

# PHENYLBORONIC ACID

## INSTRUKCJA UŻYCIA GOTOWEGO ODCZYNNIKA W PROBÓWCE ORAZ W BUTELCE

### 1. Przeznaczenie

Phenylboronic Acid to odczynnik służący do wykrywania karabpenemaz klasy A u bakterii z rzędu *Enterobacterales* oraz niefermentujących pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* i *Acinetobacter* wyizolowanych z próbek klinicznych pochodzących od człowieka oraz innych próbek metodą dyfuzyjno-krażkową zgodnie z zaleceniami EUCAST.

Rolą podłoża jest wspomaganie diagnozy zakażeń bakteryjnych na etapie oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności pałeczek Gram-ujemnych na antybiotyki.

Karbapenemazy należą do beta-laktamaz. Beta-laktamazy to enzymy hydrolizujące wiązanie amidowe w pierścieniu beta-laktamowym antybiotyków należących do grupy beta-laktamów. U bakterii Gram - ujemnych enzymy działają w przestrzeni peryplazmatycznej i uniemożliwiają dotarcie antybiotyku do białek PBP, które są miejscem docelowym działania antybiotyku. Karbapenemazy KPC hydrolizują wszystkie antybiotyki beta-laktamowe i występują najczęściej u pałeczek Gram-ujemnych z rzędu *Enterobacterales*, szczególnie u *Klebsiella pneumoniae*. Mogą występować również u innych gatunków, takich jak *Enterobacter cloacae* czy *Escherichia coli* a także u pałeczek niefermentujących z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, czy *Acinetobacter baumannii*.

Kwas fenyloboronowy służy do wykrywania karbapenemaz KPC, należących do beta-laktamaz klasy A według molekularnej klasyfikacji Amblera. Enzymy tej klasy, w centrum aktywnym zawierają serynę.

Nr kat.:	Rodzaj podłoża:	Opakowanie:
6153TB2	odczynnik płynny w probówce, gotowy do użycia	1x1 szt (2 ml)
6153TB2S		1x1 szt (2 ml)
3153BT50	odczynnik płynny w butelce	50 ml

### 2. Zasada działania

Kwas fenyloboronowy służy jako inhibitor  $\beta$ -laktamaz w testach fenotypowych na obecność KPC.

### 3. Skład podłoża

w g/l wody destylowanej:
Kwas fenyloboronowy 15,0 g

### pH -

Wygląd odczynnika – Odczynnik klarowny, bezbarwny

### 4. Przygotowanie odczynnika

Odczynnik w probówkach i butelkach jest gotowe do użycia.

### 5. Wyposażenie wymagane, nie dostarczone

Wyposażenie i odczynniki niezbędne do wykonania badania (np. sól fizjologiczna, wymazówki, krążki nasączone antybiotykami) oraz sprzęt mikrobiologiczny ogólnolaboratoryjny, w tym densytometr bakteriologiczny lub wzorzec gęstości i cieplarka laboratoryjna.

### 6. Środki ostrożności

- Produkt przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Produkt niezautomatyzowany.
- Nie należy używać odczynnika, jeżeli widoczne są oznaki skażenia mikrobiologicznego, wyschnięcia, pęknięcia lub inne oznaki pogorszenia jakości.

- Nie używać probówek, butelek uszkodzonych.
- Nie używać probówek, butelek po terminie ważności.
- W celu zapewnienia poprawnych wyników, należy postępować zgodnie z niniejszą instrukcją.
- W przypadku, gdy postępowanie z odczynnikiem podczas wykonywania będzie odbiegało od opisanego w niniejszej instrukcji, laboratorium jest zobowiązane do przeprowadzenia walidacji przyjętego postępowania.

## 7. Przechowywanie

Probówki i butelki z odczynnikiem należy przechowywać w temperaturze 6-25°C do upływu terminu ważności. Odczynnik przechowywać w oryginalnym opakowaniu, w pozycji pionowej z dala od bezpośredniego źródła światła.

## 8. Termin ważności

Odczynnik przechowywany w temperaturze 6-25°C zachowuje swoje właściwości 6 miesięcy od daty produkcji.

## 9. Materiał do badań

Materiałem do badań są czyste, świeże (ok. 16-24 godzinne) hodowle szczepów wyizolowane z próbek klinicznych pochodzących od człowieka posianych na podłoża stałe.

## 10. Sposób wykonania

Uwaga: W celu zapewnienia poprawnych, wiarygodnych wyników badania lekowrażliwości bakterii, należy ściśle przestrzegać aktualnych procedur i wytycznych.

1. Jeżeli odczynnik był przechowywany w warunkach chłodniczych, przed użyciem należy doprowadzić go do temperatury pokojowej.
2. Przygotować krążki meropenem + kwas fenyloboronowy, poprzez naniesienie na krążek meropenem 10 µg 20 µl roztworu i zostawić na 30 min w temperaturze pokojowej.
2. Przygotować zawiesinę badanego szczepu o gęstości 0,5 w skali McFarlanda, zawieszając kolonie szczepu w roztworze soli fizjologicznej. Kolonie pobrać sterylną eżą lub wymazówką z podłoża nioselektywnego, po 18-24 godzinnej hodowli. Należy wybrać kilka podobnych morfologicznie kolonii. Gęstość inokulum ustalić przy użyciu densytometru bakteriologicznego. Gęstość zawiesiny można także ustalić poprzez makroskopowe porównanie gęstości zawiesiny szczepu badanego ze wzorcem gęstości o stężeniu 0,5 McFarlanda. W tym przypadku, zmętnienie zawiesiny szczepu badanego do wzorca gęstości należy porównywać na białym tle w czarne paski.

**Przygotowaną zawiesinę szczepu badanego należy użyć w ciągu 15 minut, jednak nie później niż w ciągu 60 minut od przygotowania.**

3. Zanurzyć sterylną wymazówkę bawełnianą w przygotowanej zawiesinie szczepu badanego. Podłoża mogą być inokulowane manualnie lub z użyciem automatycznego inokulatora. Zawiesinę rozprowadzić na całej powierzchni agaru równomiernie, upewniając się, że pomiędzy poszczególnymi pasmami nie ma przerw.
4. Nałożyć krążki z antybiotykami na powierzchnię agaru. Ułożyć krążek meropenem 10 µg w odległości nie mniejszej niż 3 cm od krążka meropenem + kwas fenyloboronowy. Krążki należy nakładać na pożywkę w ciągu 15 minut od jej inokulacji. Krążki lekko docisnąć, gdyż powinny całkowicie przylegać do powierzchni agaru. Po nałożeniu, krążki nie mogą być przesuwane, ze względu na szybką dyfuzję antybiotyku z krążka do podłoża.
5. Płytkę umieścić w cieplarni i inkubować w warunkach tlenowych, w temperaturze 35±1°C przez 18±2 godziny.

## 11. Odczyt i interpretacja wyników wzrostu

Po zakończeniu wymaganego okresu inkubacji:

- dokonać pomiaru wielkości stref zahamowania wzrostu zgodnie z aktualnymi wytycznymi.

Wynik dodatni testu, podejrzenie produkcji KPC:

1. paleczek z rodziny *Enterobacterales*: różnica (powiększenie) wielkości średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka meropenemem w stosunku do krążka meropenem + kwas fenyloboronowy o 4 mm lub więcej;
2. paleczek niefermentujących z rodzajów *Pseudomonas* i *Acinetobacter*: różnica (powiększenie) wielkości średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z meropenemem w stosunku do krążka meropenem + kwas fenyloboronowy o 7 mm lub więcej.

## 12. Kontrola jakości

Kontrolę jakości odczynnika wykonywać z częstotnością oraz w sposób zgodny z aktualnymi wytycznymi.

## 13. Ograniczenia metody

- Badanie lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową należy wykonywać wyłącznie przy użyciu świeżych, czystych hodowli bakteryjnych
- Zbyt duża gęstość inokulum może powodować zmniejszenie strefy zahamowania wzrostu, a zbyt mała zwiększenie stref zahamowania wzrostu i trudności w ich pomiarze.
- Pozostawienie inokulowanych płytek przed nałożeniem krążków na dłużej w temperaturze pokojowej, może spowodować namnażanie się drobnoustrojów, czego skutkiem będzie zaniżenie średnic stref zahamowania wzrostu. Dlatego też, istotne jest przestrzeganie zasady 15-15-15: zawiesinę należy zużyć w ciągu 15 minut od przygotowania, krążki nałożyć w ciągu 15 minut od inokulacji płytki, a inkubację płytek rozpocząć w ciągu 15 minut od nałożenia krążków.
- Niewłaściwe przechowywanie krążków antybiotykowych może wpływać na stabilność antybiotyków w nich zawartych, co może powodować zmniejszenie średnicy stref zahamowania wzrostu i może być źródłem błędów interpretacyjnych lekowrażliwości badanego patogenu.

## 14. Charakterystyka metody

Rozprzestrzenianie się na całym świecie pałeczek Gram-ujemnych produkujących karbapenemazy stanowi jedno z najpoważniejszych zagrożeń zdrowia publicznego i jedno z największych wyzwań w obszarze współczesnej medycyny, zarówno po stronie diagnostyki, identyfikacji nosicieli, jak i terapii zakażeń. Terapia zakażeń jest mocno ograniczona, a czasami wręcz niemożliwa, z powodu braku dostępności leków skutecznych w likwidacji czynnika etiologicznego. Izolaty produkujące karbapenemazy, w tym KPC to często szczepy wielolekooporne (MDR), a czasami wręcz, odporne na wszystkie dostępne antybiotyki (PDR).

Jak donosi raport KORDL z 30 czerwca 2019 roku, w Polsce najczęściej występują szczepy wytwarzające następujące karbapenemazy: KPC – *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (klasa A), NDM – New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (klasa B), VIM – Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase (klasa B) oraz karbapenemazy typu-OXA-48 (klasa D). dane KORDL są alarmujące. Jednoznacznie wskazują na wzrost występowania pałeczek produkujących karbapenemazy wszystkich wymienionych klas w ciągu badanego okresu.

Mając na uwadze sytuację epidemiologiczną, bardzo istotne jest dokładne identyfikowanie szczepów produkujących karbapenemazy, w celu zapobiegania dalszemu szerzeniu się niebezpiecznych drobnoustrojów na terenie naszego kraju oraz na całym świecie. Test z wykorzystaniem kwasu fenyloboronowego jest doskonałym narzędziem w realizacji tego celu.

Jak donosi Yohei Doi i wsp. w publikacji z 2008 roku w *J. Clin. Microbiol.*, test z wykorzystaniem kwasu fenyloboronowego jest prostym i łatwym do przeprowadzenia testem, pozwalającym na wykrycie szczepów produkujących karbapenemazę KPC i rozróżnienie jej od innych typów karbapenemaz.

W 2009 roku, w publikacji ogłoszonej w *J. Clin. Microbiol.* Athanassios Tsakris i wsp. zbadali użyteczność testów z wykorzystaniem kwasu fenyloboronowego. W tym celu zbadano 57 genotypowo potwierdzonych szczepów *Klebsiella pneumoniae* produkujących KPC. Aby określić czułość i swoistość wybrano losowo 106 szczepów nieposiadających KPC (89 izolatów *K. pneumoniae* i 17 izolatów *Escherichia coli*) spośród tych wykazujących zmniejszoną wrażliwość na cefoksytynę, cefalosporyny o rozszerzonym spektrum działania lub karbapenemy. Przy użyciu metodologii CLSI i krążków zawierających imipenem, meropenem lub cefepim, samodzielnie lub w połączeniu z 400  $\mu$ g kwasu borowego, wszystkich 57 producentów KPC dało wyniki pozytywne (czułość 100%), podczas gdy wszyscy 106 producentów niebędących producentami KPC dały wyniki negatywne (specyficzność 100%). Test z użyciem krążka z meropenemem i kwasem fenyloboronowym i samym meropenemem wykazał różnice w średnicach stref zahamowania między producentami KPC i szczepami niebędącymi producentami KPC. Dzięki użyciu krążków zawierających ertapenem wszystkie izolaty zostały prawidłowo zróżnicowane, z wyjątkiem pięciu producentów AmpC, którzy dali wyniki fałszywie dodatnie (czułość 100%; swoistość 95,3%).

## 15. Postępowanie ze zużytymi odczynnikami

Odczynniki po badaniach oraz nieużyte odczynniki należy utylizować zgodnie z aktualnie obowiązującymi przepisami dotyczącymi postępowania z odpadami medycznymi oraz procedurami laboratorium odnośnie utylizacji materiałów zakaźnych i potencjalnie zakaźnych.

## 16. Zgłaszanie zdarzeń niepożądanych

Zgodnie z obowiązującymi przepisami, zdarzenia niepożądane i incydenty, które można bezpośrednio powiązać z opisywanym podłożem, należy zgłaszać producentowi oraz Prezesowi Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych na adres:

Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych  
Al. Jerozolimskie 181C, 02-222 Warszawa;  
Telefon: 48 22 492-11-00  
Fax: 48 22 492-11-09

## 17. Piśmiennictwo




1. Europejski Komitet ds. Oznaczenia Lekowrażliwości (EUCAST). Tabele interpretacji wartości granicznych minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz wielkości stref zahamowania wzrostu. Wersja 7.0, obowiązująca od 1 stycznia 2017r.. Strona internetowa Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów [www.korld.edu.pl](http://www.korld.edu.pl) (2017)
2. M. Gniadkowski, D. Żabicka, W. Hryniewicz. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości pałeczek gram-ujemnych. Strona internetowa Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów [www.korld.edu.pl](http://www.korld.edu.pl) (2009)
3. Doi Y., B.A. Potoski, J.M. Adams-Haduch, H. E. Sidjabat, A. W. Pasculle, D. L. Paterson. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type  $\beta$ -lactamase by use of a boronic acid compound. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4083-4086 (2008)
4. van Dijk K., Voets G., Scharringa J., Voskuil S., Fluit A., Rottier W., Leverstein-Van Hall M., Cohen Stuart J. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. *Clin Microbiol Infect.* 20(4):345-9 (2014)
5. Żabicka D., Baraniak A., Literacka E., Gniadkowski M., Hryniewicz W., Wykrywanie karbapenemaz – zalecenia KORDL 2017
6. Literacka E., Żabicka D., Hryniewicz W., Gniadkowski M., Dane Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD), dotyczące pałeczek Enterobacterales wytwarzających karbapenemazy NDM, KPC, VIM i OXA-48 na terenie Polski w latach 2006 – 2018. Narodowy Instytut Leków, Warszawa
7. Tsakris A., Kristo I., Poulou A., Themeli-Digalaki K., Ikonomidis A., Petropoulou D., Pournaras S., Sofianou D., Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 47(2):362-7, 2009
8. Markiewicz Z., Korsak D., Popowska M., Antybiotyki w dobie narastającej lekooporności, PWN, PZWL, Warszawa, wyd. 1, 2021












### Historia zmian dokumentu

Data zmiany	Sekcja	Opis zmiany
2022/06/03	Cały dokument	Dostosowanie do wymagań Rozporządzenia UE 2017/746

### UWAGA

Historia zmian dokumentu nie uwzględnia zmian redakcyjnych.

SYMBOL	NAZWA SYMBOLU	OPIS	NR REF.
	Wytwórca	Oznacza wytwórcę wyrobu medycznego zgodnie z definicją zawartą w dyrektywach unijnych 90/385/EWG, 93/42/EWG oraz 98/79/WE.	5.1.1
	Data produkcji	Oznacza datę produkcji wyrobu medycznego.	5.1.3
	Numer katalogowy	Oznacza numer produktu w katalogu producenta pozwalający zidentyfikować wyrób medyczny.	5.1.6

	Numer serii / kod partii	Oznacza nadany przez producenta numer partii pozwalający zidentyfikować partię produktów, do której należy wyrób medyczny.	5.1.5
	Wyrób do diagnostyki in vitro	Oznacza wyrób medyczny przeznaczony do diagnostyki in vitro	5.5.1
	Nie używać повторно	Oznacza wyrób medyczny przeznaczony do jednokrotnego użytku lub do użytku podczas leczenia jednego pacjenta w ramach jednej procedury medycznej.	5.4.2
	Wystarczy na wykonanie <n> testów	Oznacza nadaną przez producenta wartość na ile testów wystarczy wyrób.	5.5.5
	Data przydatności do użycia	Oznacza datę, po której wyrób medyczny nie powinien być używany.	5.1.4
	Przestrzegać zakresu temperatury	Wskazuje maksymalną i minimalną wartość temperatury, w której należy przechowywać, transportować lub użytkować przedmiot.	5.3.7
	Symbol bezpieczeństwa (Zgodność z wymogami UE)	Oznaczenie CE na produkcie stanowi deklarację producenta potwierdzającą zgodność produktu z zasadniczymi wymogami odpowiednich przepisów Unii Europejskiej dotyczących zdrowia, bezpieczeństwa i ochrony środowiska.	nd.
	Sprawdź w instrukcji użycia	Oznacza konieczność zapoznania się z instrukcją użytkowania	5.4.3
	Sterylizowany aseptycznymi technikami przetwarzania	Wskazuje wyrób medyczny, który został wytworzony za pomocą zaakceptowanych technik aseptycznych.	5.2.2
	Nie używać w przypadku uszkodzonego opakowania	Oznacza wyrób medyczny, który nie powinien być używany, jeśli opakowanie zostało uszkodzone lub otwarte.	5.2.8
	Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego	Oznacza wyrób medyczny zawierający materiał biologiczny tj. tkanki, komórki lub ich pochodne pochodzenia zwierzęcego.	5.4.8