

**Ekspertyza naukowa w zakresie oceny jakości podłoży i krążków z
antybiotykami firmy BioMaxima S.A.**

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1.1. Nazwa badanego artykułu | Podłoża i krążki z antybiotykami do oznaczania lekowrażliwości oraz podłoża chromogenne do wykrywania mechanizmów oporności KPC, ESBL, VRE, MRSA |
| 1.2. Nazwa dostawcy | BioMaxima S.A. 20-277 Lublin, ul. Vetterów 5 sekretariat: 81 440 83 71 tel. 81 745 51 40 fax 81 744 29 15 |
| 1.3. Przeznaczenie artykułu | Diagnostyka mikrobiologiczna |
| 1.4. Jednostka badająca | Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów Narodowy Instytut Leków 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34 tel. (0-22) 851 46 70 tel./fax (0-22) 841 29 49 |
| 1.5 Okres testowania | luty – marzec 2018 |
| 1.6. Przebadane drobnoustroje | Szczepy wzorcowe z kolekcji ATCC oraz szczepy z kolekcji MIKROBANK Narodowego Instytutu Leków |

Cel

W Narodowym Instytucie Leków (NIL), Zakładzie Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Krajowym Ośrodku Referencyjnym ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów przeprowadzono w okresie luty - marzec 2018 ocenę jakości podłoży i krążków z antybiotykami do oznaczania lekowrażliwości oraz podłoży chromogennych do wykrywania mechanizmów oporności KPC, ESBL, VRE i MRSA oraz wykrywania szczepów wytwarzających karbapenemazy, których producentem jest firma BioMaxima S.A.

Materialy

Ocena jakości podłoży i krążków z antybiotykami:

W badaniu zastosowano 20 różnych krążków z antybiotykami w stężeniach zalecanych przez EUCAST produkcji BioMaxima. Badano krążki z jednej serii z następującymi antybiotykami:

- z grupy penicylin: penicylina benzylowa, amoksycylina – kwas klawulanowy, piperacylina – tazobaktam, oksacylina
- z grupy cefalosporyn: cefotaksym, ceftazydym, cefoksytyna
- z grupy karbapenemów: imipenem, meropenem, ertapenem
- z grupy aminoglikozydów: gentamycyna, amikacyna, tobramycyna
- z grupy fluorochinolonów: ciprofloksacyna
- inne antybiotyki: erytromycyna, klindamycyna, tetracyklina, tigecyklina, linezolid, trimetoprim – sulfametoksazol

Oznaczenia lekowrażliwości z użyciem krążków z antybiotykami produkcji BioMaxima wykonano trzykrotnie, jednocześnie na podłożach dostarczonych przez producenta firmę BioMaxima (podłoża z jednej serii) oraz na podłożach używanych w czasie badania do bieżącej diagnostyki mikrobiologicznej w laboratorium KORLD w Zakładzie Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej. Stosowano następujące podłoża: Columbia agar z 5% krwią baranią (BD), Mueller-Hinton II Agar (BD), Mueller Hinton Agar + 5% krwi końskiej 20 mg/L β -NAD (Oxoid), Mueller-Hinton II Agar (BioMaxima), Mueller Hinton Agar + 5% krwi końskiej 20 mg/L β -NAD (BioMaxima).

Do badań użyto następujących szczepów kontrolnych z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (ATCC), rekomendowanych przez EUCAST: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 oraz *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Ocena jakości podłoży chromogennych:

W badaniu zastosowano podłoża chromogenne z jednej serii do wykrywania mechanizmów oporności KPC, ESBL, VRE, MRSA oraz wykrywania szczepów wytwarzających karbapenemazy produkcji firmy BioMaxima.

Badania wykonano z zastosowaniem puli szczepów z kolekcji MIKROBANK, izolowanych z zakażeń, o znanym profilu lekowrażliwości, dla których wartości minimalnych stężeń hamujących (MIC) antybiotyków oznaczono referencyjną metodą mikrorozcieńczeń leku w podłożu płynnym, zgodnie z metodyką opisaną w dokumencie CLSI. M07-A9, 2012. Zastosowano następujące szczepy:

1. *S. aureus* wrażliwe na metycylinę MSSA (n=15)
2. *S. aureus* oporne na metycylinę MRSA (n=15)
3. *Enterococcus faecalis* wrażliwe na glikopeptydy (n=3)
4. *Enterococcus faecium* wrażliwe na glikopeptydy (n=2)
5. *E. faecalis* oporne na glikopeptydy (n=3)
6. *E. faecium* oporne na glikopeptydy (n=12)
7. *Enterococcus gallinarum* o niskim poziomie oporności na glikopeptydy (n=3)
8. *Enterococcus raffinosus* oporne na glikopeptydy (n=3)
9. *E. coli* wrażliwy na cefalosporyny III generacji i karbapenemy (n=4)
10. *E. coli* ESBL-dodatni (n=4)
11. *E. coli* OXA-48-dodatni (n=1)
12. *Klebsiella pneumoniae* wrażliwy na cefalosporyny III generacji i karbapenemy (n=6)
13. *K. pneumoniae* ESBL-dodatni (n=9)
14. *K. pneumoniae* KPC-dodatni (n=10)
15. *K. pneumoniae* MBL-dodatni (n=7)
16. *K. pneumoniae* OXA-48-dodatni (n=4)
17. *Enterobacter cloacae* ESBL-dodatni (n=2)
18. Inne: *E. cloacae* MBL-dodatni (n=1), *Citrobacter freundii* MBL-dodatni (n=1), *Klebsiella oxytoca* MBL-dodatni (n=1)

Listę odczynników produkcji BioMaxima użytych do badań zawiera tabela nr 1.

Wszystkie użyte w badaniu krążki z antybiotykami i podłoża mikrobiologiczne posiadały aktualną datę ważności.

Tabela nr 1.

Lista odczynników produkcji BioMaxima użytych do badań.

| Nazwa | Odczynniki BioMaxima | |
|--|----------------------|---------------|
| | Lot | Data ważności |
| Mueller Hinton II Agar | 456/01/S | 18.07.2018 |
| Mueller Hinton II Agar +5% KK + 20 NAD | 3210/01/S | 22.02.2018 |
| CHROMagar mSuperCarba | 444/01/S | 13.03.2018 |
| CHROMagar VRE | 445/01/S | 27.03.2018 |
| CHROMagar ESBL | 441/01/S | 27.03.2018 |
| CHROMagar KPC | 442/01/S | 27.03.2018 |
| CHROMagar MRSA | 457/01/S | 28.03.2018 |
| penicylina G 1 units | 006/01/S | 2020/01 |
| oksacylina 1 | 033/01/S | 2020/01 |
| cefoksytyna 30 | 646/12/R | 2019/12 |
| amoksycylina/ k. klawulanowy 20/10 | 027/01/S | 2019/06 |
| piperacylina/ tazobaktam 30/6 | 550/10/R | 2019/10 |
| ceftazydym 10 | 452/08/R | 2019/06 |
| cefotaksym 30 | 664/12/R | 2019/12 |
| meropenem 10 | 026/01/S | 2019/07 |
| imipenem 10 | 671/12/R | 2019/06 |
| ertapenem 10 | 631/11/R | 2018/12 |
| amikacyna 30 | 590/11/R | 2019/11 |
| gentamycyna 10 | 669/12/R | 2019/12 |
| tobramycyna 10 | 688/12/R | 2019/12 |
| ciprofloksacyna 5 | 010/01/S | 2020/01 |
| klindamycyna 2 | 654/12/R-1 | 2019/12 |
| erytromycyna 15 | 653/12/R | 2019/12 |
| linezolid 10 | 031/01/S | 2019/07 |
| tigecyklina 15 | 680/12/R | 2019/03 |
| tetracyklina 30 | 516/09/R-1 | 2019/09 |
| trimetoprim/ sulfametoksazol 25 | 610/11/R | 2019/11 |

Metody

Szczepki zastosowane w badaniu ożywiają z zamrożenia w temperaturze - 70°C dwukrotnie pasażując na podłożu Columbia agar z 5% krwią baranią. Oznaczenia lekowrażliwości wykonano z zastosowaniem metodyki rekomendowanej przez EUCAST. Bakterie pochodzące z czystej 18-24 godz. hodowli na płytce agarowej z krwią zawieszano w 0,85% NaCl doprowadzając do zmętnienia równego 0,5 w skali McFarlanda. Otrzymaną zawiesinę bakteryjną nanoszono na płytki z odpowiednim podłożem agarowym. Na 1 płytkę o średnicy 90 mm nakładano pęsetą do 6 krążków z

antybiotykami. Następnie płytki inkubowano 18-20 godz. w warunkach tlenowych dla *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*. oraz w atmosferze z dodatkiem 5% CO₂ dla *S. pneumoniae*. Odczytu wielkości stref zahamowania wzrostu dokonywano zgodnie z rekomendacjami EUCAST.

Podłoża chromogenne ich żywność i wybiórczość oceniano wysiewając szczepy bezpośrednio z zamrożenia w temperaturze - 70°C oraz z hodowli pierwszego pasażu na podłożu Columbia agar z 5% krwią baranią. Płytki inkubowano 18-20 godz. w warunkach tlenowych.

Wyniki

W oznaczeniach lekowrażliwości badanych szczepów kontrolnych z kolekcji ATCC wielkości stref zahamowania wzrostu dla badanych krążków z antybiotykami mieściły się w zakresie akceptowanych wartości i w większości przypadków były zgodne z wartościami Target, czyli mieściły się w środku zakresu akceptowanych wielkości stref zahamowania wzrostu.

W oznaczeniach na podłożach chromogennych do wykrywania mechanizmów oporności MRSA, VRE, ESBL, KPC i wykrywania szczepów wytwarzających karbapenemazy obserwowano obfity wzrost bakterii w zgodnym z charakterystyką produktu kolorze oraz zahamowanie wzrostu szczepów bez badanych mechanizmów oporności.

Wnioski z oceny

Podłoża chromogenne:

Podłoże CHROMagar MRSA: Podłoże spełnia oczekiwane wymogi jakościowe. W badaniu uzyskano obfity, typowy dla gatunku (kolor różowy) wzrost szczepów MRSA i zahamowanie wzrostu MSSA.

Podłoże CHROMagar VRE: Podłoże spełnia oczekiwane wymogi jakościowe. W badaniu uzyskano obfity, w typowym dla gatunku kolorze (*E. faecium* i *E. raffinosus* w kolorze różowym oraz *E. faecalis* i *E. gallinarum* w kolorze niebiesko-różowym) wzrost szczepów opornych na glikopeptydy oraz zahamowanie wzrostu szczepów enterokoków wrażliwych na glikopeptydy, a także MRSA i MSSA.

Podłoże CHROMagar ESBL: Podłoże spełnia oczekiwane wymogi jakościowe. W badaniu uzyskano obfity, w typowym dla gatunku kolorze (*E. coli* w kolorze różowym, pozostałe gatunki w kolorze niebiesko-zielonym) wzrost szczepów pałeczek Gram-ujemnych ESBL-dodatnich, KPC-dodatnich, MBL-dodatnich i OXA-48-dodatnich oraz zahamowanie wzrostu szczepów pałeczek Gram-ujemnych wrażliwych na cefalosporyny III generacji i karbapenemy.

Podłoże CHROMagar KPC: Podłoże spełnia oczekiwane wymagania jakościowe. W badaniu uzyskano obfity, w typowym dla gatunku kolorze (*E. coli* w kolorze różowym, pozostałe gatunki w kolorze niebiesko-zielonym) wzrost szczepów pałeczek Gram-ujemnych KPC-dodatnich, MBL-dodatnich i OXA-48-dodatnich oraz zahamowanie wzrostu szczepów pałeczek Gram-ujemnych wrażliwych na cefalosporyny III generacji i karbapenemy oraz ESBL-dodatnich.

Podłoże CHROMagar mSuperCARBA: Podłoże spełnia oczekiwane wymagania jakościowe. W badaniu uzyskano obfity, w typowy dla gatunku kolorze (*E. coli* w kolorze różowym, pozostałe gatunki w kolorze niebiesko-zielonym) wzrost szczepów pałeczek Gram-ujemnych KPC-dodatnich, MBL-dodatnich i OXA-48-dodatnich oraz zahamowanie wzrostu szczepów pałeczek Gram-ujemnych wrażliwych na cefalosporyny III generacji i karbapenemy oraz ESBL-dodatnich.

Podłoża i krążki z antybiotykami do oznaczania lekowrażliwości:

MH agar: Podłoże spełnia oczekiwane wymagania jakościowe. W oznaczeniach lekowrażliwości szczepów kontrolnych z kolekcji ATCC wielkości stref zahamowania wzrostu dla badanych krążków z antybiotykami mieściły się w zakresie akceptowanych wartości i w większości przypadków były zgodne z wartościami Target, czyli mieściły się w środku zakresu akceptowanych wielkości stref zahamowania wzrostu.

MH agar z 5% krwi końskiej + 20 mg/l NAD: Podłoże spełnia oczekiwane wymagania jakościowe. W oznaczeniach lekowrażliwości szczepów kontrolnych z kolekcji ATCC wielkości stref zahamowania wzrostu dla badanych krążków z antybiotykami mieściły się w zakresie akceptowanych wartości i w większości przypadków były zgodne z wartościami Target, czyli mieściły się w środku zakresu akceptowanych wielkości stref zahamowania wzrostu.

Krążki z antybiotykami: Produkt spełnia oczekiwane wymagania jakościowe. W oznaczeniach lekowrażliwości szczepów kontrolnych z kolekcji ATCC wielkości stref zahamowania wzrostu dla badanych krążków z antybiotykami mieściły się w zakresie akceptowanych wartości i w większości przypadków były zgodne z wartościami Target, czyli mieściły się w środku zakresu akceptowanych wielkości stref zahamowania wzrostu.

Badanie wykonały:

dr n. med. Dorota Żabicka

tech. Małgorzata Herda

Raport sporządziła:

dr n. med. Dorota Żabicka

dr n. med. DOROTA ŻABICKA

specjalista mikrobiolog