

Penicillinbindande protein (PBP2¹)

Latexagglutinationstest

REF

DR0900A.....



SV

1. AVSEDD ANVÄNDNING

Detta är ett snabbt latexagglutinationstest som detekterar PBP2¹ (kallas även PBP2a)⁷ i stafylokockisolater som hjälp vid identifiering av meticillinresistenta gula stafylokocker (MRSA eller *S. aureus*) och meticillinresistenta koagulasnegativa stafylokocker.

2. TESTPRINCIPER

Stafylokocker är den främsta orsaken till nosokomiala och omgivningsburna infektioner i hela världen⁷. Hos många institutioner är cirka 25–50 % av alla *S. aureus*-strängar och 75 % av alla koagulasnegativa stafylokocker (CoNS) meticillinresistenta¹². MRSA är särskilt oroande efter vissa epidemiska strängar enkelt sprider sig och koloniserar försvagade patienter. Behandlingar av känsliga strängar med penicillinaseresistenta penicilliner (PRP) rekommenderas, eftersom betalaktampreparat absorberas lättare av kroppsvätskor och vävnader, orsakar färre biverkningar. De selekterar inte vankomycinresistenta organismer. Därför är tillförlitlig identifiering av meticillinresistens viktig.

Strängar med *S. aureus* med minskad benägenhet till PRP kategoriseras enligt följande:

- iii(i) meticillinresistenta *S. aureus* (MRSA) som skapar lågaffinitets-penicillinbindande protein PBP2¹, kodas med mecA-genen^{3,6}
- ii(ii) borderline meticillinresistenta *S. aureus* (BORSA), anses allmänt uppstå på grund av hyperproduktion av typ A betalaktamas¹⁰
- (iii) strängar med modifierade PBP på grund av ändrad penicillinbindande kapacitet eller hyperproduktion av PBP (MODSA)^{7,12}. MODSA har endast isolerats ett fåtal gånger och deras kliniska respons vid betalaktambehandling har inte studerats helt. Det är därför som, med ett fåtal undantag, förekomsten av PBP2¹ är orsaken till meticillinresistens vid behandling av infektioner med *S. aureus* och CoNS^{2,7}.

Den meticillinresistenta fenotypen kan vara mycket heterogen, vilket gör det svårt att upptäcka den med konventionella testmetoder för antimikrobiell benägenhet, till exempel Minimum Inhibitory Concentration (MIC), disk- och agartest. Precisionen hos den här sortens metoder beror på storleken på inokulum, inkubationstiden och temperaturen, mediet, PH-värdet, saltkoncentrationen och andra faktorer^{8,9}. Dessutom kräver dessa odlingsmetoder 24 timmars inkubation för korrekt resultat. CoNS ger ofta lägre mängder PBP2¹ och behöver induktion via exponering för en av PRP:erna för att ge tillräcklig produkt för detektion^{2,3,12}.

Tack vare sin precision, har detektion av mecA-genen ansetts vara den bästa metoden för bestämning av meticillinresistens, men metoden är arbetskrävande och kotsam^{1,6}. Fördelen med Oxoid PBP2¹-latextest är omedelbar detektion av PBP2¹-protein inom kort tid med minimal arbetsinsats. Metoden kan ha ännu högre precision än detektion av mecA-genen, eftersom falska positiva resultat inte uppstår i strängar med mecA men som inte kan producera genens proteinprodukt. Dessutom upptäcker inte testet strängar som är hyperproducenter av betalaktamas eller PBP.

Oxoid PBP2¹-testet har utvärderats över hela världen och utmärkt sig med hög känslighet och specificitet^{4,5,11}.

Latexpartiklar som har sensitiviserats med monoklonala antikroppar mot PBP2¹ reagerar specifikt med meticillinresistenta stafylokocker och orsakar en agglutination som kan ses med blotta ögat.

3. SATSENS KOMPONENTER

TEST LATEX	DR0901 Testpartiklar av syntetisk latex som har sensitiviserats mot PBP2 ¹ med en monoklonal antikropp.
CONTROL LATEX	DR0902 Kontrollpartiklar av syntetisk latex med kaninantikropp, sensitiviserat med monoklonal antikropp från samma IgG-undergrupp, som inte visar reaktivitet med <i>S. aureus</i> -protein
EXTRACTION REAGENT 1	DR0903 Extraktionsreagens 1
EXTRACTION REAGENT 2	DR0904 Extraktionsreagens 2
	Testkort Blandningsstavar Bruksanvisning

4. ERFORDERLIGT MATERIAL SOM EJ MEDFÖLIER

- Mikropipett och spetsar (50 µl)
- Inokulationsögla (5µl/1µl)
- Kokande vattenbad eller värmeblock
- Centrifug (1500 x g)
- Mikrocentrifugrör (säkerhetsläs)
- Lämpligt laboratoriedesinficeringsmedel

5. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

IVD

 Endast för in vitro-diagnostik.

Uppvärmningstiden bör vara tre minuter. Längre uppvärmning än fem minuter kan leda till försämrad känslighet. Kortare uppvärmning än en minut kan orsaka ospecifik agglutination. När supernatanten avlägsnas för användning i test efter centrifugering kan pipetten avlägsnas försiktigt för att undvika fasta ämnen på provrörets botten. Medföljande fasta ämnen kan leda till ospecifik agglutination. Skaka latexreagenserna ordentligt så att de är homogent upplösta före användning.

Reagenserna innehåller 0,095% natriumazid som konserveringsmedel. Natriumazid är giftigt och kan reagera med bly- eller kopparrör så att explosiva metallazider kan uppstå. Spola med rikliga mängder vatten vid bortförande av avfall för att undvika azidbildning i vattenledningar.

Hantera provmaterialen med lämpliga säkerhetsrutiner, då de kan innehålla patogena organismer. Extraktionen dödar inte nödvändigtvis alla bakterier. Därför måste extraktet hanteras enligt samma rutiner.

Extraktionsreagenserna 1 och 2 innehåller en svag syra och ett mildt hudirriterande ämne. Undvik direktkontakt genom att använda lämplig skyddsutrustning. Spola omedelbart med rikliga mängder vatten om materialet kommer i kontakt med hud, slemhinnor eller ögon.

6. FÖRVARING



 Förvara satsen vid 2–8 °C. Vid dessa förhållanden förblir reagenserna reaktiva tills utgångsdatumet på förpackningen.

7. KONTROLLRUTINER

Följande kontrollrutiner måste utföras för varje nytt parti av satsen samt en gång i veckan därefter.

1. Positiv kontroll
Använd en känd MRSA-sträng, till exempel ATCC[®] 43300 (Thermo Scientific Culti-Loops[™] R4609022). Följ metoden som anges i testrutinen. Kontrollera att agglutination uppstår inom 3 minuter.

2. Negativ kontroll
Använd en känd meticillinkänslig gul stafylokocksträng (MSSA), till exempel ATCC[®] 25923 eller ATCC[®] 29213, (Thermo Scientific Culti-Loops[®] R4607010 eller R4607011). Följ metoden som anges i testrutinen. Kontrollera att ingen agglutination uppstår inom 3 minuter. Använd inte testet om reaktionerna med kontrollorganismerna är felaktiga.

3. Använd inte satserna efter deras utgångsdatum.

8. VIKTIG INFORMATION OM METODER

Undvik att reagenserna kontamineras genom att se till att droppipetten inte vidrör provet på reaktionskortet. Kontrollera att korkarna sitter säkert efter användning, så att proverna inte torkar eller kontamineras. Ställ tillbaka satsen i kylförvaring efter användning och kontrollera att kolvarna står lodrätt.

9. FÖRBEDNING AV ODLING

Kolonierna kan testas från nedanstående odlingsmedier:

Tryptone Soya Agar (tryptisk soyaagar) med 5 % färbod (TSA-blod), Columbia Agar med 5 % färbod, Mueller-Hinton Agar. Vi rekommenderar att färska (18–24 h) kulturer används. Kulturer som är 24–48 timmar gamla kan användas om det är nödvändigt för att uppnå tillräcklig odling. Prestandakaraktistikan i det här dokumentet skapades med dessa medier i samband med anmälan till North American Food and Drugs Administration. Testdata visar att testet även är effektivt med *S. aureus*-kolonier från Tryptone Soya Agar och Columbia Agar med 5 % hästblod, Iso-Sensitest Agar och DSTA. Dessa medier är vanligare i Europa än i Nordamerika, vilket är anledningen till att de inte användes i undersökningarna som skapade datan i avdelningen Prestandaegenskaper.

Särskilda krav:

PBP2¹-test bör endast utföras på stafylokockarter (Grampositiva kocker). Utför ett koagulastest eller motsvarande för att avgöra om isolaten är *S. aureus* eller någon annan stafylokockart.

Förberedelse av inokulum:

S. aureus kan testas på välisolerade kolonier på den primära isoleringsplattan om odlingen är tillräckligt utvecklad, eller från en subkultur av isolatet. Övriga mikrobiomer på plattan har inte visats störa testet. En induktion är nödvändig för koagulasnegativa stafylokocker för att de ska producera tillräckliga mängder PBP2¹.

1. Förbered en lösning med organismen som motsvarar 1 McFarland-standard och stryk på ett TSA-skikt med blod, Columbia Agar eller Mueller-Hinton Agar. Alternativt, inokulera blodplattan med flera kolonier och påstryk fyra kvadranter.
2. Placera en oxacillindisk (1 µg/ml) på organismskiktet eller på den primära inokulumkvadranten.
3. Inkubera vid 37 °C i minst 24 timmar, men inte längre än 48 timmar.

Observera: Utför inte testet om odlingen inte har utvecklats tillräckligt. Annars kan falska negativa resultat uppstå. Hämta alltid organismen nära disken.

10. TESTMETOD

PBP2¹ extraktionsmetod

1. Tillsätt fyra droppar extraktionsreagens 1 i ett mikrocentrifugrör.
2. Cirka 1,5 x 10⁹ (3-5 µl) celler bör testas. Du kan göra detta med en steril 5 µl-ögla så att en tillräcklig mängd odling avlägsnas och fyller öglans inre omkrets. Det går även att använda en steril 1 µl-ögla till att avlägsna flera kolonier och avlägsna en rågad 1 mm ögla som täcker öglans yttre omkrets. Upplös testkulturen i mikrocentrifugröret. Vortex-blanda om klumpar bildas. Lösningen bör vara synbart grumlig.

3. Ställ provröret i kokande vatten eller i ett värmeblock (ÖVER 95 °C) och värm i tre minuter.
4. Avlägsna mikrocentrifugröret och låt svalna i rumstemperatur.
5. Tillsätt en droppe extraktionsreagens 2 i provröret och blanda väl.
6. Centrifugera vid 1500 x g i fem minuter (till exempel 3 000 varv/minut vid 15 cm rotationsradie eller 4 500 varv/minut vid 4,5 cm rotationsradie). Använd den supernatanten till testet.

Metod för latexagglutination

1. Märk en cirkel på testkortet med för test med Test Latex och ytterligare en för test med Kontrollatex för varje supernatant som ska testas.
2. Blanda latexreagenserna väl genom att skaka dem grundligt, så att latexen är jämn före varje användning. Tillsätt en droppe Testlatex eller Kontrollatex i varje märkt cirkel.
3. Tillsätt 50µl supernatant i testcirkeln och kontrollcirkeln. Var noga med att undvika provdroppen. Blanda latex och supernatant noggrant i varje cirkel med en blandningsstav.
4. Lyfta och vaggla kortet i tre minuter. Leta efter agglutination under vanliga ljusförhållanden. Anteckna resultaten för testen och kontrollerna.
5. Bortskaffa reaktionskortet enligt säkra rutiner för bortskaffning av smittfarligt avfall.

11. UTTYDA OCH TOLKA RESULTAT

Agglutination visas för Testlatex men inte Kontrollatex inom 3 minuter	PBP2 ¹ -positiv (MRSA)
Ingen agglutination i någon latexreagens inom 3 minuter	PBP2 ¹ -negativ (MSSA)
Agglutination visas för Kontrollatex inom 3 minuter	Obestämbär

Styrkan hos agglutinationen

Negativ (-) = en homogen partikelsuspension utan synbar klumpbildning
Svag positiv (+) = små, men tydliga klumpar mot grumlig bakgrund
Stark positiv (+) = stora och små klumpar mot något grumlig bakgrund eller stora klumpar mot en mycket tydlig bakgrund.

Obs: Ibland kan negativa reaktioner vara korniga eller reaktioner vara trådgiga. I dessa fall kan bakgrundens grumlighet användas till att tolka resultaten. En mycket grumlig bakgrund påvisar ett negativt resultat och en genomskinlig bakgrund ska tokas som ett positivt resultat.

12. BEGRÄNSNINGAR

Obestämbara resultat bör testas på nytt med ett färskt extrakt. Om resultatet är obestämbart även vid det andra testet måste meticillinresistensen bestämmas med andra metoder. Falsa negativa resultat kan uppstå om en för liten odling används för testet. I dessa fall bör testet upprepas med mer odling.

Verkligt positiva resultat har vanligtvis starka reaktioner. Falsa positiva reaktioner har uppstått vid ett fåtal fall, men är vanligtvis begränsade till svaga reaktioner. Dessa resultat kan verifieras genom att testa på nytt med en färsk odling.

Modifierad *S. aureus* (MODSA) och borderline resistent *S. aureus*-strängar (BORSA) har inte PBP2¹ och förväntas inte reagera i detta test.

Vissa organismsträngar har låga meticillinresistensnivåer eller, i sällsynta fall, producerar PBP2¹ i små mängder, vilket ger ett falskt negativt resultat.

På grund av känslighets- och specificitetsbegränsningar hos CLSI-benägenhetstestmetoderna för koagulasnegativa stafylokocker⁹, i synnerhet för andra strängar än *Staphylococcus epidermidis*, kan resultaten med PBP2¹-testet avvika från resultaten hos ett standardbenägenhetstest. Strängar med MIC på ≥ 0,5 µg/ml bör anses meticillinresistenta, oberoende av PBP2¹-testresultaten.

13. PRESTANDAKARAKTERISTIKA

1. Oxoids latexagglutinationstest för penicillinbindande protein har utvärderats i fyra geografiskt spridda laboratorier med färsk kliniska isolater av gula stafylokocker. 201 isolater testades med NCCLS metoder och med Oxoid PBP2¹-testet (negativ för alla tre medier. En svag falsk positiv Oxoid Latex-reaktion (negativ vid upprepning) påträffades från TSA med blod. Samtliga positiva reaktioner var starka, utom 3 svaga (men positiva) reaktioner från Mueller-Hinton Agar. Känsligheten i Latex-testet vid bestämning av MRSA för varje medium var 100 %, specificiteten var 99 % för TSA med blod och 100 % för test från samtliga andra medier.

Resultat från test med 201 färska kliniska isolat av *S. aureus* från 4 laboratorier:

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

^A MIC var 2µg/ml och mecA var negativt.

^B Antal svaga reaktioner visas inom parentes.

2. Test av utmanande strängar av *S. aureus* i tre spridda geografiska områden:

Tre laboratorier undersökte en uppsättning med tidigare insamlade strängar *S. aureus* och jämförde resultat från PBP2/ med NCCLS-metoder för MRSA-bestämning. Sammanlagt 724 strängar testades från TSA med blod. Känsligheten för Oxoid PBP2'-testet var 98,5 % och specificiteten var 100%. Känsligheten för agartestet och MIC-metoderna var 98,7 % och 99,2 %, och specificiteten var 90,0 % respektive 88,7 %. Två MODSA-strängar testades separat. Båda strängarna gav ett negativt resultat med Latex-testet.

3. Test med koagulasnegativa stafylokocker

Två laboratorier testade koagulasnegativa stafylokocker för PBP2/ efter induktion med oxacillindiskar. Ett laboratorium testade 115 meticillinresistenta strängar och 45 meticillinbenägna strängar, inklusive 58 färska kliniska isolat. Känsligheten var 96,5 % för test med TSA-blod och 95,6 % för Mueller-Hinton Agar. Specificiteten var 100 % för test med TSA-blod och 98 % för Mueller-Hinton Agar. Det var svårare att uppnå ett bra inokulum med Mueller-Hinton Agar. Det andra laboratoriet testade 212 meticillinresistenta strängar och 203 meticillinbenägna strängar med en känslighet på 99,5 % och specificitet på 99,5 % med en odling på Columbia Agar för inokulum.

4. Reproducerbarhet

Tio olika välbestämda *S. aureus*-strängar (3 MRSA, 3 MSSA, 3 BORSA och 1 MODSA) skickades till tre geografiskt spridda laboratorier där varje sträng testades 5 gånger med kodad och blindad metod. Samtliga 150 testresultat överensstämde med de förväntade resultaten för 100 % reproducerbarhet. De tre mecA-positiva strängarna var positiva vid varje test (45/45 test). De tre MSSA-strängarna och de tre BORSA-strängarna gav negativa resultat vid varje test (90/90 test). MODSA-strängen hade ett MIC på 16µg/ml för oxacillin och gav ett negativt resultat i Oxoid Latex-testet vid varje test (15/15 test), i överensstämmelse med förväntningarna.

14. REFERENSER

1. Bignardi G.E., Woodford N., Chapman A., m. fl. (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., m. fl. (1991). Antimicrob. Agents Chemother., 35:2574-2579.

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

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

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

7. Nakatomi Y., and 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., m. fl. (1999). J. Clin. Microbiol., 37:4051-4058.

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

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

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

15. SYMBOLFÖRKLARING

	Katalognummer
	Medicinsk enhet för <i>in Vitro</i> -diagnostik
	Läs bruksanvisningen
	Temperaturbegränsningar
	Innehåller tillräckligt för <N> test
	Partikod
	Bäst före (utgångsdatum)
	Tillverkare

 ATCC Licensed Derivative Emblem™, ATCC Licensed Derivative word mark® och ATCC-katalogmärket är varumärken som tillhör ATCC. Oxoid Limited. har licens för att använda dessa varumärken och sälja produkter som har derivats från ATCC®-kulturer.



IFU X6555C, omarbetad oktober 2015 Tryck i Storbritannien

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

Kontakta din lokala återförsäljare för teknisk support.