

Penicillinbindende protein (PBP2¹) – latexagglutinationstest

REF

DR0900A.....



DA

1. TILSIGTET BRUG

Denne test er en hurtig latexagglutinationsanalyse til detektering af PBP2² (også kaldet PBP2a)⁷ i isolationer af stafylokokkus som hjælp til at identificere methicillinresistente stafylokokkus aureus (MRSA) og methicillinresistente koagulase-negative stafylokokker.

2. TESTENS PRINCIPPER

Stafylokokker er en vigtig årsag verden over til nosokomielle infektioner og infektioner, som patienterne har pådraget sig uden for hospitalsmiljøet⁴. I mange institutioner er cirka 25 % til 50 % af *S. aureus*-stammer og 75 % af koagulase-negative stafylokokker (CoNS) resistente over for methicillin¹². MRSA vækker især bekymring på grund af den lethed, hvormed visse epidemiske stammer spredte sig og bosætter sig i svækkede patienter. Behandling af sensitive stammer med penicillinaseresistente penicillinpræparater (PRP) anbefales, eftersom betalactam-midler nemmere optages i kropsvæsker og -væv, forårsager færre komplikationer og ikke vælges til vancomycinresistente organismer. Pålidelig identifikation af methicillinresistens er derfor vigtig.

Stammer af *S. aureus* med reduceret modtagelighed over for PRP kategoriseres på følgende måde:

- iii(i) methicillinresistent *S. aureus* (MRSA), som danner det penicillinbindende protein PBP2¹ med lav affinitet, som er kodet af mecA-genet^{3,6}
- ii(ii) borderline methicillinresistent *S. aureus* (BORSA) anses normalt for at være skyld i overproduktion af type A - betalaktamase¹⁰
- (iii) stammer med modificerede PBP'er på grund af ændret penicillinbindende kapacitet eller overproduktion af PBP'er (MODSA)¹⁻². MODSA har sjældent været isoleret, og deres kliniske respons på behandling med betalaktam er ikke grundigt undersøgt. Til kliniske formål er tilstedeværelsen af PBP2¹, med få undtagelser, ansvarlig for methicillinresistens i behandlingen af infektioner med *S. aureus* og CoNS²⁻⁶.

Den methicillinresistente fænotype kan være yderst heterogen, hvilket gør det vanskeligt at detektere den ved hjælp af almindelige metoder til test af antimikrobiel tilbøjelighed, f.eks. MIC (Minimum Inhibitory Concentration, plade og agarskærm. Nøjagtigheden af disse metoder afhænger af størrelsen på inokulum, inkubationstiden og temperaturen, mediet, pH, saltkoncentrationen og andre faktorer^{8,9}. Desuden kræver disse dyrkningsmetoder 24 timers inkubation for at sikre nøjagtige resultater. CoNS danner ofte mindre mængder PBP2¹ og kræver induktion ved udsættelse for én af PRP'erne for at danne tilstrækkeligt meget produkt for at muliggøre detektering^{2,3,12}.

Registreringen af mecA-genet har været anset for at være den gyldne standard ved bestemmelse af methicillinresistens på grund af nøjagtigheden, men denne metode er tidskrævende og dyr at udføre¹⁻⁶. Oxoid PBP2¹-latextesten har den fordel, at PBP2¹-proteinet registreres direkte inden for et kort tidsrum og meget nemt. Den kan være endnu mere nøjagtig end registreringen af mecA-genet, eftersom falsk-positive resultater ikke forekommer i forbindelse med stammer, der har mecA, men ikke kan danne proteinproduktet af genet. Desuden registrerer analysen ikke stammer, som er kendetegnet ved overproduktion af enten betalaktamase eller PBP'er.

Oxoid PBP2¹-testen er tidligere blevet evalueret på verdensplan og fundet at være karakteriseret af høj følsomhed og specificitet^{4,5,11}.

Latexpartikler, som er gjort følsomme med et monoklonalt antistof mod PBP2¹, reagerer specifikt med methicillinresistente stafylokokker og forårsager agglutination, som er synligt med det blotte øje.

3. SÆTTETS KOMPONENTER

TEST LATEX	DR0901 Tester syntetiske latexpartikler, som er gjort følsomme med et monoklonalt antistof mod PBP2 ¹
CONTROL LATEX	DR0902 Kontrollerer syntetiske latexpartikler belagt med kaninantistof, der er gjort følsomt med et monoklonalt antistof fra den samme IgG-underklasse, som ikke reagerer med proteiner fra <i>S. aureus</i>
EXTRACTION REAGENT 1	DR0903 Ekstraktionsmiddel 1
EXTRACTION REAGENT 2	DR0904 Ekstraktionsmiddel 2
	Testkort Rørepinde Vejledning

4. PÅKRÆVEDE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Mikropipette og spidser (50µl)
- Mikrobiologiske løkker (5µl/1µl)]
- Kogende vandbad eller varmeblok
- Centrifuge (1500 x g)
- Mikrocentrifugerør (sikkerhedsåls)
- Velegnet desinfektionsmiddel til laboratorier

5. FORHOLDSREGLER

IVD

 Dette produkt er kun beregnet til in vitro diagnostisk brug.

Opvarmningstiden skal være tre minutter. Opvarmning i mere end fem minutter kan mindske følsomheden. Opvarmning i op til et minut kan medføre ikke-specifik agglutination. Når den supernatant, der skal bruges i testen, fjernes efter centrifugeringen, skal pipetten trækkes forsigtigt op for at undgå fast materiale i bunden af røret. Overførsel af fast materiale kan medføre ikke-specifik agglutination. Ryst latexmidlet godt før brug for at opnå en homogen opløsning.

Reagenser indeholder 0,095 % natriumazid som konserveringsmiddel. Natriumazid er giftig og kan reagere med bly- eller kobberrør og danne metalazider, som er eksplosive ved kontaktde-tonation. Opbohang af azid i rørsystemer kan forhindres ved at skylle med rigelige mængder vand umiddelbart efter bortskaffelse.

Eftersom prøvematerialer kan indeholde patogene organismer, skal de håndteres i overensstemmelse med hensigtsmæssige forholdsregler. Ekstraktionsproceduren kan slå bakterier ihjel. Derfor skal disse forholdsregler også overholdes ved håndtering af ekstrakten.

Ekstraktionsreagens 1 og 2 indeholder en mildt irriterende og en fortyndet syre. Undgå direkte kontakt ved at bære passende beskyttelsesudstyr. Hvis materialet kommer i kontakt med huden, slimhinder eller øjne, skal området omgående skylles med rigelige mængder vand.

6. OPBEVARING



 Sættet opbevares ved 2-8 °C. Ved denne temperatur bevarer reagenserne deres reaktionsevne indtil udløbsdatoen på æsken.

7. KONTROLPROCEDURER

Ved hver modtagelse af en ny leverance af sættet og hver uge derefter skal følgende kontrolprocedurer udføres.

- Positiv kontrol**
Brug en kendt MRSA-stamme, f.eks. ATCC® 43300 (Thermo Scientific Culti-Loops™ R4609022). Følg metoden i testproceduren. Kontrollér, at agglutination optræder inden for 3 minutter.

- Negativ kontrol**
Brug en kendt stamme af MSSA (methicillinsensitiv stafylokok-aureus), f.eks. ATCC® 25923 eller ATCC® 29213 (Thermo Scientific Culti-Loops® R4607010 eller R4607011). Følg metoden i testproceduren. Kontrollér, at der ikke forekommer agglutination inden for 3 minutter. Benyt ikke testen, hvis reaktionerne med kontrolorganismerne er ukorrekte.

- Sættene må ikke bruges efter udløbsdatoen.

8. VIGTIG BEMÆRKNING TIL PROCEDURE

Lad ikke reagenserne blive kontaminererede ved at lade dråbespidsen berøre prøven på reaktionskortet. Sørg for, at hætteerne slutter tæt efter brug for at forhindre, at reagenserne kontamineres og tørrer ud. Læg sættet i køleskab efter brug, og sørg for, at flaskerne opbevares i lodret position.

9. KLARGØRING AF KULTUR

Kolonier kan testes fra en af følgende dyrkningsvæsker:

Tryptone Soya-agar (Tryptic Soy Agar) med 5 % fåreblood (TSA-blod), Colombia-agar med 5 % fåreblood, Mueller-Hinton-agar. Det anbefales at anvende friske (18-24 timer) kulturer. Kulturer, som er 24-48 timer gamle, kan dog anvendes til testen for at opnå en tilstrækkelig vækst. De resultater, som er angivet i denne folder, blev opnået ved brug af disse medier som led i levering af data til North American Food and Drugs Administration. Arkiverede data viser, at testen også er velegnet til kolonier af *S. aureus* fra Tryptone Soya-agar og Colombia-agar med 5 % hesteblood, Iso-Sensitest-agar og DSTA. Disse medier anvendes i stor udstrækning i Europa, men ikke i Nordamerika, og derfor er de ikke anvendt i de forsøg, som resulterede i de data, der er vist i afsnittet Præstationskarakteristika.

Særlige krav:

PBP2¹-testen bør kun udføres på stafylokokarter (Gram-positive kokker). Der skal udføres en koagulaseprøve eller lignende for at fastslå, om isolatet er *S. aureus* eller en anden stafylokokart.

Klargøring af inokulum:

Ved *S. aureus* kan testen udføres på basis af korrekt isolerede kolonier på den primære isolationsplade, hvis der er tilstrækkelig vækst, eller på basis af en subkultur af isolatet. Det er ikke påvist, at andre mikroflora på pladen påvirker analysen. For koagulase-negative stafylokokker kræves der en induktion for at danne tilstrækkelig PBP2¹.

- Klargør en suppesuspension af organismen svarende til en 1 McFarland-standard, og stryg et lag på TSA med blod, Columbia Blood-agar eller Mueller-Hinton-agar. Alternativt kan du pøde agarpladen med mange kolonier og stryge opløsningen på i fire kvadranter.
- Placer en oxacillinplade (1µg/ml) på laget af organismer eller i hovedinokulumkvadranten.
- Inkuber ved 37 °C i mindst 24 timer, men ikke længere end 48 timer.

Forsigtig: For at undgå falsk-negative resultater bør testen ikke udføres, medmindre der er tilstrækkeligt inokulum til stede. Høst altid organismer tæt ved pladen.

10. TESTMETODE

Procedure for ekstraktion af PP2¹

- Tilsæt fire dråber ekstraktionsmiddel 1 i et mikrocentrifugerør.
- Der skal testes cirka 1,5 x 10⁹ (3-5µl) celler. Dette opnås ved at bruge en steril 5µl løkke til at fjerne tilstrækkelig vækstmateriale til at fylde den indvendige diameter på løkken. Alternativt kan der anvendes en steril 1µl løkke til at fjerne flere kolonier og skovle en løkkefuld op i en dyng på 1 mm, så løkkens udvendige diameter er dækket. Opslæm testkulturen i mikrocentrifugerøret. Ryst, hvis der er klumper i opløsningen. Opslæmningen skal være uklar.

- Placer røret i kogende vand eller en varmeblok (OVER 95 °C), og opvarm i tre minutter.
- Fjern mikrocentrifugerøret, og lad det køle ned til rumtemperatur.
- Tilsæt én dråbe ekstraktionsmiddel 2 i røret, og bland godt.
- Centrifuger ved 1500 x g i fem minutter (dvs. 3000 o/min. ved en rotationsradius på 15 cm eller 4500 o/min. ved en rotationsradius på 4,5 cm). Brug supernatanten til testen.

Procedure for latexagglutination

- For hver supernatant, der skal testes, skal du tegne en cirkel på testkortet for test med testlatex og en anden cirkel for test med kontrollatex.
- Bland latexreagenserne godt ved at ryste dem kraftigt for at gøre latexen ensartet inden hver brug, og tilsæt én dråbe testlatex eller kontrollatex på hver cirkel.
- Placer 50µl supernatant på testcirklen og kontrolcirklen. Pas på ikke at berøre kuglen. Bland latexen og supernatanten i hver cirkel omhyggeligt med en rørepind.
- Tag kortet op, og vip det op og ned i op til tre minutter, og kig efter agglutination under normal belysning. Registrer resultatet af testen og kontrolreaktioner.
- Bortskaf reaktionskortet forsvarligt i affaldsbeholderen til desinficerende midler eller inficeret materiale.

11. AFLÆSNING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Agglutination ses i forbindelse med testlatex, men ikke kontrollatex i løbet af 3 minutter	PBP2 ¹ -positiv (MRSA)
Ingen agglutination i nogen af latexreagenserne i løbet af 3 minutter	PBP2 ¹ -negativ (MSSA)
Agglutination ses i forbindelse med kontrollatex i løbet af 3 minutter	Ubestemmelig

Graden af agglutinationsreaktion

Negativ (-) = en homogen suspension af partikler uden synlige klumper
Svag positiv (+) = små men afgrænsede klumper mod en sløret baggrund
Stærk positiv (++) = store og små klumper mod en let sløret baggrund eller store klumper mod en meget klar baggrund.

NB: Nogle gange har negative reaktioner et let grynet udseende, eller reaktioner kan være trævede. I disse tilfælde skal graden af baggrundsklaring bruges til at fortolke resultatet. En uigennemsigtig baggrund angiver et negativt resultat, og en klar baggrund skal fortolkes som et positivt resultat.

12. BEGRÆNSNINGER

Ved vage resultater bør testen udføres igen med et frisk medium. Hvis resultatet af den nye test også er vagt, skal der anvendes andre metoder til at bestemme methicillinresistens. Falsk-negative resultater kan forekomme, hvis der ikke anvendes tilstrækkelig kultur til testen. I så fald skal testen gentages med tilstrækkelig kultur.

Ved sandt-positive resultater er reaktionerne normalt kraftige. Falsk-positive reaktioner forekommer sjældent og er normalt begrænset til svage reaktioner. Sådanne resultater kan kontrolleres ved at udføre testen igen med et frisk medium.

Modificeret *S. aureus* (MODSA) og borderline resistente stammer af *S. aureus* (BORSA) har ikke PBP2¹ og forventes ikke at reagere i denne analyse.

Nogle organismestammer kan have en lav methicillinresistens eller i sjældne tilfælde danne PBP2¹ i små mængder og give et falsk-negativt resultat.

På grund af begrænsninger i sensitiviteten og specificiteten for SLSI-tilbøjelighedstestmetoderne for koagulase-negative stafylokokker⁹, især for andre stammer end *Staphylococcus* epidermidis, kan resultaterne af PBP2¹-testen være i modstrid med resultaterne af en standardtilbøjelighedstest. Stammer med MIC'er på ≥0,5 µg/ml bør anses for at være methicillinresistente uanset PBP2¹-analyseresultatene.

13. PRÆSTATIONSKARAKTERISTIKA

- Latexagglutinationstesten af Oxoid penicillinbindende protein er evalueret i fire geografisk forskellige laboratorier med friske kliniske isolater af *Staphylococcus aureus*. 201 isolater blev testet med NCCLS-metoder og med Oxoid PBP2¹-testen fra hvert af de tre medier. Der blev fundet én svag falsk-positiv Oxoid latex-reaktion (negativ ved gentagelse) fra TSA med blod. Alle positive reaktioner var kraftige undtagen 3 svage (men positive) reaktioner fra Mueller-Hinton-agar. Latextestens følsomhed i forbindelse med registrering af MRSA på hvert medium var 100 %, specificiteten var 99 % for TSA med blod og 100 % for test fra alle andre medier.

Resultater af test af 201 friske kliniske isolater af *S. aureus* fra 4 laboratorier:

	MRSA	BORSA ^A	MSSA
Antal tests	68	3	130
Vækst på Oxacillin Salt Agar (NCCLS)	68	0	0
MIC ≥4µg/ml (NCCLS)	68	0	0
Positiv latex fra TSA-blod	68	0	1 (1) ^B
Positiv latex fra Columbia-blod	68	0	0
Positiv latex fra Mueller-Hinton	68 (3) ^B	0	0

^A MIC'er var 2µg/ml, og mecA var negativ.

^B Antal svage reaktioner er vist i parentes.

2. Test af udfordringsstammer af *S. aureus* i tre forskellige geografiske områder:
Tre laboratorier undersøgte hver et sæt tidligere indsamlede udfordringsstammer af *S. aureus* og sammenlignede resultaterne af PBP2⁺ med NCCLS-metoderne til bestemmelse af MRSA. I alt 724 stammer blev testet fra TSA med blod. Følsomheden for Oxoid PBP2⁺-testen var 98,5 %, og specificiteten var 100 %. Sensitiviteten for agarskærmen og MIC-metoderne var 98,7 % og 99,2 %, og specificiteterne var 90,0 % og 88,7 %. To stammer af MODSA blev desuden testet særskilt, og begge stammer gav et negativt resultat med latextesten.

3. Test af koagulase-negative stafylokokker
To laboratorier testede koagulase-negative stafylokokker for PBP2⁺ efter induktion med oxacillinplader. Det ene laboratorium testede 115 methicillinresistente stammer og 45 methicillinmodtagelige stammer, herunder 58 friske kliniske isolater. Følsomheden var 96,5 % for test fra TSA-blod og 95,6 % for Mueller-Hinton-agar. Specificiteten var 100 % fra TSA-blod og 98 % fra Mueller-Hinton-agar. Det var vanskeligere at opnå et godt inokulum med Mueller-Hinton-agar. Det andet laboratorium testede 212 methicillinresistente stammer og 203 methicillinmodtagelige stammer med en følsomhed på 99,5 % og en specificitet på 99,5 %, ved brug af kultur på Columbia-agar til inokulum.

4. Reproducerbarhed
Ti forskellige velkarakteriserede *S. aureus*-stammer (3 MRSA, 3 MSSA, 3 BORSA og 1 MODSA) blev sendt til tre geografisk forskellig laboratorier, og hver stamme blev sendt 5 gange ved hjælp af en kodet og blindet metode. Alle 150 testresultater stemte overens med de forventede resultater for 100 % reproducerbarhed. De tre mecA-positive stammer var positive, hver gang de blev testet (45/45 tests). De tre MSSA- og de tre BORSA-stammer gav negative resultater, hver gang testen blev udført (90/90 tests). MODSA-stammerne havde en MIC på 16µg/ml for oxacillin og gav som forventet et negativt resultat i Oxoidlatextesten, hver gang testen blev udført (15/15 tests).

14. REFERENCES

1. Bignardi G.E., Woodford N., Chapman A. et al (1996). J. Antimicrobiol. Chemother., 37:53-63.

2. Chambers H.F. (1997). Clin. Microbiol. Rev., 10:781-791.

3. Gerberding J.L., Miick C., Liu H.H. et al (1991). Antimicrob. Agents Chemother., 35:2574-2579.

4. Hussain Z., Stoakes L., Garrow S. et al (2000). J. Clin. Microbiol., 38:2051-2054.

5. Louie L., Matsumura S.O., Choi E. et al (2000). J. Clin. Microbiol., 38:2170-2173.

6. Murakami K., Minamide W., Wada K. et al (1991). J. Clin. Microbiol., 29:2240-2244.

7. Nakatomi Y. og Sugiyama J. (1998). Microbiol. Immunol., 42:739-743.

8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000 Approved Standard Fifth Edition (M7-A5)). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

9. Tenover F.C., Jones R.N., Swenson J.M. et al (1999). J. Clin. Microbiol., 37:4051-4058.

10. Thornsbury C. og McDougal L. (1983). J. Clin. Microbiol., 18:1084-1091.

11. Yamazumi T., Marshall S.A., Wilke W.W. et al (2001). J. Clin. Microbiol., 39:53-56.

12. York M.K., Gibbs L., Chehab F. et al (1996). J. Clin. Microbiol., 34:249-253.

15. SYMBOLTEKST

	Katalognummer
	In Vitro medicinsk diagnostisk enhed
	Se brugervejledningen (Instructions for Use – IFU)
	Temperaturgrænser (opbevaringstemp.)
	Tilstrækkeligt indhold til <N> test
	Batchkode (partinummer)
	Skal anvendes inden (udløbsdato)
	Fremstillet af

 ATCC Licensed Derivative Emblem™,
ATCC Licensed Derivative word mark® og ATCC-katalogmærker er varemærker tilhørende ATCC. Oxoid Limited. har licens til at bruge disse varemærker og sælge produkter, der er udledt af ATCC®-kulturer.


IFU X6555C, revideret oktober 2015 Trykt i Storbritannien

 Oxoid Limited,
Wade Road,
Basingstoke,
Hampshire, RG24 8PW
Storbritannien

Kontakt din lokale forhandler for at få teknisk hjælp.