

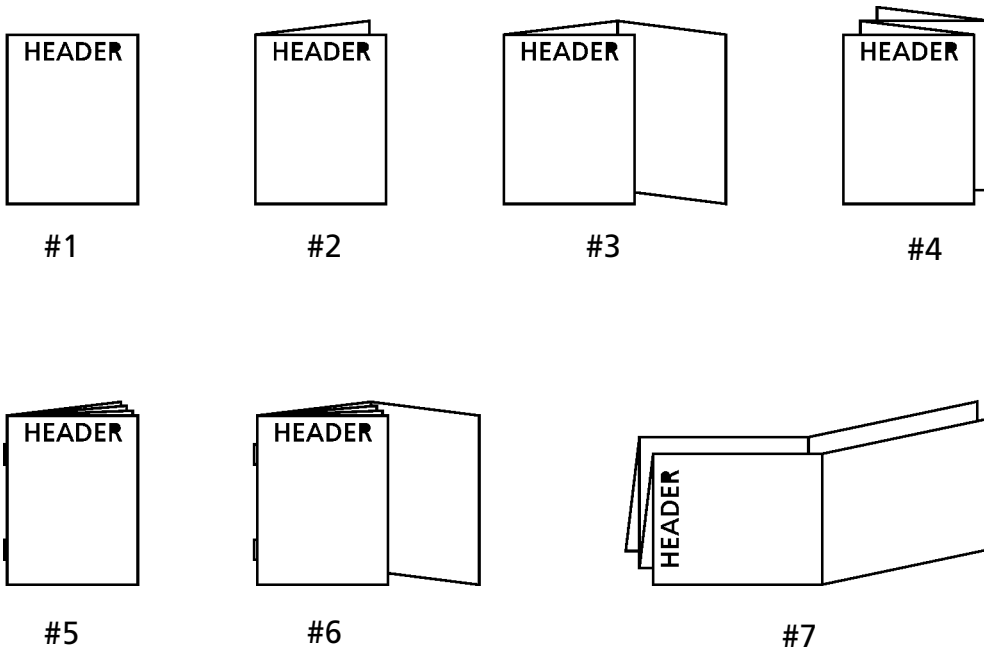
## Revisions

SO 0191-5

Rev from	Rev to	ECO #
0604	2010/06	5369-10

**Notes:**

1. BD Cat. Number 231650
2. Blank (Sheet) Size: Length: N/A      Width: N/A  
 Number of Pages: N/A      Number of Sheets: N/A  
 Page Size: Length N/A      Width N/A      Final Folded Size: N/A
3. Style (see illustrations below): # N/A



4. See Specification Control Number 88-0080-01-00PR for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides  Yes     No  
 No. of Colors: 1                      PMS# Black
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	<small>COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION</small>	<b>Becton, Dickinson and Company</b> 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: 8800801		Category and Description Package Insert, Sensi-Disc Cefinase	Sheet: 1 of 11 <hr/> Scale:      N/A	A

# BD BBL™ Paper Discs for the Detection of $\beta$ -Lactamase Enzymes Cefinase Discs

English: pages 1 – 2      Italiano: pagine 6 – 7  
Français : pages 3 – 4      Español: páginas 7 – 8  
Deutsch : Seiten 4 – 5

 8800801  
2010/06

Pokyny vám poskytnú miestni zástupcov spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrucțiile ziskate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / Өзіндік жергілікті БД өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

## INTENDED USE

Cefinase™ discs are intended for use in rapid testing of isolated colonies of *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus* species, *Haemophilus influenzae*, enterococci and anaerobic bacteria for the production of  $\beta$ -lactamase.

## SUMMARY AND EXPLANATION

The ability of certain bacteria to produce enzymes that inactivate  $\beta$ -lactam antibiotics, i.e., penicillins and cephalosporins, has long been recognized. Abraham and Chain in 1940 first recognized an enzymatic activity in extracts of *Escherichia coli* that inactivated penicillin.<sup>1</sup> Since then a large number of similar enzymes have been isolated from a number of bacterial species with somewhat different substrate specificities. Some selectively hydrolyze penicillin-class antimicrobics (i.e., penicillin G, ampicillin, carbenicillin) and have been described as penicillinases. Others selectively hydrolyze the cephalosporin-class antimicrobics (i.e., cephalothin, cephalexin, cephadrine) and have been described as cephalosporinases. Still other enzymes hydrolyze both cephalosporins and penicillins.<sup>2</sup>

A large number of  $\beta$ -lactamase-resistant penicillin and cephalosporin class antimicrobics have been developed by various pharmaceutical companies. One group includes the semisynthetic penicillins; methicillin, oxacillin, nafcillin and others, which are resistant to the penicillinase enzymes produced by staphylococci.<sup>3</sup> A large number of cephalosporins have also been developed which have varying degrees of resistance to  $\beta$ -lactamases. These include the second-generation cephalosporins (cefoxitin, cefamandole and cefuroxime) and third-generation cephalosporins (cefotaxime, moxalactam, cefoperazone and others).<sup>4</sup>

Several clinical tests have been developed for the detection of  $\beta$ -lactamases. These tests provide rapid information predictive of the development of resistance. Interpretation of  $\beta$ -lactamase test results must consider: the sensitivity of the test for different classes of  $\beta$ -lactamase enzymes, the types of  $\beta$ -lactamases produced by different taxonomic groups of organisms and the substrate specificities of the different  $\beta$ -lactamases.

The most commonly used clinical procedures include the iodometric method, the acidometric method, and a variety of chromogenic substrates.<sup>5</sup> The iodometric and acidometric tests are generally performed using penicillin as a substrate and, therefore, can only detect enzymes which hydrolyze penicillin. One of the chromogenic cephalosporins, PADAC (Calbiochem-Behring) has been found effective in detecting most of the known  $\beta$ -lactamases except for some of the penicillinases produced by staphylococci, and some  $\beta$ -lactamases produced by anaerobic bacteria.<sup>6</sup> Another chromogenic cephalosporin, nitrocefin (Glaxo Research), has been found effective in detecting all known  $\beta$ -lactamases including the staphylococcal penicillinases.<sup>7-9</sup>

For many taxonomic groups of organisms, e.g. *Enterobacteriaceae*, the  $\beta$ -lactamase test is of little value because a diversity of  $\beta$ -lactamase enzymes with different substrate specificities may be produced within the group, or even within a single strain.<sup>10</sup>

In other bacteria, for example, penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*,<sup>11</sup> *Staphylococcus aureus*,<sup>12,13</sup> *Moraxella catarrhalis*,<sup>14</sup> and ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*,<sup>5,9,15</sup> only one class of enzyme is produced by resistant strains. The  $\beta$ -lactamase test performed with these organisms enables a prediction of resistance to be made immediately after primary isolation, 18-24 h prior to the time that growth-dependent susceptibility results would be available.

While the prevalence of  $\beta$ -lactamase-producing enterococci appears to be small, a low inoculum may result in strains going undetected by susceptibility-testing procedures, and routine screening by the nitrocefin disc procedure is recommended.<sup>16</sup>

With anaerobic bacteria, the relationship between the production of  $\beta$ -lactamase and resistance to  $\beta$ -lactam antimicrobics is complicated and somewhat similar to *Enterobacteriaceae*.  $\beta$ -lactamases are most commonly found within the *Bacteroides* species,<sup>17</sup> however,  $\beta$ -lactamase-producing strains of *Clostridium butyricum*, *C. perfringens* and *Fusobacterium* sp. have been reported.<sup>18,19</sup> Among the *Bacteroides* group, a variety of enzymes may be produced with different substrate specificities. The  $\beta$ -lactamases frequently found in strains of *Prevotella melaninogenica* and *P. oralis* are usually specific for penicillins (penicillinase),<sup>20</sup> whereas the  $\beta$ -lactamases frequently found in the *B. fragilis* group are cephalosporinases.<sup>21,22</sup> A variety of cephalosporinases have been reported in the *B. fragilis* group and they include some very active enzymes which can hydrolyze some of the reportedly  $\beta$ -lactamase-resistant cephalosporins such as cefotaxime.<sup>23,24</sup> Rare strains have been reported which hydrolyze at high rates all known  $\beta$ -lactams including cefoxitin.<sup>24,25</sup>

Even though the  $\beta$ -lactamases produced by the *B. fragilis* group are most active against cephalosporins, most strains are found to be resistant to penicillin, carbenicillin and ampicillin in growth-dependent susceptibility tests.<sup>17,26</sup> This finding suggests that the *B. fragilis* group may be intrinsically resistant to penicillins through factors such as permeability barriers,<sup>22</sup> or that the  $\beta$ -lactamase is produced in quantities sufficient to overcome the relatively slow hydrolysis rate of the enzyme with penicillins. Evidence which tends to support a contributory role for  $\beta$ -lactamase in the resistance to penicillins is found in reports that the combination of clavulanic acid (a  $\beta$ -lactamase inhibitor) and penicillins is many times more active against *B. fragilis* than is the penicillin alone.<sup>27</sup>

Whatever the cause or causes of penicillin resistance in *B. fragilis*, all strains should probably be considered resistant.<sup>28</sup> The other gram-negative anaerobic strains are probably susceptible to penicillin so long as they are  $\beta$ -lactamase negative.<sup>28</sup>

## PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The Cefinase disc is impregnated with the chromogenic cephalosporin, nitrocefin. This compound exhibits a very rapid color change from yellow to red as the amide bond in the  $\beta$ -lactam ring is hydrolyzed by a  $\beta$ -lactamase. When a bacterium produces this enzyme in significant quantities, the yellow-colored disc turns red in the area where the isolate is smeared.

Although other penicillins and cephalosporins may be used as substrates for specific enzymes, nitrocefin has the wide spectrum of susceptibility and sensitivity of the commercially available  $\beta$ -lactams. It is not known to react with other microbial enzymes.<sup>29</sup>

Each disc is used to test one bacterial strain for the presence of  $\beta$ -lactamase.

## REAGENTS

Cefinase discs impregnated with nitrocefin.

### Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

These discs are not for use in susceptibility testing.

Observe aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards throughout all procedures. After use, prepared plates and other contaminated materials must be sterilized by autoclaving before discarding.

Nitrocefin induces mutations in certain strains of bacteria (Ames test) and may be sensitizing. Ingestion, inhalation or contact with the skin or eyes should be avoided.

**Storage Instructions:** Upon receipt, store unopened package at -20 to +8°C. After use, the Cefinase cartridge should be stored in any glass, air tight container containing desiccant and stored at -20 to +8°C. Discard remaining Cefinase discs 60 days after opening blister packaging. The expiration date on the cartridge applies only to discs intact in unopened blister packaging.

**Indications of Deterioration:** Do not use the cartridge if the discs appear orange or red in color.

## SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

This procedure is not to be used directly with clinical specimens or other sources containing mixed microbial flora. The bacteria to be tested must first be isolated as separate colonies by streaking the specimen onto appropriate culture media plates.

## PROCEDURE

**Material Provided:** Cefinase discs, 50 discs per cartridge.

**Materials Required But Not Provided:** Ancillary reagents, quality control organisms and laboratory equipment as required for the procedure.

### Test Procedure:

- Using a single disc dispenser, dispense the required number of discs from the cartridge into an empty Petri dish or onto a microscope slide.
- Moisten each disc with one drop of purified water.
- With a sterilized loop or applicator stick remove several well-isolated similar colonies and smear onto a disc surface.
- Observe disc for color change.
- Alternate procedure: Using forceps moisten disc with one drop of purified water and then wipe across colony.

**User Quality Control:** Control reference cultures should be run with each group of unknowns. The following organisms are recommended for use as test strains.

Test Strain	Expected Results
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC™ 29213	Positive
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Negative

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent NCCLS guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

## RESULTS AND INTERPRETATION

A positive reaction will show a yellow to red color change on the area where the culture was applied. Note: color change does not usually develop over the entire disc. A negative result will show no color change on the disc.

For most bacterial strains a positive result will develop within 5 min. However, positive reactions for some staphylococci may take up to 1 h to develop.

Organism	Result	Approx. Reaction Time	Interpretation
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	1 h	Resistant to penicillin, ampicillin, carbenicillin and ticarcillin. Probably susceptible to cephalothin, methicillin, oxacillin, nafcillin and other penicillinase-resistant penicillins.*
<i>Haemophilus influenzae</i>	Positive	1 min	Resistant to ampicillin. Susceptible to cephalosporins.*
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> and <i>Moraxella catarrhalis</i>	Positive	1 min	Resistant to penicillin.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positive	5 min	Resistant to penicillin and ampicillin
Anaerobic bacteria	Positive	30 min	Probable identification is <i>Bacteroides</i> species. Probably resistant to penicillin and may be resistant to cephalosporins including cefotaxime and rarely cefoxitin.

\* Susceptibility should be confirmed by growth-dependent susceptibility tests. Negative results imply but do not guarantee susceptibility.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The efficacy of this test in predicting the  $\beta$ -lactam resistance of microorganisms other than *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, staphylococci, enterococci and certain anaerobic bacteria is unproven.

Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics has been on rare occasions reported in some of the above organisms without the production of  $\beta$ -lactamases.<sup>30,31</sup> In these cases, resistance mechanisms such as permeability barriers have been postulated. Therefore, the  $\beta$ -lactamase test should be used as a rapid supplement and not a replacement for conventional susceptibility testing.

For some strains of staphylococci,<sup>13</sup> particularly *S. epidermidis*, an inducible  $\beta$ -lactamase has been described that might result in a false-negative  $\beta$ -lactamase reaction with a strain which is resistant to penicillin or ampicillin.

## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In a comparative study of four methods for detecting  $\beta$ -lactamase activity in anaerobic bacteria, the following percentages of agreement with a "standard" employing nitrocefin-saturated filter paper were obtained: Cefinase, 100%; pyridine-2-azo-p-dimethylaniline cephalosporin, 96%; a penicillinase disc using bromcresol purple pH indicator, 72%; the slide iodometric technique, 78%.<sup>32</sup>

## AVAILABILITY

Cat. No.	Description
231650	<b>BBL™ Cefinase™</b> Discs, one cartridge of 50 discs

## REFERENCES

- Abraham, E.P., and E. Chain. 1940. An enzyme from bacteria capable of destroying penicillin. *Nature* 146:837.
- McCarthy, L.R. 1980.  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Newsl.* 2 (2): 1-3. G.K. Hall and Co., Boston.
- Richmond, M.H. 1979.  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamases: two sides of a continuing story. *Rev. Inf. Dis.* 1:30-36.
- Bush, K., and R.B. Sykes. 1982. Interaction of new  $\beta$ -lactams with  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase-producing gram-negative rods, p.47-63. *In* H.C. Neu (ed.), *New  $\beta$ -lactam antibiotics: review from chemistry to clinical efficacy of new cephalosporins*. College of Physicians of Philadelphia, Philadelphia.
- Thornsberry, C., T.L. Gavan, and E.H. Gerlach. 1977. Cumitech 6, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Jorgensen, J.H., S.A. Crawford, and G.A. Alexander. 1982. Pyridine-2-azo-p-dimethylaniline chromophore, a new chromogenic cephalosporin for rapid beta-lactamase testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:162-164.
- Montgomery, K., L. Raymundo, Jr., and W.L. Drew. 1979. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 9:205-207.
- O'Callaghan, C.H., A. Morris, S.M. Kirby, and S.H. Shingler. 1972. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1:283-288
- Skinner, A., and R. Wise. 1977. A comparison of three rapid methods of  $\beta$ -lactamase activity in *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Pathol.* 30:1030-1032.
- Sykes, R.B., and M. Mathew. 1976. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2:115-157
- Ashford, W.A., R.G. Golash, and V.G. Hemming. 1976. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* ii:657-658.
- Adam, A.P., A.L. Barry, and E. Benner. 1970. A simple rapid test to differentiate penicillin-susceptible from penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 122:544-546
- Kirby, W.M.M. 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99:452-453
- Malmvall, B.E., J.E. Brorsson, and J. Johnson. 1977. *In vitro* sensitivity to penicillin V and  $\beta$ -lactamase production of *Branhamella catarrhalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 3:374-375.
- Khan, W., S. Ross, W. Rodriguez, G. Conroni, and A.K. Saz. 1974. *Haemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin. *J. Am. Med. Assoc.* 299:298-301.
- Neumann, M.A., D.F. Sahn, C. Thornsberry, and J.E. McGowan, Jr. 1991. Cumitech 6A, New developments in antimicrobial agent susceptibility testing: a practical guide. Coordinating ed., J.E. McGowan, Jr. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Olsson, B., K. Dornbush, and C.E. Nord. 1977. Susceptibility testing of  $\beta$ -lactam antibiotics and production of  $\beta$ -lactamase in *Bacteroides fragilis*. *Med. Microbiol. Immunol.* 163:183-194.
- Hart, C.A., K. Barr, T. Makin, P. Brown, and R.W.I. Cooke. 1982. Characteristics of a  $\beta$ -lactamase produced by *Clostridium butyricum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 10:31-35.
- Marrie, T.J., E.V. Haldane, C.A. Swantee, and E.A. Kerr. 1981. Susceptibility of anaerobic bacteria to nine antimicrobial agents and demonstration of decreased susceptibility of *Clostridium perfringens* to penicillin. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 19:51-55.
- Salyers, A.A., J. Wong and T.D. Wilkins. 1977.  $\beta$ -lactamase activity in strains of *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides oralis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:142-146.
- Del Bene, V.E., and W.E. Farrar, Jr. 1973. Cephalosporinase activity in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3:369-372
- Timewell, R., E. Taylor, and I. Phillips. 1981. The  $\beta$ -lactamases of *Bacteroides* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 7:137-146.
- Pechere, J.C., R. Guay, J. Dubois, and R. Letarte. 1980. Hydrolysis of cefotaxime by a  $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:1001-1003.
- Yotsuji, A., S. Minami, M. Inoue, and S. Mitsuhashi. 1983. Properties of novel  $\beta$ -lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24:925-929.
- Cuchural, G.J., F.P. Tally, N.V. Jacobus, P.K. Marsh, and J. W. Mayhew. 1983. Cefoxitin inactivation by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24:936-940
- Olsson, B., K. Dornbush, and C.E. Nord. 1979. Factors contributing to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15:263-268.
- Lamonthe, F., F. Auger, and J.M. Lacroix. 1984. Effect of clavulanic acid on the activities of ten  $\beta$ -lactam agents against members of the *Bacteroides fragilis* group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25:662-665.
- Gabay, E.L., V.L. Sutter, and S.M. Finegold. 1981. Rapid  $\beta$ -lactamase testing in *Bacteroides*. *J. Antimicrob. Chemother.* 8:413-416.
- Bush, K., and R.B. Sykes. 1984.  $\beta$ -lactamase (penicillinase, cephalosporinase), p. 280-285, 406, 407. *In* H.U. Bergmeyer (ed.) *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed, vol. IV. Verlag. Chemie, Deerfield Beach, Fla.
- Sabath, L.D., F.F. Barrett, C. Wilcox, D.A. Gerstein, and M. Finland. 1969. Methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, p. 302-306. *In* G.L. Hobby (ed.), *Antimicrob. Agents Chemother.* 1968. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Markowitz, S.M. 1980. Isolation of an ampicillin-resistant, non  $\beta$ -lactamase producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:302-306.
- Lee, D.T., and J.E. Rosenblatt. 1983. A comparison of four methods for detecting beta-lactamase activity in anaerobic bacteria, abstr. C302, p. 362. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 1983.

# BD BBL Paper Discs for the Detection of $\beta$ -Lactamase Enzymes Cefinase Discs

Français

## APPLICATION

Les disques **Cefinase** sont conçus pour l'évaluation rapide de la production de  $\beta$ -lactamases par des colonies isolées de *Neisseria gonorrhoeae*, de *Staphylococcus* spp., d'*Haemophilus influenzae*, d'entérocoques et de bactéries anaérobies.

## RESUME ET EXPLICATION

L'aptitude de certaines bactéries à produire des enzymes qui inactivent les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, c.-à-d. les pénicillines et les céphalosporines, est connue depuis longtemps. En 1940, Abraham et Chain ont les premiers identifié dans des extraits d'*Escherichia coli* une activité enzymatique qui inactivait la pénicilline.<sup>1</sup> Depuis, un grand nombre d'enzymes similaires ont été isolées à partir de plusieurs espèces bactériennes, avec des spécificités de substrat légèrement différentes. Certaines hydrolysent sélectivement les antimicrobiens de la classe des pénicillines (c.-à-d. la pénicilline G, l'ampicilline et la carbénicilline) et sont décrites comme des pénicillinases. D'autres hydrolysent sélectivement les antimicrobiens de la classe des céphalosporines (c.-à-d. la céfalotine, la céfalexine et la céphradine) et sont décrites comme des céphalosporinases. D'autres enzymes encore hydrolysent à la fois les céphalosporines et les pénicillines.<sup>2</sup>

Un grand nombre d'antimicrobiens de la classe des pénicillines et céphalosporines résistants à la  $\beta$ -lactamase ont été mis au point par plusieurs compagnies pharmaceutiques. L'un de ces groupes comprend les pénicillines hémisynthétiques, la méticilline, l'oxacilline, la nafciline et d'autres antimicrobiens résistants aux pénicillinases produites par les staphylocoques.<sup>3</sup> Un grand nombre de céphalosporines, présentant des degrés variables de résistance aux  $\beta$ -lactamases, ont également été mises au point. On trouve parmi celles-ci les céphalosporines de deuxième génération (céfoxitine, céfamandole et céfuroxime) et de troisième génération (céfotaxime, moxalactam, céfopérazone, etc.).<sup>4</sup> Plusieurs tests cliniques ont été mis au point pour la détection des  $\beta$ -lactamases. Ces tests fournissent des informations prédictives rapides sur l'émergence de la résistance. L'interprétation des résultats des tests de  $\beta$ -lactamase doit envisager la sensibilité du test aux différentes classes de  $\beta$ -lactamases, les types de  $\beta$ -lactamases produites par des groupes taxinomiques différents de microorganismes et les spécificités de substrat des différents  $\beta$ -lactamases.

Les procédures cliniques les plus couramment utilisées sont notamment la méthode iodométrique, la méthode acidométrique et un grand nombre de substrats chromogènes.<sup>5</sup> Les tests iodométrique et acidométrique sont habituellement réalisés en utilisant la pénicilline comme substrat et ne peuvent donc détecter que les enzymes qui hydrolysent la pénicilline. L'une des céphalosporines chromogènes, la PADAC (Calbiochem-Behring) s'est avérée efficace pour la détection de la plupart des  $\beta$ -lactamases connues, à l'exception de certaines pénicillinases produites par les staphylocoques et certaines  $\beta$ -lactamases produites par des bactéries anaérobies.<sup>6</sup> Une autre céphalosporine chromogène, la nitrocéfine (Glaxo Research), s'est avérée efficace pour la détection de l'ensemble des  $\beta$ -lactamases connues, y compris les pénicillinases de staphylocoques.<sup>7-9</sup>

Pour de nombreux groupes taxinomiques de microorganismes, p. ex., les *Enterobacteriaceae*, le test des  $\beta$ -lactamases est peu utile, car plusieurs  $\beta$ -lactamases ayant des spécificités de substrat différentes peuvent être produites au sein du groupe, voire au sein d'une même souche.<sup>10</sup>

Chez d'autres bactéries, par exemple les souches résistantes à la pénicilline de *Neisseria gonorrhoeae*,<sup>11</sup> *Staphylococcus aureus*<sup>12,13</sup> et *Moraxella catarrhalis*,<sup>14</sup> et les souches résistantes à l'ampicilline de *Haemophilus influenzae*,<sup>5,9,15</sup> seule une classe d'enzyme est produite par les souches résistantes. Le test des  $\beta$ -lactamases pratiqué sur ces microorganismes permet une prédiction de la résistance immédiatement après l'isolement primaire, 18 à 24 h avant l'obtention des résultats des tests de sensibilité basés sur la croissance bactérienne.

Même si la prévalence des entérocoques producteurs de  $\beta$ -lactamase semble limitée, un inoculum faible peut se traduire par une non détection de certaines souches par les procédures de test de sensibilité. Par conséquent, le dépistage de routine par la méthode du disque de nitrocéfine est recommandé.<sup>16</sup>

Chez les bactéries anaérobies, la relation entre la production de  $\beta$ -lactamase et la résistance aux antimicrobiens de la famille des  $\beta$ -lactamines est complexe et en partie similaire à celle des *Enterobacteriaceae*. Les  $\beta$ -lactamases sont le plus souvent retrouvées au sein des espèces *Bacteroides*.<sup>17</sup> Cependant, des souches de *Clostridium butyricum*, *C. perfringens* et *Fusobacterium* productrices de  $\beta$ -lactamase ont été rapportées.<sup>18,19</sup> Au sein du groupe des *Bacteroides*, un grand nombre d'enzymes peuvent être produites avec des spécificités de substrat différentes. Les  $\beta$ -lactamases fréquemment détectées chez les souches de *Prevotella melaninogenica* et *P. oralis* sont habituellement spécifiques des pénicillines (pénicillinase),<sup>20</sup> alors que les  $\beta$ -lactamases fréquemment détectées dans le groupe des *B. fragilis* sont des céphalosporinases.<sup>21,22</sup> Un grand nombre de céphalosporinases ont été décrites dans le groupe des *B. fragilis*, parmi lesquelles certaines enzymes très actives pouvant hydrolyser certaines des céphalosporines supposées résistantes aux  $\beta$ -lactamases, comme la céfotaxime.<sup>23,24</sup> Des souches rares ont été décrites, qui sont capables d'hydrolyser rapidement l'ensemble des  $\beta$ -lactamines connues, y compris la céfoxitine.<sup>24,25</sup>

Même si les  $\beta$ -lactamases produites par le groupe des *B. fragilis* sont plus actives contre les céphalosporines, la plupart des souches sont identifiées comme résistantes à la pénicilline, la carbénicilline et l'ampicilline par les tests de sensibilité basés sur la croissance bactérienne.<sup>17,26</sup> Ce résultat suggère que le groupe des *B. fragilis* pourrait être intrinsèquement résistant aux pénicillines par le biais d'autres facteurs comme des barrières de perméabilité,<sup>22</sup> ou que la  $\beta$ -lactamase est produite en quantités suffisantes pour pallier la faible vitesse d'hydrolyse des pénicillines par l'enzyme. Des études indiquent que la combinaison de l'acide clavulinique (un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase) et des pénicillines voit son efficacité multipliée contre *B. fragilis* par rapport à la pénicilline utilisée seule, ce qui va dans le sens d'un rôle contributif de la  $\beta$ -lactamase dans la résistance aux pénicillines.<sup>27</sup>

Quelle que soit la ou les causes de la résistance à la pénicilline chez *B. fragilis*, toutes les souches devraient probablement être considérées comme résistantes.<sup>28</sup> Les autres souches anaérobies à Gram négatif sont probablement sensibles à la pénicilline si elles sont  $\beta$ -lactamase négatives.<sup>28</sup>

## PRINCIPES DE LA METHODE

Le **Cefinase** disc est imprégné d'une céphalosporine chromogène, la nitrocéfine. Ce composé vire très rapidement du jaune au rouge lorsque la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame est hydrolysée par une  $\beta$ -lactamase. Lorsqu'une bactérie produit cette enzyme en quantités importantes, le disque de couleur jaune vire au rouge dans la zone où l'isolat a été étalé.

Bien que d'autres pénicillines et céphalosporines puissent être utilisées comme substrats pour des enzymes spécifiques, la nitrocéfine possède le large spectre de sensibilité des  $\beta$ -lactamines commercialisées. Elle ne présente pas de réactions connues avec d'autres enzymes microbiennes.<sup>29</sup>

Chaque disque est utilisé pour tester la présence de  $\beta$ -lactamase chez une souche bactérienne.

## REACTIFS

**Cefinase** discs imprégnés de nitrocéfine.

### Avertissements et précautions :

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ne pas utiliser ces disques pour effectuer des tests de sensibilité.

Respecter les techniques d'asepsie et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Après emploi, stériliser les boîtes de Pétri préparées et les autres matériaux contaminés par autoclavage avant de les éliminer.

La nitrocéfine est mutagène chez certaines souches de bactéries (test de Ames) et peut être sensibilisante. Eviter le contact avec la peau ou les yeux. Ne pas inhaler ni ingérer.

**Instructions pour la conservation :** Dès réception, conserver dans l'emballage non ouvert à une température comprise entre -20 et +8 °C. Après utilisation, conserver la cartouche de **Cefinase** dans un récipient en verre, étanche à l'air, contenant un dessiccateur et stocké à une température comprise entre -20 et +8 °C. Eliminer les disques **Cefinase** restants 60 jours après l'ouverture du conditionnement. La date de péremption indiquée sur la cartouche s'applique uniquement aux disques intacts dans leur conditionnement non ouvert.

**Signes de détérioration :** Ne pas utiliser la cartouche si les disques sont de couleur orange ou rouge.

## PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Ne pas employer directement cette procédure avec des échantillons cliniques ou d'autres sources contenant un mélange de flores microbiennes. Isoler au préalable les bactéries à tester sous forme de colonies séparées en striant avec l'échantillon des boîtes de Pétri contenant les milieux de culture appropriés.

## METHODE

**Matériaux fournis :** Disques **Cefinase** ; 50 disques par cartouche.

**Matériaux requis mais non fournis :** Réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis pour la méthode.

### Mode Opérateur du Test :

1. A l'aide d'un même distributeur de disques, distribuer le nombre de disques requis à partir de la cartouche dans une boîte de Pétri vide ou sur une lame porte-objet.
2. Humidifier chaque disque avec une goutte d'eau purifiée.
3. A l'aide d'un écouvillon ou d'un ensementeur à anse stérilisé, prélever plusieurs colonies similaires, bien isolées, et les étaler à la surface d'un disque.
4. Contrôler le changement de couleur du disque.
5. Autre méthode : A l'aide de pinces, humidifier le disque avec une goutte d'eau purifiée, puis le traîner sur une colonie.

**Contrôle de qualité par l'utilisateur :** Inclure des cultures témoins de référence dans chaque groupe de cultures à tester. Les microorganismes suivants sont recommandés comme souches de contrôle.

Souche de test	Résultats attendus
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Positif
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Négatif

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en

vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives NCCLS et la réglementation CLIA correspondantes pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

## RESULTATS ET INTERPRETATION

Une réaction positive se traduit par un changement de couleur du jaune au rouge dans la zone où la culture a été appliquée. Remarque : Le changement de couleur ne se développe habituellement pas sur la totalité du disque. Un résultat négatif se traduit par une absence de changement de couleur sur le disque.

Avec la plupart des souches bactériennes, un résultat positif se développe en 5 min. Cependant, avec certains staphylocoques, le développement des réactions positives peut demander jusqu'à 1 h.

Microorganisme	Résultat	Temps de réaction approx.	Interprétation
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	1 h	Résistant à la pénicilline, l'ampicilline, la carbénicilline et la ticarcilline. Sensibilité probable à la céfalotine, la méticilline, l'oxacilline, la nafcilline et d'autres pénicillines résistantes à la pénicillinase.*
<i>Haemophilus influenzae</i>	Positif	1 min	Résistant à l'ampicilline. Sensible aux céphalosporines.*
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> et <i>Moraxella catarrhalis</i>	Positif	1 min	Résistant à la pénicilline.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positif	5 min	Résistant à la pénicilline et l'ampicilline.
Bactéries anaérobies	Positif	30 min	Identification probable de <i>Bacteroides</i> spp. Résistance probable à la pénicilline et résistance possible aux céphalosporines, y compris la céfotaxime et, plus rarement, la céfoxitine.

\* Confirmer la sensibilité par des tests de sensibilité basés sur la croissance bactérienne. Les résultats négatifs laissent présager mais ne garantissent pas la sensibilité.

## LIMITES DE LA PROCEDURE

L'efficacité de ce test pour la prévision de la résistance aux  $\beta$ -lactamines des microorganismes autres que *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, les staphylocoques, les entérocoques et certaines bactéries anaérobies n'est pas établie.

Une résistance aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines a été rapportée en de rares occasions chez certains des microorganismes précédents sans production de  $\beta$ -lactamases.<sup>30,31</sup> Dans ces cas, d'autres mécanismes de résistance comme des barrières de perméabilité ont été avancés. Par conséquent, le test des  $\beta$ -lactamases doit être envisagé comme un test complémentaire rapide et non comme un test de sensibilité conventionnel de substitution.

Chez certaines souches de staphylocoques,<sup>13</sup> en particulier *S. epidermidis*, une  $\beta$ -lactamase inductible a été décrite, qui pourrait entraîner une réaction faussement négative lors de la détection de la  $\beta$ -lactamase chez une souche résistante à la pénicilline ou l'ampicilline.

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES SPECIFIQUES

Dans une étude comparative de quatre méthodes de détection de l'activité  $\beta$ -lactamase chez les bactéries anaérobies, les pourcentages suivants de concordance avec un " standard " employant un papier filtre saturé de nitrocéfine ont été obtenus : Cefinase, 100 % ; pyridine-2-azo-p-diméthylaniline céphalosporine, 96 % ; un disque de pénicillinase utilisant du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH, 72 % ; la technique iodométrique à lame, 78 %.<sup>32</sup>

## CONDITIONNEMENT

No réf. Description  
231650 BBL Cefinase Discs, une cartouche de 50 disques

REFERENCES: voir la rubrique "References" du texte anglais

# BD BBL Paper Discs for the Detection of $\beta$ -Lactamase Enzymes Cefinase Discs

Deutsch

## VERWENDUNGSZWECK

Cefinase Discs (Cefinase-Blättchen) sind für den Schnelldurchweis der  $\beta$ -Lactamaseproduktion bei isolierten Kolonien von *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus*-Spezies, *Haemophilus influenzae*, Enterokokken und anaeroben Bakterien vorgesehen.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Seit langem ist die Fähigkeit bestimmter Bakterien bekannt, Enzyme zu produzieren, die  $\beta$ -Lactam-haltige Antibiotika - also Penicilline und Cephalosporine - deaktivieren. Abraham und Chain erkannten im Jahr 1940 zum ersten Mal eine enzymatische Aktivität in *Escherichia coli*-Extrakten, die Penicillin deaktiviert.<sup>1</sup> Seither wurde bei einer Reihe bakterieller Spezies eine große Zahl ähnlicher Enzyme isoliert, die jeweils leicht differierende Substrateigenschaften aufweisen. Einige diese Enzyme hydrolysieren selektiv Antibiotika der Penicillin-Klasse (d. h. Penicillin G, Ampicillin, Carbenicillin) und werden als Penicillinasen bezeichnet. Andere hydrolysieren selektiv Antibiotika der Cephalosporin-Klasse (d. h. Cephalothin, Cefalexin, Cefradin) und werden als Cephalosporinasen bezeichnet. Eine weitere Gruppe von Enzymen hydrolysiert sowohl Cephalosporine als auch Penicilline.<sup>2</sup>

Verschiedene Arzneimittelhersteller haben eine beträchtliche Anzahl von  $\beta$ -Lactamase-resistenten Antibiotika der Penicillin- und Cephalosporin-Klasse entwickelt. Dazu gehören die halbsynthetischen Penicilline Methicillin, Oxacillin, Nafcillin und andere, die resistent gegen die von Staphylokokken produzierten Penicillinasen sind.<sup>3</sup> Auch zahlreiche Cephalosporine mit unterschiedlich ausgeprägter Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamasen wurden entwickelt. Hierzu gehören die Cephalosporine der 2. Generation (Cefoxitin, Cefamandol und Cefuroxim) und der 3. Generation (Cefotaxim, Moxalactam, Cefoperazon und andere).<sup>4</sup>

Für den Nachweis von  $\beta$ -Lactamasen wurden mehrere klinische Tests entwickelt. Diese Tests liefern rasche prädiagnostische Informationen über eine mögliche Resistenzentwicklung. Bei der Interpretation der Ergebnisse von  $\beta$ -Lactamase-Tests ist Folgendes zu berücksichtigen: die Empfindlichkeit des Tests gegenüber verschiedenen Enzymklassen der  $\beta$ -Lactamasen, die  $\beta$ -Lactamasearten, die von verschiedenen taxonomischen Mikroorganismengruppen produziert werden, sowie die spezifischen Substrateigenschaften unterschiedlicher  $\beta$ -Lactamasen.

Die am häufigsten verwendeten klinischen Verfahren sind die jodometrische und die azidometrische Methode sowie eine Reihe chromogener Substrate.<sup>5</sup> Die jodometrischen und die azidometrischen Tests werden normalerweise mit Penicillin als Substrat durchgeführt und können daher nur Enzyme nachweisen, die Penicillin hydrolysieren. Bei einem der chromogenen Cephalosporine, nämlich PADAC (Calbiochem-Behring), wurde festgestellt, dass mit seiner Hilfe die meisten bekannten  $\beta$ -Lactamasen wirksam nachgewiesen werden können, mit Ausnahme einiger Penicillinasen, die von Staphylokokken produziert werden, sowie einiger  $\beta$ -Lactamasen, die von anaeroben Bakterien produziert werden.<sup>6</sup> Bei einem weiteren chromogenen Cephalosporin, Nitrocefin (Glaxo Research), wurde festgestellt, dass sich damit alle bekannten  $\beta$ -Lactamasen, einschließlich Staphylokokken-Penicillinasen nachweisen lassen.<sup>7-9</sup>

Bei vielen taxonomischen Mikroorganismengruppen, zum Beispiel Enterobacteriaceae, ist der  $\beta$ -Lactamase-Test von geringem Wert, weil innerhalb einer Gruppe oder sogar innerhalb eines einzigen Stammes die unterschiedlichsten  $\beta$ -Lactamasen mit unterschiedlicher Substratspezifität produziert werden können.<sup>10</sup>

Bei anderen Bakterien, beispielsweise bei Penicillin-resistenten *Neisseria gonorrhoeae*,<sup>11</sup> *Staphylococcus aureus*,<sup>12,13</sup> *Moraxella catarrhalis*<sup>14</sup> und Ampicillin-resistenten *Haemophilus influenzae*,<sup>5,9,15</sup> produzieren die resistenten Stämme nur eine Klasse von Enzymen.  $\beta$ -Lactamase-Tests bei diesen Organismen ermöglichen die Vorhersage einer Resistenz unmittelbar nach der Erstsolierung, 18 bis 24 h bevor die Ergebnisse von wachstumsabhängigen Empfindlichkeitsprüfungen vorliegen würden.

Zwar scheint das Vorkommen von  $\beta$ -Lactamase-produzierenden Enterokokken gering zu sein, doch könnte eine geringe Konzentration im Inokulum dazu führen, dass resistente Stämme in Empfindlichkeitsprüfungen nicht erkannt werden, weshalb routinemäßiges Screening mit dem Nitrocefin-Blättchen-Verfahren zu empfehlen ist.<sup>16</sup>

Bei anaeroben Bakterien ist die Beziehung zwischen der  $\beta$ -Lactamase-Produktion und der Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam-haltigen Antibiotika kompliziert, ähnlich wie bei *Enterobacteriaceae*.  $\beta$ -Lactamasen finden sich am häufigsten bei *Bacteroides*-Spezies,<sup>17</sup> jedoch sind auch  $\beta$ -Lactamase-produzierende Stämme von *Clostridium butyricum*, *C. perfringens* und *Fusobacterium*-Stämme bekannt.<sup>18,19</sup> In der *Bacteroides*-Gruppe können diverse Enzyme mit unterschiedlichen Substratspezifitäten produziert werden. Die  $\beta$ -Lactamasen, die häufig in *Prevotella-melaninogenica*- und *P. oralis*-Stämmen auftreten, sind gewöhnlich Penicillin-spezifisch (Penicillinase),<sup>20</sup> während es sich bei den  $\beta$ -Lactamasen, die häufig in der *B.-fragilis*-Gruppe zu finden sind, um Cephalosporinasen handelt.<sup>21,22</sup> In der *B.-fragilis*-Gruppe sind eine Reihe verschiedener Cephalosporinasen bekannt; hierzu gehören einige sehr aktive Enzyme, die auch einige angeblich  $\beta$ -Lactamase-resistente Cephalosporine wie z. B. Cefotaxim hydrolysieren können.<sup>23,24</sup> Einige selten auftretende Stämme, die alle bekannten  $\beta$ -Lactame, einschließlich Cefoxitin sehr schnell hydrolysieren, sind ebenfalls bekannt.<sup>24,25</sup>

Die  $\beta$ -Lactamasen, die von der *B.-fragilis*-Gruppe produziert werden, sind zwar gegen Cephalosporine am stärksten aktiv, jedoch erweisen sich die meisten Stämme in wachstumsbasierten Empfindlichkeitsprüfungen gegen Penicillin, Carbenicillin und Ampicillin resistent.<sup>17,26</sup> Dieser Befund deutet darauf hin, dass die *B.-fragilis*-Gruppe aufgrund von Faktoren wie Permeabilitätsbarrieren<sup>22</sup> intrinsisch resistent gegen Penicilline ist, oder dass die  $\beta$ -Lactamase in ausreichend großen Mengen gebildet wird, um die relativ langsame Hydrolysegeschwindigkeit der Enzyme mit Penicillinen zu überwinden. Belege für eine Beteiligung der  $\beta$ -Lactamase an der Penicillinresistenz finden sich in Berichten darüber, dass eine Kombination von Clavulansäure (einem  $\beta$ -Lactamase-Hemmer) und Penicillinen um ein Vielfaches wirksamer gegen *B. fragilis* ist als Penicillin allein.<sup>27</sup>

Was auch immer die Ursache der Penicillinresistenz von *B. fragilis* sein mag, es sollten vermutlich alle Stämme als resistent betrachtet werden.<sup>28</sup> Die anderen gramnegativen anaeroben Stämme sind vermutlich Penicillin-empfindlich, solange sie  $\beta$ -Lactamase-negativ sind.<sup>28</sup>

## VERFAHRENSGRUNDLAGEN

**Cefinase Discs** sind mit dem chromogenen Cephalosporin Nitrocefin imprägniert. Bei dieser Verbindung beobachtet man einen sehr raschen Farbumschlag von gelb nach rot, wenn die Amidbindung im  $\beta$ -Lactam-Ring durch eine  $\beta$ -Lactamase hydrolysiert wird. Wenn ein Bakterium dieses Enzym in signifikanten Mengen produziert, verfärbt sich das gelbe Blättchen dort rot, wo das Isolat ausgestrichen wird.

Es können zwar auch andere Penicilline oder Cephalosporine als Substrate für spezifische Enzyme verwendet werden, doch Nitrocefin besitzt das breite Empfindlichkeits- und Wirkungsspektrum der handelsüblichen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Reaktionen mit anderen mikrobiellen Enzymen sind nicht bekannt.<sup>29</sup>

Jedes Blättchen ist für den Test eines Bakterienstamms auf das Vorhandensein von  $\beta$ -Lactamasen bestimmt.

## REAGENZIEN

Mit Nitrocefin imprägnierte **Cefinase Discs**.

### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

*In-vitro*-Diagnostikum.

Diese Blättchen sind nicht zur Verwendung in Empfindlichkeitsprüfungen bestimmt.

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise und der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen erfolgen. Präparierte Agarplatten und sonstige kontaminierte Materialien nach der Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Nitrocefin erzeugt bei bestimmten Bakterienstämmen Mutationen (Ames-Test) und kann sensibilisierend wirken. Die Aufnahme über den Mund oder die Atemwege sowie Haut- und Augenkontakt sind zu vermeiden.

**Aufbewahrung:** Die ungeöffnete Packung nach Erhalt bei -20 bis +8 °C lagern. Nach Gebrauch sollte die **Cefinase**-Kartusche in einem luftdichten Glasbehälter mit Trockenmittel bei -20 bis +8 °C gelagert werden. Unbenutzte **Cefinase**-Blättchen 60 Tage nach Öffnen des Blisterpacks verworfen. Das auf der Kartusche angegebene Verfallsdatum gilt nur für in ungeöffneten und unbeschädigten Blisterpacks aufbewahrte Blättchen.

**Anzeichen von Produktverfall:** Inhalt der Kassette nicht verwenden, wenn die Blättchen-Tests orange oder rot aussehen.

## PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Dieses Verfahren darf nicht direkt mit klinischen Proben oder Proben mit mikrobiologischer Mischflora verwendet werden. Die zu testenden Bakterien müssen zunächst als separate Kolonien isoliert werden, indem die Proben auf geeigneten Kulturplatten ausgestrichen werden.

## VERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Cefinase Discs, 50 Stück pro Kartusche.

**Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Zusätzliche Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte, die für dieses Verfahren gebraucht werden.

### Testverfahren:

1. Mit einem Einzelblättchenspender die benötigte Anzahl Blättchen aus der Kartusche auf eine leere Petrischale oder einen Objektträger aufbringen.
2. Die Blättchen einzeln mit einem Tropfen destilliertem Wasser befeuchten.
3. Mit einer sterilen Öse oder einem sterilen Stäbchen mehrere gut isolierte, ähnliche Kolonien abheben und auf einer Blättchenfläche ausstreichen.
4. Blättchen auf Farbumschlag untersuchen.
5. Alternative Methode: Ein Blättchen mit einer Pinzette mit einem Tropfen destilliertem Wasser befeuchten und das Blättchen dann über eine Kolonie ziehen.

**Qualitätssicherung durch den Anwender:** Für jede Gruppe unbekannter Proben sollte eine Kontrollkultur mit untersucht werden. Die folgenden Mikroorganismen werden als Teststämme empfohlen.

Teststamm	Zu erwartende Ergebnisse
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Positiv
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Negativ

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder der Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie den Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Es wird empfohlen, die korrekten Qualitätskontrollverfahren den geltenden NCCLS-Richtlinien und CLIA-Bestimmungen zu entnehmen.

## ERGEBNISSE UND ERGEBNISINTERPRETATION

Eine positive Reaktion besteht aus einem Farbumschlag von gelb nach rot in dem Bereich, auf dem die Kultur aufgebracht wurde. Hinweis: Der Farbumschlag betrifft normalerweise nicht das gesamte Blättchen. Bei einem negativen Resultat ist auf dem Blättchen kein Farbumschlag zu beobachten.

Die meisten Bakterienstämme entwickeln innerhalb von 5 min positive Ergebnisse. Bei einigen Staphylokokken kann die Entwicklung eines positiven Ergebnisses jedoch bis zu 1 h dauern.

Organismus	Ergebnis	Ungefähre Reaktionszeit	Interpretation
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positiv	1 h	Resistent gegen Penicillin, Ampicillin, Carbenicillin und Ticarcillin. Wahrscheinlich empfindlich gegen Cephalothin, Methicillin, Oxacillin, Nafcillin und andere Penicillinase-resistente Penicilline.*
<i>Haemophilus influenzae</i>	Positiv	1 min	Resistent gegen Ampicillin. Empfindlich gegen Cephalosporine.*
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> und <i>Moraxella catarrhalis</i>	Positiv	1 min	Resistent gegen Penicillin.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positiv	5 min	Resistent gegen Penicillin und Ampicillin.
Anaerobe Bakterien	Positiv	30 min	Wahrscheinliche Identifikation: <i>Bacteroides</i> -Spezies. Vermutlich resistent gegen Penicillin und evtl. resistent gegen Cephalosporine, einschließlich Cefotaxime und in seltenen Fällen Cefoxitin.

\* Die Empfindlichkeit sollte mit Hilfe von wachstumsabhängigen Empfindlichkeitsprüfungen bestätigt werden.

Negative Ergebnisse implizieren eine Empfindlichkeit, bieten jedoch keine Gewähr.

## VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Die Wirksamkeit dieses Tests zur Vorhersage der  $\beta$ -Lactam-Resistenz von anderen Mikroorganismen als *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, Staphylokokken, Enterokokken und bestimmten anaeroben Bakterien ist nicht erwiesen.

In seltenen Fällen wurde über eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam-haltigen Antibiotika bei einigen der genannten Mikroorganismen auch ohne Produktion von  $\beta$ -Lactamasen berichtet.<sup>30,31</sup> In diesen Fällen geht man von Resistenzmechanismushypothesen wie zum Beispiel Permeabilitätsschranken aus. Daher sollte der  $\beta$ -Lactamase-Test als Supplement-Schnelltest eingesetzt werden und nicht als Ersatz für konventionelle Empfindlichkeitsprüfungen.

Für einige Staphylokokkenstämme,<sup>13</sup> insbesondere *S. epidermidis*, wurde eine induzierbare  $\beta$ -Lactamase beschrieben, die zu einer falsch negativen  $\beta$ -Lactamase-Reaktion bei Stämmen führen kann, die gegenüber Penicillin oder Ampicillin resistent ist.

## SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Bei einer Vergleichstudie von vier Methoden zum Nachweis der Aktivität von  $\beta$ -Lactamase bei anaeroben Bakterien wurden die folgenden prozentualen Übereinstimmungen mit einem "Standard", bestehend aus einem mit Nitrocefin gesättigten Filterpapier, festgestellt: **Cefinase** (100 %), Pyridin-2-azo-p-Dimethylanilin-Cephalosporin (96 %), ein Penicillinase-Blättchen mit Bromkresolpurpur-pH-Indikator (72 %) und Jodometrie auf Objektträger (78 %).<sup>32</sup>

## LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
231650	BBL Cefinase Discs, eine Kartusche mit 50 Blättchen

**LITERATUR:** S. "References" im englischen Text.

# BD BBL Paper Discs for the Detection of $\beta$ -Lactamase Enzymes Cefinase Discs

Italiano

## USO PREVISTO

I dischi Cefinase sono utilizzati nei test rapidi di colonie isolate di *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus* spp, *Haemophilus influenzae*, enterococchi e batteri anaerobi per la rilevazione della produzione di  $\beta$ -lattamasi.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

È nota da tempo la capacità di alcuni batteri di produrre enzimi in grado di disattivare gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, come le penicilline e le cefalosporine. Nel 1940, Abraham e Chain individuarono per la prima volta negli estratti di *Escherichia coli* un'attività enzimatica in grado di disattivare la penicillina.<sup>1</sup> Da allora, sono stati isolati da varie specie batteriche numerosi enzimi simili con specificità di substrato leggermente diverse. Alcuni enzimi che idrolizzano selettivamente gli antibiotici della classe delle penicilline (es. penicillina G, ampicillina, carbenicillina) vengono chiamati penicillinasi. Altri enzimi che idrolizzano gli antibiotici della classe delle cefalosporine (ad es. cefalotina, cefalexina, cefradina) vengono chiamati cefalosporinasi. Esistono anche altri enzimi che idrolizzano sia le cefalosporine che le penicilline.<sup>2</sup>

Svariate case farmaceutiche hanno sviluppato una vasta gamma di antibiotici della classe delle penicilline e cefalosporine resistenti alle  $\beta$ -lattamasi. Uno di questi gruppi include le penicilline semisintetiche (meticillina, oxacillina, nafcillina e altre) che sono resistenti alle penicillinasi prodotte dagli stafilococchi.<sup>3</sup> Sono state sviluppate anche numerose cefalosporine con diversi livelli di resistenza alle  $\beta$ -lattamasi, che includono le cefalosporine di seconda generazione (cefotaxim, cefamandolo e cefuroxime e le cefalosporine di terza generazione (cefotaxime, moxalactam, cefoperazone e altre).<sup>4</sup>

Per la rilevazione delle  $\beta$ -lattamasi, sono state sviluppati vari test clinici che permettono di ottenere rapidamente informazioni predittive dello sviluppo della resistenza. Nell'interpretare i risultati dei test delle  $\beta$ -lattamasi, occorre prendere in considerazione la sensibilità del test alle diverse classi di  $\beta$ -lattamasi, i tipi di  $\beta$ -lattamasi prodotti da diversi gruppi tassonomici di organismi e le specificità del substrato delle diverse  $\beta$ -lattamasi.

Le procedure cliniche più comuni includono il metodo iodometrico, il metodo acidometrico e svariati substrati cromogeni.<sup>5</sup> I test iodometrici e acidometrici sono normalmente eseguiti usando come substrato la penicillina e possono quindi rilevare solamente gli enzimi che idrolizzano la penicillina. Una delle cefalosporine cromogene, PADAC (Calbiochem-Behring) è risultata efficace per individuare la maggior parte delle  $\beta$ -lattamasi note, ad eccezione di alcune penicillinasi prodotte da stafilococco e di alcune  $\beta$ -lattamasi prodotte da batteri anaerobi.<sup>6</sup> Un'altra cefalosporina cromogena, il nitrocefina (Glaxo Research), è risultata efficace per l'individuazione di tutte le  $\beta$ -lattamasi note, incluse le penicillinasi stafilococche.<sup>7-9</sup>

Per molti gruppi tassonomici di organismi, ad esempio per le *Enterobacteriaceae*, il test della  $\beta$ -lattamasi ha scarso valore in quanto è possibile che svariate  $\beta$ -lattamasi con differenti specificità di substrato vengano prodotte all'interno del gruppo e perfino all'interno di un singolo ceppo.<sup>10</sup>

In altri batteri, come ad esempio *Neisseria gonorrhoeae* resistente alla penicillina,<sup>11</sup> *Staphylococcus aureus*,<sup>12,13</sup> *Moraxella catarrhalis*<sup>14</sup> e *Haemophilus influenzae* resistente all'ampicillina,<sup>5,9,15</sup> i ceppi resistenti producono solo una classe di enzimi. Il test della  $\beta$ -lattamasi eseguito con questi organismi permette di prevedere immediatamente la resistenza dopo il primo isolato, 18 - 24 h prima che siano disponibili i risultati della sensibilità legata alla crescita.

Poiché la prevalenza di enterococchi produttori di  $\beta$ -lattamasi è limitata, una bassa concentrazione di inoculo può impedire la rilevazione dei ceppi nei test di sensibilità e si raccomanda quindi la procedura con disco di nitrocefina.<sup>16</sup>

Nel caso dei batteri anaerobi, il rapporto tra produzione di  $\beta$ -lattamasi e resistenza agli antibiotici  $\beta$ -lattamici è alquanto complesso e relativamente simile a quello delle *Enterobacteriaceae*. Le  $\beta$ -lattamasi sono rilevate soprattutto in *Bacteroides* spp,<sup>17</sup> sebbene siano stati riportati ceppi di *Clostridium butyricum*, *C. perfringens* e *Fusobacterium* sp. produttori di  $\beta$ -lattamasi.<sup>18,19</sup> Nel gruppo *Bacteroides* è possibile che vengano prodotti svariati enzimi con differenti specificità di substrato. Le  $\beta$ -lattamasi spesso rilevate nei ceppi di *Prevotella melaninogenica* e *P. oralis* sono generalmente specifiche per le penicilline (penicillinasi),<sup>20</sup> mentre le  $\beta$ -lattamasi comunemente riscontrate nel gruppo *B. fragilis* sono cefalosporinasi.<sup>21,22</sup> Nel gruppo *B. fragilis* sono state osservate svariate cefalosporinasi che includono alcuni enzimi molto attivi in grado di idrolizzare alcune cefalosporine con nota resistenza alla  $\beta$ -lattamasi, come il cefotaxime.<sup>23,24</sup> Sono stati osservati alcuni rari ceppi che idrolizzano molto attivamente tutti gli antibiotici  $\beta$ -lattamici, incluso il cefotaxim.<sup>24,25</sup>

Sebbene le  $\beta$ -lattamasi prodotte dal gruppo *B. fragilis* siano le più attive contro le cefalosporine, nei test di sensibilità legata alla crescita, la maggior parte dei ceppi risulta resistente a penicillina, carbenicillina e ampicillina.<sup>17,26</sup> Questi risultati suggeriscono la possibilità che il gruppo *B. fragilis* sia intrinsecamente resistente alle penicilline grazie a fattori come le barriere di permeabilità,<sup>22</sup> o che la  $\beta$ -lattamasi venga prodotta in quantità sufficiente a superare l'idrolisi relativamente lenta dell'enzima con le penicilline. I dati riportati riguardo all'aumentata attività delle penicilline contro *B. fragilis* se combinate con acido clavulanico (un inibitore della  $\beta$ -lattamasi), tendono a confermare l'evidenza di un fattore coadiuvante della  $\beta$ -lattamasi nella resistenza alle penicilline.

Indipendentemente dalla causa o dalle cause della penicillino-resistenza di *B. fragilis*, tutti i ceppi sono quasi certamente da considerare come resistenti.<sup>28</sup> Gli altri ceppi anaerobi gram-negativi sono probabilmente sensibili alla penicillina, purché siano  $\beta$ -lattamasi negativi.<sup>28</sup>

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il disco Cefinase è impregnato di nitrocefina, una cefalosporina cromogena. Questo composto vira rapidamente dal giallo al rosso quando il legame ammidico nell'anello  $\beta$ -lattamico viene idrolizzato da una  $\beta$ -lattamasi. Quando un batterio produce quantità significative di questo enzima, il disco giallo vira al rosso nell'area in cui si trova lo striscio di isolato.

Sebbene sia possibile usare altre penicilline e cefalosporine come substrati per enzimi specifici, il nitrocefina presenta l'ampio spettro di sensibilità degli antibiotici  $\beta$ -lattamici disponibili in commercio. Non sono state rilevate reazioni del prodotto con altri enzimi batterici.<sup>29</sup>

Ciascun disco viene usato per rilevare la presenza di  $\beta$ -lattamasi in un ceppo batterico.

## REAGENTI

Dischi Cefinase impregnati di nitrocefina.

### Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Questi dischi non sono destinati all'uso in test di sensibilità.

Durante tutte le procedure, osservare tecniche asettiche e le precauzioni stabilite contro i rischi microbiologici. Dopo l'uso, conservare la cartuccia Cefinase tra -20 e +8 °C, in un qualsiasi recipiente di vetro a tenuta d'aria, contenente essiccante. Eliminare i rimanenti dischi Cefinase dopo 60 giorni dall'apertura della confezione blister. La data di scadenza indicata sulla cartuccia si riferisce solo ai dischi intatti nel contenitore blister non aperto.

Il nitrocefina induce mutazioni in alcuni ceppi batterici (test di Ames) e può essere sensibilizzante. Evitare l'ingestione, l'inalazione o il contatto con la pelle o con gli occhi.

**Modalità di conservazione** - Alla consegna, conservare la confezione chiusa a temperatura tra -20 e +8 °C. Dopo l'uso, conservare la cartuccia Cefinase tra -20 e +8 °C, in un qualsiasi recipiente di vetro a tenuta d'aria, contenente essiccante. Eliminare i rimanenti dischi Cefinase dopo 60 giorni dall'apertura della confezione blister. La data di scadenza indicata sulla cartuccia si riferisce solo ai dischi intatti nel contenitore blister non aperto.

**Segni di deterioramento** - Non usare la cartuccia se i dischi presentano un colore arancione o rosso.

## RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Non usare questa procedura direttamente con campioni clinici o altri terreni contenenti flora batterica mista. I batteri da testare devono essere prima isolati come colonie separate eseguendo uno striscio del campione su piastre con terreno di coltura appropriato.

## PROCEDURA

**Materiale fornito** - Dischi Cefinase, 50 per cartuccia

**Materiali richiesti ma non forniti** - Reagenti accessori, organismi per controllo di qualità e attrezzatura di laboratorio necessari per la procedura.

### Procedura del Test

1. Con un dispensatore per disco singolo, trasferire il numero stabilito di dischi dalla cartuccia ad una capsula di Petri vuota o ad un vetrino per microscopio.
2. Inumidire ogni disco con una goccia di acqua purificata.
3. Con un'ansa o un bastoncino applicatore sterile rimuovere alcune colonie simili ben isolate e strisciarle sulla superficie di un disco.
4. Osservare il cambiamento di colore del disco.
5. Procedura alternativa - Trattenendo il disco con le pinze, inumidirlo con una goccia di acqua purificata e strisciarlo quindi sulla colonia.

**Controllo di qualità a cura dell'utente** - Testare colture di controllo standard parallelamente a ciascun gruppo di colonie sconosciute. Si consiglia di usare i seguenti microrganismi: se lo correggi qui, correggi ovunque come ceppi di test.

Ceppo	Risultati attesi
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Positivo
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Negativo

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per informazioni sulla prassi appropriata di controllo di qualità, si raccomanda all'utente di consultare le direttive NCCLS e le norme CLIA.

## RISULTATI E INTERPRETAZIONE

Il viraggio dal giallo al rosso nell'area di applicazione della coltura indica una reazione positiva. N.B. Il cambiamento di colore non si verifica generalmente sull'intero disco. L'assenza di viraggio sul disco indica una reazione negativa.

Per la maggior parte dei ceppi batterici, il risultato positivo si sviluppa entro 5 min. Tuttavia, per alcuni stafilococchi le reazioni positive possono impiegare fino a 1 h per svilupparsi.

Microrganismo	Risultato	Durata approssimativa della reazione	Interpretazione
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo	1 h	Resistente a penicillina, ampicillina, carbenicillina e ticarcillina. Probabilmente sensibile a cefalotina, meticillina, oxacillina, nafcillina e ad altre penicilline resistenti alla penicillinasi.*
<i>Haemophilus influenzae</i>	Positivo	1 min	Resistente all'ampicillina. Sensibile alle cefalosporine.*
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Moraxella catarrhalis</i>	Positivo	1 min	Resistente alla penicillina.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positivo	5 min	Resistente a penicillina e ampicillina.
Batteri anaerobi	Positivo	30 min	L'identificazione probabile è <i>Bacteroides</i> spp. Resistenza probabile alla penicillina e resistenza possibile alle cefalosporine, incluso il cefotaxime, raramente il cefotixin.

\* La sensibilità deve essere confermata da test di sensibilità legati alla crescita. I risultati negativi indicano ma non garantiscono la sensibilità.

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Non è stata provata l'efficacia di questo test per prevedere la resistenza  $\beta$ -lattamica da parte di microrganismi diversi da *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, stafilococchi, enterococchi e alcuni batteri anaerobi.

In rare occasioni, in alcuni dei microrganismi sopra elencati è stata riportata una resistenza ad antibiotici  $\beta$ -lattamici senza produzione di  $\beta$ -lattamasi.<sup>30,31</sup> In questi casi, è stata avanzata l'ipotesi di meccanismi di resistenza come barriere di permeabilità. Di conseguenza, il test della  $\beta$ -lattamasi deve essere usato solo come test rapido supplementare e non in sostituzione dei test di sensibilità tradizionali.

Per alcuni ceppi di stafilococchi,<sup>13</sup> in particolare per *S. epidermidis*, è stata descritta una  $\beta$ -lattamasi inducibile che potrebbe dar luogo ad una reazione di  $\beta$ -lattamasi falsa negativa con un ceppo resistente a penicillina o ampicillina.

#### PRESTAZIONI SPECIFICHE DELLA METODICA

In uno studio comparativo di quattro metodi per l'individuazione di attività della  $\beta$ -lattamasi in batteri anaerobi, sono state ottenute le seguenti percentuali di concordanza con uno "standard" di carta filtro saturata con nitrocefina. Cefinase, 100%; piridina -2-azo-p-dimetilanilina cefalosporina, 96%; disco di penicillinasi con indicatore di pH a base di porpora di bromcresolo, 72%; metodo iodometrico su vetrino, 78%.<sup>32</sup>

#### DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
231650	BBL Cefinase Discs, una cartuccia da 50 dischi

**BIBLIOGRAFIA:** Vedere "References" nel testo inglese.

## BD BBL Paper Discs for the Detection of $\beta$ -Lactamase Enzymes Cefinase Discs

Español

#### USO PREVISTO

Los discos Cefinase están diseñados para su uso en el análisis rápido de colonias aisladas de *Neisseria gonorrhoeae*, la especie *Staphylococcus*, *Haemophilus influenzae*, enterococos y bacterias anaerobias con el fin de determinar la producción de  $\beta$ -lactamasa.

#### RESUMEN Y EXPLICACION

Se conoce desde hace tiempo la capacidad de ciertas bacterias de producir enzimas que inactivan a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, es decir, las penicilinas y las cefalosporinas. En 1940, Abraham y Chain determinaron por primera vez una actividad enzimática en extractos de *Escherichia coli* que inactivaban la penicilina<sup>1</sup>. Desde entonces, se ha aislado un gran número de enzimas similares a partir de diversas especies bacterianas con especificidades de sustrato algo diferentes. Algunas hidrolizan selectivamente los antimicrobianos de la clase de las penicilinas (es decir, bencilpenicilina, ampicilina, carbenicilina), y se las ha denominado penicilinasas. Otras hidrolizan selectivamente los antimicrobianos de la clase de las cefalosporinas (es decir, cefalotina, cefalexina, cefradina) y se las ha denominado cefalosporinasas. Incluso otras enzimas hidrolizan tanto a las cefalosporinas como a las penicilinas<sup>2</sup>.

Diversas compañías farmacéuticas han desarrollado un gran número de antimicrobianos de la clase de las penicilinas y las cefalosporinas resistentes a las  $\beta$ -lactamasas. Un grupo de estos agentes está constituido por las penicilinas semisintéticas (metilicina, oxacilina, nafcilina y otras) que son resistentes a las enzimas de tipo penicilinasas producidas por los estafilococos<sup>3</sup>. También se han desarrollado numerosas cefalosporinas que presentan grados variables de resistencia a las  $\beta$ -lactamasas. Entre ellas se incluyen las cefalosporinas de segunda generación (cefotaxima, cefamandol y cefuroxima) y las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, moxalactam, cefoperazona y otras)<sup>4</sup>.

Se han desarrollado diversas pruebas clínicas para la detección de  $\beta$ -lactamasas. Estas pruebas proporcionan una información rápida que predice el desarrollo de resistencia. La interpretación de los resultados de la prueba de la  $\beta$ -lactamasa debe tener en cuenta los siguientes factores: la sensibilidad de la prueba para las diferentes clases de enzimas de tipo  $\beta$ -lactamasa, los tipos de  $\beta$ -lactamasas producidos por diferentes grupos taxonómicos de microorganismos y las especificidades de sustrato de las diferentes  $\beta$ -lactamasas.

Los métodos clínicos de uso más habitual son el método iodométrico, el método acidométrico y diversos sustratos cromógenos<sup>5</sup>. Las pruebas iodométrica y acidométrica suelen realizarse utilizando penicilina como sustrato y, por consiguiente, sólo pueden detectar enzimas que hidrolizan a la penicilina. Se ha comprobado que una de las cefalosporinas cromógenas, PADAC (Calbiochem-Behring), es eficaz en la detección de la mayoría de las  $\beta$ -lactamasas conocidas, exceptuando algunas de las penicilinasas producidas por estafilococos y algunas  $\beta$ -lactamasas producidas por bacterias anaerobias<sup>6</sup>. Otra cefalosporina cromógena, nitrocefina (Glaxo Research), ha demostrado ser eficaz en la detección de todas las  $\beta$ -lactamasas conocidas, incluidas las penicilinasas estafilocócicas<sup>7-9</sup>.

Para muchos grupos taxonómicos de microorganismos, p. ej., *Enterobacteriaceae*, la prueba de la  $\beta$ -lactamasa es de escaso valor debido a que en el grupo, o incluso en una sola cepa, pueden producirse diversas enzimas de tipo  $\beta$ -lactamasa con diferentes especificidades de sustrato<sup>10</sup>.

En otras bacterias, p. ej., *Neisseria gonorrhoeae*<sup>11</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>12,13</sup>, *Moraxella catarrhalis*<sup>14</sup> resistentes a la penicilina y *Haemophilus influenzae*<sup>5,9,15</sup> resistente a la ampicilina, las cepas resistentes sólo producen una clase de enzima. La prueba de la  $\beta$ -lactamasa realizada con estos microorganismos permite realizar una predicción de la resistencia inmediatamente después del aislamiento primario, 18 - 24 h antes del momento en el que se dispondría de los resultados de sensibilidad dependientes del crecimiento.

Aunque la prevalencia de enterococos productores de  $\beta$ -lactamasa parece ser pequeña, un inóculo bajo puede hacer que las cepas no sean detectadas mediante los procedimientos de pruebas de sensibilidad, por lo que se recomienda el estudio sistemático mediante el procedimiento del disco de nitrocefina<sup>16</sup>.

En el caso de las bacterias anaerobias, la relación entre la producción de  $\beta$ -lactamasa y la resistencia a los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos es compleja, y en cierto grado similar a la observada para *Enterobacteriaceae*. Las betalactamasas se encuentran con mayor frecuencia en la especie *Bacteroides*<sup>17</sup>; no obstante, se han descrito cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa de *Clostridium butyricum*, *C. perfringens* y del género *Fusobacterium*<sup>18,19</sup>. El género *Bacteroides* puede producir diversas enzimas con distintas especificidades de sustrato. Las  $\beta$ -lactamasas que se encuentran habitualmente en las cepas de *Prevotella melaninogenica* y *P. oralis* suelen ser específicas de las penicilinas (penicilinasas)<sup>20</sup>, mientras que las  $\beta$ -lactamasas que suelen aparecer en el grupo de *B. fragilis* son cefalosporinasas<sup>21,22</sup>. En el grupo de *B. fragilis* se han descrito diversas cefalosporinasas, entre las que se incluyen algunas enzimas de elevada actividad, capaces de hidrolizar algunas de las cefalosporinas descritas como resistentes a las  $\beta$ -lactamasas, como cefotaxima<sup>23,24</sup>. Se han descrito cepas poco comunes que hidrolizan a altas tasas todos los betalactámicos, incluida la cefotaxima<sup>24,25</sup>.

Aunque las  $\beta$ -lactamasas producidas por el grupo de *B. fragilis* son más activas contra las cefalosporinas, se ha observado que la mayoría de las cepas son resistentes a la penicilina, la carbenicilina y la ampicilina en las pruebas de sensibilidad dependientes del crecimiento<sup>17,26</sup>. Este hallazgo sugiere que el grupo de *B. fragilis* puede ser intrínsecamente resistente a las penicilinas por medio de factores tales como barreras de permeabilidad<sup>22</sup>, o que se produce  $\beta$ -lactamasa en cantidades suficientes como para superar la tasa de hidrólisis relativamente lenta de la enzima con penicilinas. Un argumento a favor de la contribución de la  $\beta$ -lactamasa en la resistencia a las penicilinas queda reflejado en los informes que indican que la combinación de ácido clavulánico (un inhibidor de la  $\beta$ -lactamasa) con penicilinas tiene una actividad muchas veces mayor contra *B. fragilis* que la penicilina sola<sup>27</sup>.

Cualquiera que sea la causa de la resistencia a la penicilina observada en *B. fragilis*, probablemente debería considerarse que todas las cepas son resistentes a este agente<sup>28</sup>. Las otras cepas de anaerobios gramnegativos probablemente sean sensibles a la penicilina siempre que sean  $\beta$ -lactamasa negativas<sup>28</sup>.

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El disco Cefinase está impregnado con nitrocefina, una cefalosporina cromógena. Este compuesto presenta un cambio de color muy rápido de amarillo a rojo cuando la amida unida en el anillo  $\beta$ -lactámico es hidrolizada por acción de una  $\beta$ -lactamasa. Cuando una bacteria produce esta enzima en cantidades significativas, el disco de color amarillo se vuelve rojo en el área en la que se extiende la cepa.



Aunque pueden utilizarse otras penicilinas y cefalosporinas como sustratos para enzimas específicas, la nitrocefina presenta el amplio espectro de sensibilidad de los  $\beta$ -lactámicos comercialmente disponibles. Que se sepa, no reacciona con otras enzimas microbianas<sup>29</sup>.

Cada disco se utiliza para analizar una cepa bacteriana para determinar la presencia de  $\beta$ -lactamasa.

## REACTIVOS

Discos **Cefinase** impregnados con nitrocefina.

### Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Estos discos no están destinados para ser utilizados en pruebas de sensibilidad.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todos los procedimientos. Después de su uso, las placas preparadas y otros materiales contaminados deben esterilizarse mediante autoclave antes de desecharlos.

La nitrocefina induce mutaciones en ciertas cepas de bacterias (prueba de Ames) y puede ser sensibilizante. Deben evitarse la ingestión, la inhalación y el contacto con la piel y los ojos.

**Instrucciones de almacenamiento:** Al recibirlo, conservar el envase sin abrir a una temperatura entre -20 y 8 °C. Después de su uso, el cartucho **Cefinase** debe almacenarse en un recipiente de vidrio hermético que contenga desecante y conservarse a una temperatura entre -20 y 8 °C. Desechar los restantes discos **Cefinase** a los 60 días de la apertura del blíster. La fecha de caducidad del cartucho sólo hace referencia a los discos intactos en un blíster sin abrir.

**Signos de deterioro:** No utilizar el cartucho si los discos tienen color naranja o rojo.

## RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Este procedimiento no debe utilizarse directamente con muestras clínicas ni con otras fuentes que contengan flora microbiana mixta. Las bacterias que van a analizarse deben aislarse primero como colonias independientes extendiendo la muestra en placas con medios de cultivo adecuados.

## PROCEDIMIENTO

**Material suministrado:** discos **Cefinase**, 50 discos por cartucho.

**Materiales necesarios pero no suministrados:** reactivos auxiliares, microorganismos para control de calidad y equipo de laboratorio según requiera el procedimiento.

### Procedimiento de Análisis:

- Utilizando un dispensador para un solo disco, dispense el número necesario de discos del cartucho en una placa de Petri vacía o en un portaobjetos de microscopio.
- Humedecer cada disco con una gota de agua purificada.
- Con un lazo esterilizado o palillo de aplicación retirar varias colonias similares bien aisladas y extenderlas en la superficie de un disco.
- Observar el disco para determinar si se produce un cambio de color.
- Procedimiento alternativo: Utilizando unas pinzas, humedecer el disco con una gota de agua purificada y, a continuación, pasarlo por la colonia.

**Control de calidad del usuario:** Los cultivos de referencia de control deben analizarse con cada grupo de muestras desconocidas. Se recomiendan los siguientes microorganismos para su uso como cepas de prueba.

Cepa de prueba	Resultados previstos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Positiva
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Negativa

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de NCCLS y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

## RESULTADOS E INTERPRETACION

Una reacción positiva aparecerá como un cambio de color amarillo a rojo en el área en la que se aplicó el cultivo. Nota: el cambio de color no suele desarrollarse en todo el disco. Un resultado negativo consiste en que no hay cambio de color en el disco.

En la mayoría de las cepas, el resultado positivo aparece en 5 min. No obstante, las reacciones positivas para algunos estafilococos pueden tardar hasta 1 h en desarrollarse.

Organismo	Resultado	Tiempo de reacción aprox.	Interpretación
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positiva	1 h	Resistente a la penicilina, ampicilina, carbenicilina y ticarcilina. Probablemente sensible a la cefalotina, meticilina, oxacilina, nafcilina y otras penicilinas resistentes a la penicilinasas*.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Positiva	1 min	Resistente a la ampicilina. Sensible a las cefalosporinas*.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> y <i>Moraxella catarrhalis</i>	Positiva	1 min	Resistente a la penicilina.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Positiva	5 min	Resistente a la penicilina y ampicilina.
Bacterias anaerobias	Positiva	30 min	Identificación probable como de la especie <i>Bacteroides</i> . Probablemente resistente a la penicilina y puede ser resistente a las cefalosporinas, incluidas la cefotaxima y raramente la ceftioxitina.

\* La sensibilidad debe confirmarse mediante pruebas de sensibilidad dependientes del crecimiento. Los resultados negativos implican, pero no garantizan, la sensibilidad.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No se ha demostrado la eficacia de esta prueba en la predicción de la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos de microorganismos distintos de *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, estafilococos, enterococos y ciertas bacterias anaerobias.

Se ha descrito en ocasiones resistencia poco frecuente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en algunos de los microorganismos antes mencionados sin la producción de  $\beta$ -lactamasas<sup>30,31</sup>. En estos casos, se han propuesto mecanismos de resistencia tales como barreras de permeabilidad. Por consiguiente, la prueba de la  $\beta$ -lactamasa debe utilizarse como complemento rápido y no como sustituto de las pruebas de sensibilidad convencionales.

En algunas cepas de estafilococos<sup>13</sup>, en particular *S. epidermidis*, se ha descrito una  $\beta$ -lactamasa inducible que podría producir una reacción de  $\beta$ -lactamasa falsa negativa con una cepa resistente a la penicilina o a la ampicilina.


## CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO ESPECIFICAS


En un estudio comparativo de cuatro métodos para la detección de actividad de  $\beta$ -lactamasa en bacterias anaerobias, se obtuvieron los siguientes porcentajes de concordancia con un "estándar" empleando papel de filtro saturado en nitrocefina: **Cefinase**, 100 %; piridina-2-azo-p-dimetilanilina cefalosporina, 96 %; un disco de penicilinasas que utiliza un indicador de pH púrpura de bromocresol, 72 %; la prueba iodométrica con portaobjetos, 78 %<sup>32</sup>.

## DISPONIBILIDAD


Nº de cat.	Descripción
231650	<b>BBL Cefinase Discs</b> , un cartucho de 50 discos


**REFERENCIAS:** Ver "Referencias" en el texto en inglés.


 Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производител / Producător / Úretici / Proizvođač / Производитель / Атқарушы


 Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före / Используйте до / A se utiliza până la / Son kullanna tarhihi / Upotrebiti do / Использовать до / дейін пайдалануға / Upotrijebiti do /


YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /  
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /  
JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /  
AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /  
VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /  
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /  
JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /  
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /  
ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /  
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /  
MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mėnesio pabaiga) /  
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /  
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacu) /  
aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /  
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) /  
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /  
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /  
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /  
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /  
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /  
ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы) /  
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca) /


 Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalognummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Número de catálogo / Каталог номер / Număr de catalog / Katalog numarasi / Kataloški broj / Номер по каталору / Каталог номери


 Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Représentante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизирован представитель в EU / Représentant autorizat în Uniunea Europeană / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizirani predstavnik u EU

 In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiinaparatuur / Lääkinnäällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisai / In vitro diagnostisk medisk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diyagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Жасанды жағдайда жүргізілетін медициналық диагностика аспабы / Medicínska pomagala za In Vitro Dijagnostiku


 Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturlimit / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dovoljena temperatura


 Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (лот) / Топтама коды / Lot (kod)

 Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Innholder tilstrekkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contémo suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester / Съдържащието е достатъчно за <n> теста / Conține suficient pentru <n> teste / <n> testleri için yeterli miktarda içerir / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Достаточное для <n> тестов(a) / <n> төсттері үшін жеткілікті / Sadržaj za (n) testova

 Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobaczk instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu



 Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA  
800-638-8663  
[www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds)

 Benex Limited  
Rineanna House  
Shannon Free Zone  
Shannon, County Clare, Ireland

Nitrocefin is a product of Glaxo Research; distributed exclusively by BD Diagnostics.  
ATCC is a trademark of American Type Culture Collection.  
BD, BD Logo, BBL and Cefinase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. © 2010 BD.