

Brugsvejledning NEO-SENSITABS™

Revision
Dato
Sprog

DBV0004G
06.05.2024
Dansk/Svenska

NEO-SENSITABS™

Resistensbestemmelse

Producent

ROSCO Diagnostica ApS, Stensmosevej 24A, DK-2620 Albertslund, Denmark, www.rosco-diagnostica.com

Anvendelse

Neo-Sensitabs er tabletter brugt/som anvendes til semikvantitativ *in-vitro* resistensbestemmelse vha./ med hjælp af disk/tablet agardiffusionsmetoden for hurtigtvoksende/snabtvoksende ikke krævende/næringskrævende mikroorganismer, bestemte krævende/næringskrævende patogene bakterier og gærsvampe/jästsvampar.

Princippet i metoden

Neo-Sensitabs indeholdende antimikrobielle stoffer/ämnen lægges på et egnet/lämpligt agarmedie, som er blevet tilsået med renkultur af et klinisk isolat.

Ikke krævende/næringskrævende organismer, som *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. og *Vibrio cholera*, kan testes på et medie uden blod eller andre vækstfaktorer, f.eks. Mueller Hinton II agar (MH). *Haemophilus influenzae* kræver Haemophilus test medie (HTM), *Neisseria gonorrhoeae* GC agar base (GCA), *Streptococcus pneumoniae* og andre streptokokker kræver Mueller Hinton II agar + 5 % blod (MH+B). Gærsvampe/ Jästsvampar kan testes på RPMI-1640 agar eller modificeret shadomy agar, og anaerobe organismer kræver specielle procedurer.^{1,2}

Efter inkubation måles/mätes diameteren på hæmningszonen omkring tabletten og sammenholdes/jämföres med zonerne angivet i interpretationstabellen for det pågældende/ifrågavarande antibiotika. Herved identificeres de stoffer/ämnen, der er mest velegnede/lämpliga til antimikrobiel terapi.

Neo-Sensitabs er standardiseret efter CLSI (NCCLS) og EUCAST rekommandationer og disse anbefalede/rekommenderade MIC-breakpoint følges.^{3,4} Neo-Sensitabs er ydermere/dessutom justeret til MIC-breakpoints anbefalet/rekommenderade af forskellige/olika standardiseringsgrupper i Frankrig og Storbritannien. Tabeller over aflæsning af hæmningszoner for de forskellige/olika lande kan findes i Neo-Sensitabs User's Guide.¹

Reagenter

Neo-Sensitabs er 9 mm tabletter indeholdende krystallinsk antibiotika blandet med granulat. Tabletterne er printet på begge sider med en unik 5-bogstavskode og er pakket i rør med 50 tabletter. Rørene kan bruges/användas i en dispenser. Dispenserne kan lægge 7, 9, 12 eller 16 Neo-Sensitabs ad gangen. Tabletterne klæber/klibbar fast til agaren, hvorfor det ikke er nødvendigt med et ekstra tryk på tabletten.

Instruks for opbevaring/förvaring

- 1) Ved modtagelse checkes/kontrolleras temperatursymbolet på den ydre emballage. Neo-Sensitabs med symbolet 2 °C til 8 °C skal opbevares/förvaras i køleskab/kylskåp, og Neo-Sensitabs med en øvre temperaturgrænse på 25 °C på den ydre emballage skal opbevares/förvaras ved stuetemperatur/rumtemperatur.

- 2) Hvis/Om Neo-Sensitabs opbevares/förvaras i køleskab/kylskåp, skal røret stå ved stuetemperatur/rumtemperatur i 30-60 minutter, inden det åbnes/öppnas, for at undgå kondensvand på tabletterne.
- 3) Neo-Sensitabs med temperatursymbolet 2 °C til 8 °C kan stå uåbnet i 2 måneder ved stuetemperatur/rumtemperatur uden essentielt/väsentlig tab/förlust af aktivitet.
- 4) Rør placeret i en dispenser skal bruges/ användas inden 2 måneder for Neo-Sensitabs med temperatursymbolet 2 °C til 8 °C og inden 12 måneder for Neo-Sensitabs med temperatursymbolet under 25 °C.

Udløbsdatoen/Utgångsdatum på rørene er kun/enbart gældende for produkter, der bliver opbevaret/förvarade ved korrekt temperatur.

Sikkerhedsforanstaltninger

Følg anbefalingerne/anvisningarna for brug/ användning. Neo-Sensitabs ydeevne/prestationsförmåga/hæmningszone afhænger/beror ikke kun/enbart af tabletens styrke, men også af korrekt inokulum, agarmedie, inkubationstemperatur, korrekt aflæsning af hæmningszonen, opbevaringen/förvaring af Neo-Sensitabs og brugen af kontrolstammer.⁵

Prøvemateriale

Prøven/Provet skal være typisk for infektionsstedet, dvs. alle bestræbelser/ansträngningar for at opnå en så repræsentativ prøve af den relevante patogene bakterie skal forsøges. Se brugsanvisningen, som beskriver fremstillingen af inokulum.

PROCEDURE

Materialer stillet til rådighed/förfogande: Neo-Sensitabs med kode.

Materialer som er nødvendige, men ikke stillet til rådighed/förfogande: Medie, reagenter, kvalitetskontrolstammer og laboratorieudstyr/laboratorieutrustning nødvendigt for at kunne udføre en agardiffusions resistensbestemmelse. Forbered en McFarland 0,5 stamopløsning ved at tilføje/tillsätta 0,5 ml af 0,048 M BaCl₂ (1,175 % vægt/vol. BaCl₂·2H₂O) til 99,5 ml af 0,18 M H₂SO₄ (1% (vol./vol.)) ved konstant omrystning/omskakning. Alternativt kan en færdiglavet/færdiggjord standard indkøbes. Verificering kan udføres ved at bruge/ använda et spektrofotometer med en 1 cm lyskilde; ved/vid bølgelængde/våglängden 625 nm skal absorbansen være 0,08-0,10.^{3,4}

I. Brugsanvisning/bakterier

I.1. Inokulum standardisering i overensstemmelse med CLSI (NCCLS)³ and EUCAST

Den direkte kolonisuspensions metode:

Ved/Genom at suspendere adskillige/åtskilliga ensartede/likartade kolonier fra en 18-24 timer gammel ikke selektiv agarplade i 4-5 ml 0,9 % NaCl opløsning, opnås en turbiditet svarende til BaSO₄ standarden (0,5 McFarland). Denne metode er ækvivalent til standard CLSI (NCCLS) metoden og kræver mindre tid. Den anbefales/rekommenderas til testning af krævende/næringskrävande organismer som *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, pneumokokker/streptokokker og ved testning af staphylokokker for mulig/möjlig methicillin- eller oxacillinresistens.³

I.2. Inokulation

- a) Inden 15 minutter dyppes/doppas en steril bomuldsvatpind/bomullspinne i den justerede suspension. Overskydende/Överskotts væske/vätska fjernes/avlägsnas fra vatpinden/bomullspinnen ved/genom at trykke den ind mod siden af røret.
- b) Inden 15 minutter bruges vatpinden/bomullspinnen til at inokulere pladen.

- c) Inokuler en tør/torr agarplade ved/genom at køre/stryka vatpinden/bomullspinnen over hele pladens overflade/yta. Tillad overfladen/ytan at tørre/torka ca. 3-5 minutter eller maksimalt 15 minutter, inden Neo-Sensitabs lægges på agaren.
- d) Vælg hensigtsmæssige/læmplige antimikrobielle stoffer/tabletter f.eks. som foreslået af CLSI (NCCLS).⁶ Brug ikke mere end 9 Neo-Sensitabs pr. 150 mm plade eller 4 Neo-Sensitabs pr. 100 mm plade, når der testes for *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, og *Streptococcus* spp.

I.3. Inkubation og pladeaflesning

- a) Inden 15 minutter placeres pladen på hovedet i et varmeskab ved 35 °C. *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* og andre streptokokker skal inkuberes i 5 % CO₂ atmosfære.
- b) Undersøg pladen efter 16-18 timers inkubation (20-24 timer for *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* og andre streptokokker). Ved detektion af methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) og vancomycin-resistente *Enterococcus* spp. anbefales/rekommenderas inkubering i 24 timer. Pladen holdes op mod lyset og undersøges for resistente methicillin eller vancomycin mikrokolonier i hæmningszonen. Al vækst inden for hæmningszonen giver en mistanke om methicillin- eller vancomycin-resistens. Kanten af hæmningszonen indeholder et stort antal små kolonier, når der bruges Trimethoprim, Sulphonamider og Trimethoprim + Sulfamethoxazole tabletter. I disse tilfælde måles/måtes hæmningszonen op til kolonier af normal størrelse/storlek (ignorer den inderste zone og mål/måt den tydeligste zone). For yderligere detaljer læs User's Guide Neo-Sensitabs.¹
- c) Hæmningszonen måles/måtes pr. Øjemål/øgonmått og måles/måtes op til nærmeste hele millimeter.

II. Brugsanvisning/ svampe

II.1. Inokulumforberedelse

Et optimalt inokulum svarer/motsvarer lige netop/precis til konfluerende/sammanhängande vækst. For de fleste stammer opnås dette med ca. 5x10⁵CFU/ ml (McFarland 0,5 fortyndet 1:1 med saltvand). For *Candida krusei* bruges et inokulum svarende til McFarland 0,5, fortyndet/utspått 1:10 og for *Cryptococcus* spp. bruges et inokulum svarende til McFarland 1,0 ufortyndet/utspått.

II.2. Inokulation

- a) Pladerne tørres/torkas 20-25 minutter ved 35 °C før/före inokulation.
- b) 0,5 ml (9 cm plade) eller 1,0 ml (14 cm plade) af det forberedte inokulum hældes på agarpladen og flodning foretages. Overskydende/Överskotts væske/vätska fjernes/avlågsnas efterfølgende/omedelbart med pipette.
- c) Den åbne plade tørres/torkas ved 35 °C i 10 minutter, og tabletterne placeres på agarpladen.

II.3. Inkubation og zoneaflesning

Inkubation ved 35 °C er mest passende for stammer isoleret fra systemiske infektioner. Zoneaflesning skal ske inden/inom for 18-24 timer. For nogle/några stammer er væksten ikke synlig efter 24 timer, og disse inkuberes i yderligere 24 timer eller mere. *Cryptococcus* spp. inkuberes ved 30 °C i 42-48 timer.

II.4. Måling/Måtning af hæmningszonen

For polyener (Amphotericin B og Nystatin) måles/måtes den klare zone, hvor ingen synlig vækst kan ses indeni. Kolonier inde i zonen skal betragtes som resistente mutanter. For azolerne dvs. imidazoler og terbinafine skal hæmningszonen måles/måtes op til kolonier af fuld størrelse. Der er ofte en zone med partielt inhiberede kolonier tættere/nära på tabletten end hæmningszonen, disse ignoreres. Disse små eller mellemstore kolonier er ikke resistente mutanter. Neo-Sensitabs med imidazoler/azoler indeholder doxycycline for at forbedre kvaliteten af zoneaflesningen. For Fluorocytosin måles/måtes zonen op til kolonier af almindelig/normal

størrelse/storlek. Individuelle kolonier inden i hæmningszonen er normalt resistente mutanter og skal isoleres og testes igen.

INTERN KVALITETSKONTROL

Kvalitetskontrol med brug af ATCC stammer anbefales/rekommenderas udført mindst en gang om/per ugen/vecka, og hver gang en ny batch af agar tages i brug. De målte/uppmätta zoner skal være inden for de angivne kontrolzonegrænser for den pågældende/ifrågavarande kombination af Neo-Sensitabs og kontrolstamme. Kontrolzonegrænser er angivet i tabellen og indikerer en korrekt udførelse af hele proceduren.^{1,3}

RESULTATER

Sammenlign/Jämför den målte/uppmätta hæmningszone med dem i tabellen. Resultatet for en given eller for en specifik organisme rapporteres som følsom/kænslig (S), intermediær, (I) eller resistens (R)³:

Følsom/Kænslig (S): Infektionen forårsaget af den testede stamme må forventes at kunne behandles med almindelig/normal dosering af det pågældende/ifrågavarande antibiotika. Hvis/Om der kun/enbart er et "S" kriterium: For nogle bakterie/antibiotika kombinationer er der ikke beskrevet nogen resistente stammer, og derfor er der ikke defineret andre kategorier end "S". Hvis resultatet bliver et andet end "S", skal stammen identificeres, og resultatet bekræftes igen. Efterfølgende anbefales det at sende isolatet til et referencelaboratorium for yderligere testning.

Intermediær (I): Klinisk effekt kan kun/enbart forventes, hvis det pågældende/ifrågavarande antibiotikum koncentrerer på infektionsstedet (f.eks. i urin) eller når høje doser kan benyttes (f.eks. beta-lactam antibiotika). Den intermediære kategori fungerer endvidere som en buffer zone og skal forhindre, at små ukontrollerede tekniske faktorer forårsager væsentlige uoverensstemmelser i fortolkningen. Derfor kan et intermediært resultat til tider være usikkert, og hvis alternative stoffer ikke er til rådighed, kan det være nødvendigt at udføre en MIC-bestemmelse.

Resistent (R): Det pågældende/ifrågavarande antibiotika kan ikke anbefales til behandling i disse tilfælde.

Screening og konfirmatorisk test for Extended-Spectrum Beta-Lactamaser (ESBL) og Carbapenemaser

Plasmid overførte beta-lactamaser forårsager resistens mod tredje-generations cefalosporiner og monobactamer (f.eks. aztreonam) og har været beskrevet i *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* og andre Enterobacteriaceae. Disse enzymer er klassificeret som extended-spectrum beta-lactamaser (ESBL) og Carbapenemaser, og de har forårsaget klinisk resistens mod monobactamer og bredspektrede cefalosporiner. Nogle af disse stammer vil vise hæmningszoner mindre end normale følsomme stammer, men større end standard breakpointet for visse bredspektrede cefalosporiner og aztreonam. Screening af disse stammer kan foretages ved at bruge passende ESBL-screening breakpoints. De fleste ESBL hæmmes af clavulansyre, tazobactam eller sulbactam og kan nemt findes vha. dobbelttablet synergitest metoden.⁶ Ceftazidime + Clavulanate og Cefepime + Clavulanate er meget nyttige til screening for ESBL. Mere information kan findes i Neo-Sensitabs User's Guide og Detection of resistance mechanisms (www.rosco.dk).¹ Alle ESBL-stammer skal rapporteres resistente over for alle penicilliner, cefalosporiner og aztreonam. Carbapenemase-producerende stammer bør rapporteres resistente overfor alle carbapenemer.

Methicillin-resistente staphylokokker

Screening for MRSA og methicillin (oxacillin) resistens i koagulase negative staphylokokker skal udføres med Oxacillin 1 µg og Cefoxitin. Hvis stammen er resistent, skal alle beta-lactam antibiotika rapporteres som resistente. Mere information kan findes i Neo-Sensitabs User's Guide.¹

Staphylococcus aureus med nedsat følsomhed/kænslighed overfor/mot vancomycin (hVISA, VISA (GISA) og VRSA)

Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus* (VRSA) påvises med Vancomycin 5 µg og 30 µg. *S. aureus* med nedsat vancomycin-følsomhed/kænslighed (hVISA og VISA(GISA)) kan ikke påvises med den angivne diffusionsmetode. Anvend prædiffusions-metode. Yderligere information kan findes i Neo-Sensitabs User's Guide og Detection of resistance mechanisms.¹

Vancomycin-resistente enterokokker (VRE)

Detektion af VRE ved diffusionsmetoden kræver:

- 1) Brug af Vancomycin 5 µg Neo-Sensitabs
- 2) Inkubation i 24 timer
- 3) Grundig undersøgelse af hæmningszonen

Følsomme/Känsliga stammer har en skarp kant omkring zonen, mens resistente har en mere diffus kant. Prædiffusions-metode med Neo-Sensitabs Vancomycin 30 µg giver gode resultater. Yderligere information kan findes i Neo-Sensitabs User's Guide.¹

Høj/Hög resistens mod aminoglycosider (High-level aminoglycoside resistance (HLR))

Ved høj resistens mod aminoglycosider hos enterokokker vil synergistisk effekt ikke kunne opnås ved kombination af penicillin eller glycopeptider med et aminoglykosid. Screening for gentamicin og streptomycin højrresistens anbefales/rekommenderas for enterokokker isoleret fra blod eller spinalvæsker. Høj styrke Neo-Sensitabs som Gentamicin 250 µg, Kanamycin 500 µg og Streptomycin 500 µg bruges til denne type screening.

BEGRÆNSNINGER FOR DIFFUSIONSMETODEN

Formålet/Syftet med at bruge/använda Neo-Sensitabs er at få hurtige/snabbe og præcise resistensbestemmelser. Acceptable resultater i forbindelse med kvalitetskontrol på kontrolstammer garanterer ikke præcise resultater med alle patientisolater. Hvis atypiske eller inkonsekvente resultater findes, skal ny testning og identifikation gennemføres. Før/Innan rapportering bør uventede resultater overvejes, og der skal tages stilling til, om isolatet skal sendes til et referencelaboratorium for yderligere testning.

Farlige misvisende resultater kan forekomme, når bestemte antibiotika bliver testet over for specifikke mikroorganismer.^{3,6} Resistensmekanismer i nogle/några arter er mere vanskelige at påvise end andre, og nogle viser måske/kanske aktivitet *in-vitro*, selvom/fast det pågældende/ifrågavarande antibiotikum ikke er klinisk effektivt. Disse kombinationer inkluderer følgende:

- Alle beta-lactam antibiotika (undtagen oxacillin, methicillin) mod methicillin-resistente staphylokokker
- Cefalosporiner, aminoglycosider (undtagen ved testning for høj resistens) clindamycin og trimethoprim + sulfamethoxazole mod enterokokker
- Første- og anden-generations cefalosporiner og aminoglycosider mod *Salmonella* spp. og *Shigella* spp.
- Cefalosporiner mod *Listeria* spp.
- Glycopeptider mod *S. aureus* med nedsat vancomycin-følsomhed/känslighet.
- Cephalosporiner og aztreonam mod ESBL-producerende *E. coli*, *K. pneumoniae* og *P. mirabilis*.

Rutinerapportering af resultater fra stammer isoleret fra spinalvæske kan være alvorligt misvisende for patienter i de følgende situationer:

- Antibiotika som kun/enbart gives peroralt
- Første- og anden-generations cefalosporiner (undtagen Cefuroxime natrium)
- Clindamycin
- Makrolider
- Tetracycliner
- Fluoroquinoloner

Nogle/Några antibiotika er forbundet med udvikling af resistens ved langvarig terapi. Som en konsekvens heraf kan oprindeligt/initialt følsomme stammer blive resistente nogle/några dage efter starten på behandlingen. Dette forekommer oftest i følgende tilfælde:

- *Enterobacter*, *Citrobacter*, og *Serratia* spp. med tredje-generations cefalosporiner
- *Pseudomonas aeruginosa* med de fleste antibiotika
- Staphylokokker med quinoloner

Grundlæggende har isolaterne *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Proteus* spp. (undtagen *P. mirabilis*), *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, generne til Group I beta-lactamase produktion. Der er derfor ingen nyttig information i påvisning af *in-vitro* induktion af dette enzym. I stedet skal der udføres gentagne/upprepade undersøgelser (hver 3-4 dag) fra den inficerede/infekterede patient, som er i behandling, for at opdage selektion af kloner, som producerer Group I beta-lactamase.

REFERENCER:

- 1) Neo-Sensitabs User's Guide. www.rosco-diagnostics.com
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard M11-A6. 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-S10. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard M31-A2. 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 5) Ericsson H.M. and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic susceptibility testing. Report of an international collaborative study. Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl. 217: 1-90.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S23. 23rd Informational Suppl. CLSI, Wayne, Pa., USA.