεν μπορούν να ερμηνευτούν φρεάτια. Πρέπει να γίνει νέα δοκιμή.

Επιβάλλεται να μην υπε ρβαίνουν οι χρόνοι επώασης για την ανάγνωση των τελικών αποτελεσμάτων: αντιστοιχάσε 3 ώρες για δοκιμές που έγιναν από ενοφθαλμισμό από απομονωμένες αποικίες και 4 ώρες για

δοκιμές που έγιναν από θετικές καλλιέργειες αίματος..

Για τις καλλιέργειες αίματος, είναι επιτακτική η τήρηση του συνιστώμενου χρόνου επώασης από 2 ώρες έως 4 ώρες.

Η ταυτόχρονη παρουσία ενός ευαίσθητου στελέχους και ενός ανθεκτικού στελέχους του ίδιου είδους εντεροβακτηρίων στον ζυμό αιμοκάθαρσης δεν αποκρύπτει την ανίχνευση του ανθεκτικού στελέχους.

Η παρουσία ενός ευαίσθητου σε κολιστίνη εντεροβακτηριακού στελέχους μπορεί να αποκρύψει την ανίχνευση ανθεκτικότητας ενός άλλου είδους εντεροβακτηρίων που είναι φυσικά ανθεκτικό και ταυτόχρονα παρόν στον ζυμό καλλιέργειας αίματος.

Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να εξετάζονται από μονομικροβιακές καλλιέργειες αίματος.

13 - ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι βακτηριδιακές αποικίες που πρόκειται να δοκιμαστούν δεν πρέπει να έχουν απομονωθεί σε πλάκες αгарόζης [άγαρ], η αρχή της οποίας είναι η αποκάλυψη της οξίνισης του μέσου (π.χ. Drigalski, Bromocresol purple (BCP) και MacConkey), η οποία δεν είναι η κατάλληλη για την πραγματοποίηση της δοκιμής με την μέθοδο Ταχεία NP Πολυμυξίνη. Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί εκ των προτέρων μεταφύτευση σε κατάλληλο μέσο (βλέπε παράγραφο 6 - Συλλογή δειγμάτων).

Στην περίπτωση εμβολιασμού από θετικές καλλιέργειες αίματος, η καθίζηση των ερυθροκυττάρων στον πυθμένα των φρεατίων δεν παρεμποδίζει την ανάγνωση και ερμηνεία της μετατόπισης χρώματος.

Για δοκιμή από απομονωμένες αποικίες, η προσκόλληση σε δοκιμασία ενοφθαλμισμού από τυποποιημένο ενοφθαλμισμα μεταξύ 3 και 3,5 McF εγγυάται την απόδοση της δοκιμής.

Το όριο ανίχνευσης (ή αναλυτική ευαισθησία) είναι 10⁷ CFU / mL. αυτό αντιστοιχεί στο ελάχιστο βακτηριακό φορτίο που απαιτείται για την ανίχνευση ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών σε δείγμα San-Guinea. Μία βακτηριακή πυκνότητα μικρότερη από 10⁷ CFU / mL στον ζυμό καλλιέργειας αίματος μπορεί να παρουσιάζει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

14 - ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ

14.1 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΑΠΟ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΣΥΛΛΟΓΕΣ

Η αξιολόγηση της απόδοσης της δοκιμής με την μέθοδο Ταχεία NP Πολυμυξίνη διεξήχθη στην Αναδυόμενη Μονάδα Αντιβιοτικής Αντίστασης (INSERM, Σχολή Επιστημών, Πανεπιστήμιο του Fribourg, Ελβετία), σε σχέση με τη μέθοδο προσδιορισμού των συγκεντρώσεων ελαχίστων αναστολέων (MIC) σε υγρό μέσο (προσαρμοσμένο κατιόν μικροκυψελής Mueller-Hin-ton, όπως περιγράφεται στην κατευθυντήρια γραμμή του [Κλινικού Εργαστηρίου] Clinical Laboratory Standard Institute (4-5) η οποία αναφέρεται και ως μέθοδος αναφοράς.

Τα βακτηρίδια στη μελέτη προέρχονται από διάφορα διεθνή κλινικά δείγματα και διαιρούνται σύμφωνα με τα ακόλουθα είδη:

Είδος	Αριθμός ελεγμένου	Είδος	Αριθμός ελεγμένου	Είδος	Αριθμός ελεγμένου
<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		

219 στελέχη Enterobacteriaceae επιλέχθηκαν από τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη εντεροβακτηρίων που περιλαμβάνουν 78 ευαίσθητα στελέχη και 141 στελέχη ανθεκτικά στην κολιστίνη.

Μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών παρατηρούνται διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί αντοχής σε πολυμυξίνες (χρωμοσωματικά, πλασμιδια, ενδογενή ή μη καθορισμένα).

Τα MICs των στελεχών κολιστινίνης και ο μηχανισμός αντίστασης τους έχουν ως εξής:

MIC μg / mL	0,125	0,25	0,5	<1	1	2	4	8	16	> 16	32	64	128	> 128
Αριθμός της στέλεχος	9	1	1	60	3	4	8	18	19	10	21	33	20	12

Μηχανισμοί αντίστασης		Αριθμός στέλεχος	
Εσωτερική αντίσταση (φυσική)		10	
Αποκτημένη αντίσταση	χρωμοσωμικές	heteroresistance	2
		Μεταλλαγή γονιδίου MgrB	70
		PhoP γονιδιακή μετάλλαξη ή Q	2
		PmrA ή B γονιδιακή μετάλλαξη	10
	πλασμιδιο	γονιδιακή μετάλλαξη mcr-1	30
Άγνωστος μηχανισμός		17	

Τα βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν εκ νέου σε αгарόζη [άγαρ] (Luria Berta-ni, Mueller Hinton, Columbia 5% στο αίμα) για 18-24 ώρες ώστε να ελέγξετε δοκιμαστικά με την μέθοδο Ταχεία NP Πολυμυξίνη ταυτόχρονα με τον προσδιορισμό της MIC από την τεχνική σε μικρο-αραίωση υγρού από τις οδηγίες του CLSI.

Η δοκιμή Ταχεία NP Πολυμυξίνη ερμηνεύεται μετά από 2 με 3 ώρες επώαση. Το ποσοστό κλινικής συναίνεσης της δοκιμής με την μέθοδο Ταχεία NP Πολυμυξίνη είναι 97,7% σε σύγκριση με τη μέθοδο υγρού MIC. Η ευαισθησία της δοκιμής είναι 99,3% και η ειδικότητα είναι 94,9%.

Υπάρχουν 4 κύριες διαταραχές (DM) (MIC μεταξύ 1 και 2 mg / L) και μία πολύ μεγάλη δυσλειτουργία (DTM) (στέλεχος *Klebsiella elastικό-moniae* 8 mg / L MIC του οποίου ο μηχανισμός αντίστασης δεν είναι γνωστός). Το ποσοστό κλινικής συμμόρφωσης, σε 1 αραίωση, είναι 99,1%. Επιμονή για 1 DM και 1 DTM.

Όσον αφορά τον χρόνο επώασης, όλα τα στελέχη έδωσαν ένα ερμηνεύσιμο αποτέλεσμα σε 2 ώρες. Επιπλέον, το προφίλ των ευαίσθητων στελεχών είναι σταθερό ακόμη και μετά από 3 ώρες επώασης.

14.2 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΘΕΤΙΚΟ ΗΜΟΚΛΙΤΕΙΑ

Οι συνολικές επιδόσεις που λαμβάνονται συνδυάζοντας τους δύο τύπους πρωτοκόλλου καλλιέργειών αίματος:

Επιδόσεις	Καλλιέργεια αίματος, συμπτώματα	Καλλιέργειες αίματος εμπλουτισμένα *	Παγκόσμι α
Ευαισθησία	66,7%	98%	96,3%
Εξατομικευμένος χαρακτήρας	100%	100%	100%

* εμπλουτισμένες: καλλιέργειες αίματος συμπληρωμένες με στελέχη εντεροβακτηρίων ευαίσθητα ή ανθεκτικά στην κολιστίνη

• Εκτέλεση δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν από θετικές κλινικές καλλιέργειες αίματος

27 Θετικές κλινικές καλλιέργειες αίματος που περιέχονται σε φιαλίδια αερόβιας και αναερόβιας καλλιέργειας (BD BACTEC Plus Aerobic / F Plus) Anaerobic / F) από δείγμα ασθενών χωρίς δείγμα, ανιχνεύθηκαν με αυτοματοποιημένο σύστημα Becton Dickinson FX και αναλύθηκαν από το CHUV Lausanne, Ελβετία, Pr. G. Greub.

Η κατανομή των εξεταζόμενων ειδών είναι 19 *Escherichia coli*, 2 *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Klebsiella oxytoca*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Proteus mirabilis* και 1 *Serratia marcescens*.

Δύο στελέχη φυσικής αντίστασης στην κολιστίνη (*Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*) έδωσαν σταθερά θετικά αποτελέσματα τις 4 ώρες επώασης για κάθε κατάσταση αερόβιας και αναερόβιας καλλιέργειας.

Ένα στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* δεν ανιχνεύθηκε ανθεκτικότητα στην κολιστίνη (MIC = 8 mg / L) (ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα) εντός 4 ωρών από την επώαση της δοκιμής.

Για κλινικές καλλιέργειες αίματος, η ευαισθησία της δοκιμής είναι 66,7% και η ειδικότητα είναι 100%.

Η βακτηριακή πυκνότητα όλων των ζυμών καλλιέργειας αίματος που δοκιμάστηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν $\geq 10^7$ CFU / mL με την εξαίρεση 2 αναερόβιων φιαλών στα 10^6 CFU / mL.

• Παραστάσεις των δοκιμασιών που διεξήχθησαν από καλλιέργειες αιματοκρίτη:

Για να δοκιμαστούν περισσότερο ανθεκτικά στελέχη, πραγματοποιήθηκε από το CHUV ένα πρωτόκολλο εμπλουτισμένης καλλιέργειας αίματος.

Από τα 72 στελέχη που εξετάστηκαν, 51 ανθεκτικά στελέχη περιείχαν διαφορετικούς γονότυπους ανθεκτικότητας στην κολιστίνη και 21 στελέχη ήταν αίσθητά. Για κάθε στέλεχος δοκιμάστηκαν αερόβιες και αναερόβιες φιάλες.

Από τα 51 ανθεκτικά στελέχη, παρατηρήθηκε μία μοναδική ανακολουθία με ένα στέλεχος *E. Coli* MCR-1 (ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα).

Για εμπλουτισμένες καλλιέργειες αίματος, η ευαισθησία της δοκιμής είναι 98% και η ειδικότητα είναι 100%.

15 - ΔΙΑΘΕΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Τα απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες κανόνες και κανονισμούς υγιεινής για αυτόν τον τύπο αντιδραστηρίων στη χώρα χρήσης.

16- ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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 L, EP15305409.3: "Test for determining susceptibility to resistance to polymyxins in Enterobacteriaceae", 20. března 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. 10. vydání Dokument M07-A10. Wayne (PA): The Institute; leden 2015.
- 5 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28. vydání. Dokument M100-28. Wayne (PA): The Institute; 2018.
- 6 - Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Doporúčení 2017. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, V1.0 března 2017.

οι αλλαγές από την προηγούμενη έκδοση επισημαίνονται με γκρι χρώμα.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE

☎: 33 (0)4 94 88 55 00
Fax: 33 (0)4 94 32 82 61

http://www.elitechgroup.com

