

BD BBL CHROMagar ESBL (Biplate)

AVSEDD ANVÄNDNING

BBL CHROMagar ESBL (Biplate) är ett selektivt kromogent screeningmedium för isolering av *Enterobacteriaceae* och vissa andra gramnegativa stavar som producerar betalaktamaser med utvidgat spektrum (Extended-Spectrum Beta Lactamases, ESBL). Lämpliga provtyper inkluderar rektala pinnprover och en rad andra kliniska prover (se **Provtyper**). Mediet möjliggör även identifiering av *E. coli* utan ytterligare bekräftande tester och detektion av organismgrupperna *Klebsiella-Enterobacter-Citrobacter-Serratia* och *Proteus-Morganella-Providencia* om isolaten är resistenta mot de antibiotika som mediet innehåller. Isolat som erhålls med detta medium måste bekräftas som ESBL-producerare genom ytterligare tester.

FÖRKLARING OCH PRINCIPER FÖR METODEN

Resistens mot bredspektrum-betalaktamer, inklusive tredje generationens cefalosporiner, medieras av en rad resistensmekanismer. Bland dessa är plasmidmedierad resistens på grund av betalaktamaser med utvidgat spektrum (ESBL) den viktigaste mekanismen eftersom den sprids epidemiskt på intensivvårdsavdelningar och i annan sjukhusmiljö. Stammar som producerar ESBL är vanligtvis känsliga för betalaktamaseinhibitorer (t.ex. klavulansyra), cefamyciner (t.ex. cefotixin) och karbapenemer.^{1,5} På senare tid har stammar som uppvisar resistens mot karbapenemer (karbapenemasproducerare) rapporterats, som (med undantag för ett fåtal OXA-48-producerare) uppvisar resistens även mot tredje generationens cefalosporiner.² Dessa typer av betalaktamasezymer har påträffats i *Klebsiella*, *Escherichia coli* och, även om det är mer sällsynt, i andra genera av *Enterobacteriaceae*.

BBL CHROMagar ESBL (Biplate) baseras på **BBL CHROMagar Orientation** som ursprungligen utvecklades av A. Rambach, CHROMagar, i Paris i Frankrike. BD har, under licensavtal, utvecklat denna formulering genom dra nytta av immateriell egendom som används vid tillverkningen av **BBL CHROMagar Orientation** preparerat plattmedium. Speciellt utvalda peptoner utgör näringskälla i **BBL CHROMagar Orientation-Medium**(mediet).

Kromogenblandningen består av artificiella substrat (kromogener) som frisätter olikfärgade föreningar när de bryts ned av specifika mikrobiella enzymer. Detta möjliggör direkt differentiering av vissa species, eller påvisning av vissa organismgrupper, med minimalt behov av bekräftande tester. Genom att olika färger utvecklas möjliggör det kromogena mediet i **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)** enkel detektion av blandkulturer av gramnegativa bakterier och identifiering av *E. coli* (rosa till ljuslila) utan ytterligare bekräftande tester och för detektion av *Klebsiella-Enterobacter-Citrobacter-Serratia* (blågröna till blåa) och *Proteus-Morganella-Providencia* (färglösa till bruna med bruna halos som sträcker sig in i mediet) och andra gramnegativa stavar (som uppträder i sin naturliga färg) om isolaten är resistenta mot de cefalosporiner med utvidgat spektrum som mediet innehåller.

BBL CHROMagar ESBL (Biplate) består av två medier, i en dubbelplatta. Medierna innehåller olika tredje generationens cefalosporiner i en lämplig koncentration för detektion av resistens, kombinerat med andra selektiva medel som hämmar den flora som naturligt finns i provet. Medium 2 har kompletterats med titandioxid för enkel visuell differentiering av de två medierna. Bägge medierna måste inokuleras med samma prov eller isolat. Gramnegativa bakterier som *Enterobacteriaceae* och vissa icke-fermenterare ger växt på mediet, om de är resistenta mot de antimikrobiella medel som mediet innehåller.

Med traditionella metoder måste prover som misstänks innehålla ESBL-producerare först inokuleras på standardiseringsmedier för att erhålla renkulturer. Efter inkubering måste resistensen bestämmas. Processen med isolering och resistensbestämning tar minst 48 timmar.

Eftersom endast en relativt liten andel prover innehåller ESBL-producerare är detta tidskrävande och dyrt.

Med **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)** stryks provet ut på bägge medierna i plattan. Efter inkubering över natten i 18 till 28 timmar (20 – 22 timmar är optimalt) indikerar växt av ett isolat på ett av eller bägge medierna att det förekommer en potentiell ESBL-producerare. Resultatet måste bekräftas med resistensbestämning eller molekylära metoder.

Jämfört med icke-selektiv isolering följt av resistensbestämning minskar användningen av den här produkten arbetsbelastningen och gör att ESBL kan detekteras snabbare.

REAGENSER

BBL CHROMagar ESBL (Biplate)

Sammansättning* per liter aqua purif.

Medium 1 (klart)		Medium 2 (grumligt)	
Kromopepton	16,1 g	Kromopepton	16,1 g
Kromogenblandning	1,3	Kromogenblandning	1,3
Selektiva medel	0,24	Selektiva medel	0,24
Agar	15,0	Titandioxid (olöslig)	0,35
		Agar	15,0
pH 6,8 +/- 0,2			

*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

FÖRSIKTIGHETSBEAKTANDEN

IVD Endast för professionellt bruk. ⓘ

Plattorna får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning, sprickbildning eller andra brister.

Se dokumentet **ALLMÄNNA INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING** för information om aseptiska förfaranden vid hantering, biorisker och kassering av använda produkter.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Förvara plattorna **mörkt** vid 2 till 8 °C i originalförpackningen fram till dess de ska användas.

Undvik överhettning och nedfrysning. Plattorna kan inokuleras fram till utgångsdatum (se etiketten på förpackningen) och inkuberas under rekommenderad inkuberingstid.

Plattor från öppnade 10-plattsförpackningar kan användas i en vecka vid förvaring i ren och mörk miljö vid 2 – 8 °C. **Eftersom ljus kan förstöra kromogenerna ska exponering för ljus minimeras före och under inkubering.**

KVALITETSKONTROLL UTFÖRD AV ANVÄNDAREN

Inokulera representativa prover med följande stammar på respektive medium (se dokumentet **Provtyper** och **Testförfarande** för ytterligare information). Inkubera plattorna, helst upp- och nedvända, aerobt vid 35 – 37 °C i 20 – 22 timmar.

Stammar	Växtresultat (bägge medierna)
<i>E. coli</i> DSM 22314 (ESBL-producerare)	Medium 1 (klart): måttlig till utmärkt växt; rosa till ljuslila kolonier Medium 2 (grumligt): ingen till måttlig växt; rosa till ljuslila kolonier
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (ESBL-producerare)	Bägge medierna: måttlig till utmärkt växt; blå till blågröna kolonier
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (icke-ESBL-producerare)	Bägge medierna: inhibering fullständig
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Bägge medierna: inhibering fullständig
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Bägge medierna: inhibering fullständig

Inte inokulerad	Medium 1 (klart): transparent, färglösa till mycket ljust bärnstensfärgade (kan innehålla en måttlig mängd små partiklar) Medium 2 (grumligt): ogenomskinligt, vita till krämfärgade
-----------------	---

FÖRFARANDE

Tillhandahållet material

BBL CHROMagar ESBL (Biplate) (90 mm **Stacker**-plattor). Mikrobiologiskt kontrollerade.

Material som krävs men ej medföljer

Extra odlingsmedier, reagenser och laboratorieutrustning.

Provtyper

Denna produkt används huvudsakligen för detektion av kolonisering av ESBL-producerande stammar för att bidra till förebyggande och kontroll av ESBL-infektioner i vårdmiljöer, i synnerhet på intensivvårdsavdelningar. Den används primärt med rektala pinnprov men kan användas med kliniska prover från andra ställen på kroppen (t.ex. från näsa, sår, hals, uretra och ljumske), som misstänks innehålla ESBL-producerande (betalaktamas med utvidgat spektrum)

Enterobacteriaceae eller andra gramnegativa aerobt växande stavar med hög resistens mot betalaktamer med utvidgat spektrum. Användning av transportbehållare som godkänts för insamling av mikrobiologiska kliniska prover rekommenderas. Följ de förfaringssätt som rekommenderas av tillverkaren av transportbehållaren.

Användaren hänvisas även till relevanta referenser för mer information om provtagning och provhantering.^{3,4}

Den kan även användas för fortsatt odling av potentiellt ESBL-producerande stammar från andra medier. Direkt inokulering med kolonier rekommenderas inte. Undvik överinokulering genom att först suspendera kolonierna i koksaltlösning (se **Testförfarande**) och sedan stryka ut en mängd som motsvarar en full ögla på respektive medium.

Testförfarande

CHROMagar ESBL måste inokuleras direkt från provpinnen, utan förberikning, eller från en isolerad koloni som suspenderats i koksaltlösning så att den matchar en McFarland 0,5-standard för grumlighet. Direkt inokulering från isolerade kolonier rekommenderas inte eftersom den höga halten av inokulat i sällsynta fall kan ge falskt positiva resultat.

Inokulera provet med en provpinne eller ögla på båda medierna på en **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)**-platta och utför stryk för isolering, med hjälp av en ögla. Följande förfarande för inokulering måste följas noggrant för att erhålla isolerade kolonier med deras karakteristiska utseende. Otillräcklig inokulering eller inokulering av hela medietorna med endast provpinnar (utan att använda öglor för isoleringsstryk) kan ge felaktiga resultat eller göra plattan oavläsningsbar. Inokulera inte mer än ett prov per platta. Bägge sidorna på denna dubbelplatta måste inokuleras med samma prov.

Förfarande för inokulering och inkubering:

1. Tryck provpinnen lätt mot ett litet område på det första mediet på **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)**-plattan: Överinokulera inte! Ta bort provpinnen från det medium som just inokulerades.
2. Vrid provpinnen något och inokulera det andra mediet på **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)**-plattan: tryck provpinnen försiktigt mot det första utstryksområdet på det andra mediet. Överinokulera inte!

Observera att ordningen på inokuleringen inte påverkar resultatet.

3. Sätt tillbaka provpinnen i provröret.
4. Använd öglor och slutför utstryket på plattorna. Stryk för isolering! Stryk först de första utstryksområdena och stryk sedan det andra och tredje området på bägge medierna. Det rekommenderas att en ny ögla används för respektive sida av testprodukten.
5. Inkubera aerobt vid 35 – 37 °C i 18 till 28 timmar (20 – 22 timmar är optimalt), helst i upp- och nedvänt läge (med mediesidan upp). Inkubera inte längre tid än vad som angetts och

inkubera inte i en koldioxidberikad miljö. Eftersom ljus kan förstöra kromogenerna ska exponering för ljus minimeras under inkuberingen. När koloniernas färger väl har utvecklats har skett kan de utsättas för ljus.

6. Avläs plattorna enligt beskrivningen i **Resultat och tolkning**.

Beroende på provets typ och syfte måste andra medier också inokuleras så att det blir möjligt att detektera samtliga patogener i provet. Sådana medier ska inkludera minst en icke-selektiv blodagarplatta.

Resultat och tolkning

Efter inkuberingen kommer prover som innehåller isolat som är resistent mot inhibitorer som finns i mediet att växa. Även om de flesta ESBL-producerande stammarna växer på båda medierna på dubbelplattan finns det stammar med en in vitro-resistens mot något av de antimikrobiella medlen och som därför endast växer på ett av medierna. Plattorna ska uppvisa isolerade kolonier i de områden där inokulatet varit korrekt spädd. Lämplig resistensbestämning eller tester med molekylära metoder måste utföras för att bekräfta förekomsten av ESBL-producerande isolat.

Frånvaro av växt på **bägge** medierna indikerar att provet inte innehåller stammar som är resistent mot de antimikrobiella medel som finns i medierna.

Observera att missfärgning av medierna utan synliga kolonier (vilket kan inträffa om medierna har överinokulerats med avföringsprover eller överdrivet höga bakteriehalter) anses som ett negativt resultat (se även **Procedurens begränsningar**).

Differentiering och/eller identifiering av isolat utifrån färg och utseende på koloni

Ljusrosa till rosa (ljuslila) kolonier: *Escherichia coli*, ett valfritt indoltest med **BD BBL DMACA Indole Reagent Droppers** (indolreagenspipetter) (kat. nr. 261187) kan utföras på filterpapper för att bekräfta *E. coli* (indolpositiv). Tillsätt inte indolreagensen till mediets yta! **Obs!** Vissa *Citrobacter*-stammar, till exempel *Citrobacter braakii* har visat sig producera violetta till lila kolonier på **BBL CHROMagar Orientation** och, om de är resistent mot de antibiotika som mediet innehåller, på **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)**. Biokemisk identifiering rekommenderas för sådana stammar.

Blå till blågröna kolonier, som eventuellt omringas av ett rosa till ljuslila område: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* eller annat. Ytterligare tester är nödvändiga för identifiering. För mer information, se dokumentet Allmänna instruktioner för användning för **BBL CHROMagar Orientation** (se: <http://www.bd.com/europe/regulatory/documents.asp#IFU>).

Färglösa till bruna kolonier med brunaktiga halos som sträcker sig in i mediet: *Proteus*-, *Morganella*-, *Providencia*-stammar. Ytterligare tester är nödvändiga för fullständig identifiering. För mer information, se dokumentet Allmänna instruktioner för användning för **BBL CHROMagar Orientation** (se: <http://www.bd.com/europe/regulatory/documents.asp#IFU>).

I sällsynta fall kan *Pseudomonas aeruginosa* producera diffusivt brunt pigment, vilket påminner om *Proteus*. För differentiering kan ett oxidastest utföras (se nedan).

Färglösa kolonier: Utför ett oxidastest: om positivt och den typiska fruktiga doften och/eller grönaktiga, blåaktiga eller brunaktiga pigmenteringen (som beror på organismens eget pigment) kan uppfattas → *Pseudomonas aeruginosa*. Det är rekommenderat att använda **BD Oxidase Reagent Droppers** (oxidasreagenspipetter) (kat. nr. 261181) för detta test. Utför oxidastestet på filterpapper enligt beskrivningen i Allmänna instruktioner för användning för testet, men inte på kolonierna på plattan. Ytterligare testning för att bekräfta resultatet rekommenderas.

Pseudomonas aeruginosa växer ofta på den ogenomskinliga sidan av plattan (= naturlig resistens), medan stammar med en högre resistens mot antibiotika ofta växer även på den klara sidan. För att fastställa de exakta resistensmönstren bör alla isolat av *P. aeruginosa* från detta medium resistensbestämmas med godkända metoder. Om oxidastestet är negativt eller tvetydigt, utför fullständig biokemisk identifiering. Färglösa oxidasnegativa kolonier kan inkludera icke-fermenterare som *Acinetobacter* eller *Enterobacteriaceae* som inte

metaboliserar några av de kromogener som finns i mediet, till exempel *Salmonella*. Dessa species kan också uppvisa resistens mot tredje generationens cefalosporiner och får inte ignoreras!

Blandkulturer på BBL CHROMagar ESBL (Biplate)-plattan: De känns vanligtvis igen och kan differentieras enkelt genom olika färger på kolonierna. Exempelvis uppvisar en blandkultur av *Klebsiella* och *E. coli* blå kolonier (*Klebsiella*) och rosa till ljuslila kolonier (*E. coli*).

Undersök visuellt om det förekommer olika typer av kolonier och färger på plattan.

Fortsatt odling på **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)** rekommenderas om fler än två olika kolonityper eller färger kan urskiljas på plattan.

KLINISKA PRESTANDA OCH PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

BBL CHROMagar ESBL (Biplate) är ett selektivt kromogent screeningmedium för direkt identifiering och differentiering av *Enterobacteriaceae* och vissa andra gramnegativa stavar som är resistent mot betalaktamer med utvidgat spektrum som möjliggör detektion av ESBL-producerande stammar. Mediet möjliggör direkt biokemisk identifiering av resistent *E. coli* och differentiering av andra *Enterobacteriaceae* utifrån färg på kolonin. Grampositiva bakterier och jäst inhiberas vanligtvis.

Isolat som erhålls med detta medium måste bekräftas som ESBL-producerare genom ytterligare tester.

Prestandaresultat

I en extern prestandautvärdering testades 320 kliniska prover (varav 277 rektala pinnprover, 12 pinnprover från mun/svalg, 11 nasala pinnprover och 20 övriga prover) på mediet genom att provpinnarna från transportmediet ströks direkt på mediet. Av dessa 320 prover var 108 positiva och 212 negativa enligt vad som fastställdes med den interna metoden (automatiserade och manuella resistenstester inklusive bekräftande CLSI-test för ESBL-producerande isolat på Mueller Hinton II-agar). På **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)** fastställdes en sensitivitet på 100 % och en specificitet på 93 %.⁶

Intern prestandautvärdering

Detektionsgränser (LOD)

BBL CHROMagar ESBL (Biplate) utvärderades för att bestämma detektionsgränsen (LOD) för ESBL-producerande stammar. Tre teststammar (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* DSM 22664 och *E. coli* ENF 11013) utvärderades för utbyte på **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)**. Plattor med icke-selektiv Columbia-agar med 5 % fårblod användes för att bestämma organismkoncentrationen uttryckt som kolonibildande enheter (CFU) för varje spädning. LOD för **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)** var 8 – 16 CFU vid 24 timmar (i genomsnitt 13 CFU).

Detektion av resistens

Stammar av följande resistenstyper har detekterats på **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)**:

Species	Resistenstyper	Species	Resistenstyper
<i>Escherichia coli</i>	CAZ-9, TEM-46	<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM-1
	CTX-M, TEM		OXA-2
	CTX-M1		SHV
	CTX-M15		TEM
	KPC		TEM, SHV
	OXA-48		TEM, SHV, OXA-10
	SHV-5; TEM-1b		TEM-1, SHV-12
	TEM		TEM-1, SHV-5
	TEM, SHV	<i>Salmonella species</i>	SHV
	TEM, CTX-M, SHV		TEM
	TEM, SHV, KPC	<i>Serratia marcescens</i>	TEM, CTX-M, OXA-2
	TEM, SHV, OXA-1, KPC	<i>Providencia rettgeri</i>	NDM-1
	TEM-50	<i>Icke-Enterobacteriaceae</i>	
	VIM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP
<i>Klebsiella oxytoca</i>	VIM		VIM
	CTX-M, SHV		VIM-1

<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	KPC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23
	NDM-1		OXA-58
	OXA-48		VIM-2
	SHV		
	SHV, OXA-10		
	SHV-18		
	TEM		
	TEM, CTX-M, SHV, IMP-1		
	TEM, CTX-M5, SHV		
	TEM, SHV		
	TEM-1, SHV-5		
	TEM-3, SHV		
	VIM		

Denna lista inkluderar karbapenamasproducerande stammar² som växte på mediet med för respektive koloni karakteriserande färg. Observera att tester för att bekräfta karbapenamasproduktion måste utföras.

Procedures begränsningar

Observera att bägge sidorna på denna dubbelplatta måste inokuleras med samma prov. Försök inte att inokulera mer än ett prov per platta!

Medan den biokemiska identifieringen på species- eller grupp-nivå (baserat på de kromogena reaktionerna på mediet) är slutgiltig måste resistensen bekräftas med godkända metoder för resistensbestämning.

Identifiering av blå, blågröna och färglösa isolat på species-nivå måste utföras med hjälp av biokemiska tester.

Vissa grampositiva bakterier, kan vara resistent mot inhibitorerna och kan växa på medierna.

Eftersom isoleringen av ESBL-producerande stammar är avhängig antalet organismer som förekommer i provet beror resultatets tillförlitlighet på att insamling, hantering och förvaring av prover skett på ett korrekt sätt (se **FÖRFARANDE – Provtyper**).

Hög bakteriekoncentration och/eller vissa prover kan producera icke-specifik färgning av mediets primära utstryksområde. Det kan medföra att mediet uppvisar ljuslila, lila, grön eller blå färgning eller en diffus hinna ovanpå mediets yta utan urskiljbara kolonier. Detta bör tolkas som negativt.

Inkubera inte i mindre än 18 timmar eftersom detta kan leda till små kolonier och/eller svag kolonifärgning. Den optimala inkuberingstiden är 20 till 22 timmar. Inkuberingen ska inte pågå i mer än 28 timmar. Vid blandkulturer kan längre inkubering leda till att kolonier växer samman vilket gör dem svåra att känna igen och renodla.

I sällsynta fall ger ESBL-producerande stammar av *Proteus* spp. svag växt på detta medium, i synnerhet när det förekommer vid låga CFU-nivåer.

Det är inte rekommenderat att ignorera isolat med färglösa kolonier vid screening av ESBL-producerare på detta medium. Utför ett oxidastest på dessa isolat. Om detta test är negativt, utför en fullständig biokemisk identifiering av isolatet.

Även om en inhibitor för ampC-/cefalosporinasöverproducerare har lagts till i medierna kommer en viss procentandel av sådana stammar att växa. Därför är **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)** avsett att användas för **screening**, och **inte för slutgiltig identifiering** av ESBL-producerare. Specifika tester för resistensbestämning eller molekylära metoder är nödvändiga för att fastställa den exakta typen av resistens som uppvisas av isolaten.

Innan **BBL CHROMagar ESBL (Biplate)** används för första gången rekommenderas att användaren övar sig i att känna igen de typiska koloniutseendena med hjälp av kända

stammar, till exempel de stammar som anges under **KVALITETSKONTROLL UTFÖRD AV ANVÄNDAREN**.

REFERENSER

1. Bradford, P.A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14: 933-951.
2. Glasner, C. et al. (2013). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. Eurosurveillance 18: 1-7.
3. Linscott, A.J. 2007. Specimen collection and transport. In L.S. Gracia, and H.D. Isenberg, (eds.), Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed. ASM, Washington DC.
4. Miller, J.M., K. Krisher, and H.T. Holmes. 2007. General principles of specimen collection and handling. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller (eds.), Manual of clinical microbiology. 9th ed., ASM, Washington DC.
5. Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin. Microbiol. Rev. 18: 657-686.
6. Data på fil. Becton Dickinson GmbH.

FÖRPACKNINGAR/TILLGÄNGLIGHET

BD BBL CHROMagar ESBL (Biplate)

Kat. nr.

Beskrivning

REF 257606

Färdiga odlingsplattor, 20 st. per förpackning

YTTERLIGARE INFORMATION

Kontakta närmaste BD-representant för ytterligare information.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

© 2019 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.