

# 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 fenylboronowy 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 fenylboronowy służy jako inhibitor  $\beta$ -laktamaz w testach fenotypowych na obecność KPC.

### 3. Skład podłoża

| w g/l wody destylowanej:  |
|---------------------------|
| Kwas fenylboronowy 15,0 g |

pH -

Wygląd odczynnika – Odczynnik klarowny, bezbarwny

### 4. Przygotowanie odczynnika

Odczynnik w probówkach i butelkach jest gotowe do użycia.

### 5. Wposażenie wymagane, nie dostarczone

Wposażenie 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 niezaautomatyzowany.
- 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 odczynnikami podczas wykonywania będzie odbiegało od opisanego w niniejszej instrukcji, laboratorium jest zobowiązane do przeprowadzenia walidacji przyjętego postępowania.

## 7. Przechowywanie

Probówki i butelki z odczynnikami 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 nieselektywnego, 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. pałeczek z rodziny *Enterobacteriales*: różnica (powiększenie) wielkości średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka meropenemem w stosunku do krążka meropenem + kwas fenyloboronowy o 4 mm lub więcej;
2. pałeczek 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. Oznaczania 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 (KORDL), 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 powtórnie                                 | 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 |



Graso Zenon Sobiecki  
Krag 4A; 83-200 Starogard Gdański  
[www.grasobiotech.pl](http://www.grasobiotech.pl)  
tel. + 48 (58) 562 30 21

Oddział produkcyjny  
Leśna 1, Owidz  
83-211 Jabłowo

