

## RAPID POLYMYXIN PSEUDOMONAS

Rilevazione di sensibilità e resistenza  
di *Pseudomonas aeruginosa* alla colistina  
**10 test** (RIF. 23001)

CPB 0406-IT-2018-02

Unicamente per *diagnostica in vitro*, solo per uso professionale  
I test sono monouso.



### 1 - OBIETTIVO

Il test Rapid Polymyxin Pseudomonas (RP PSEUDOMONAS) consente di rilevare la sensibilità e la resistenza di *Pseudomonas aeruginosa* alla colistina partendo da una coltura batterica su mezzo agar.

### 2 - INTERESSE

Lo sviluppo di batteri multiresistenti a diverse famiglie di antibiotici (noti come batteri multiresistenti o BMR) rappresenta un problema di salute pubblica, poiché riduce drasticamente le opzioni terapeutiche di trattamento e aumenta il tasso di mortalità nelle unità di terapia intensiva. Tra i batteri BMR, *Pseudomonas aeruginosa* è una delle principali fonti di preoccupazione: questa specie è responsabile di un gran numero di infezioni comunitarie (polmonari, ematiche, cardiache, urinarie, intra-addominali, auricolari, oculari e articolari) e nosocomiali. Inoltre, la sua resistenza acquisita ai B-lattami (penicilline, cefalosporine) e all'ampio spettro delle carbapenemasi (carbapenemi, aminoglicosidi e chinoloni) è sempre più diffusa in tutto il mondo.

Questo sviluppo di batteri BMR ha rianimato l'interesse per una classe di antibiotici antichi, le polimixine (polimixina E o colistina e polimixina B), che sono generalmente considerati molecole di ultima istanza.

Tuttavia, l'uso crescente di colistina oggi porta a emergere e moltiplicarsi nuovi ceppi multiresistenti alla colistina e ai carbapenemi, ponendo una nuova minaccia alla sostenibilità di un arsenale terapeutico efficace.

Il controllo degli impasse terapeutici e la padronanza dei rischi infettivi in ambito clinico richiedono pertanto una rapida valutazione dei profili di sensibilità e resistenza alla colistina dei ceppi batterici.

I metodi attualmente disponibili per determinare la sensibilità o la resistenza alla colistina non sono adatti alle esigenze cliniche e ospedaliere. Sono considerati onerosi, lunghi (24 h, MIC in mezzo liquido) o inaffidabili come nel caso dei metodi di diffusione su agar.

Il test RP PSEUDOMONAS permette di determinare la resistenza di *Pseudomonas aeruginosa* alla colistina in meno di 4 ore e in modo sensibile e specifico. Questo test è veloce, facile da usare e adatto a tutti i laboratori di analisi. Utilizza un metodo liquido per l'individuazione di tutte le resistenze fenotipiche, che consente l'immediata attuazione di un'adeguata terapia antibiotica o l'identificazione di soggetti portatori di ceppi resistenti alla colistina per limitare i rischi di diffusione epidemica.

### 3 - PRINCIPIO

Il test RP PSEUDOMONAS è un metodo in mezzo liquido che si basa sulla rilevazione colorimetrica della rapida metabolizzazione del glucosio, correlato alla crescita batterica, in presenza di una concentrazione definita di colistina. La basificazione del mezzo di coltura a causa di questa crescita è visualizzata dal passaggio di colore dal verde al viola di un indicatore di pH (violetto di bromocresolo).

### 4 - REAGENTI

| Descrizione   | Quantità |
|---|----------|
| <b>RP NaCl</b> : fiala da 3 mL di mezzo liquido contenente 0,85 g/L di NaCl per la preparazione dell'inoculo  | 12       |
| <b>RP Medium Pseudomonas</b> : fiala da 1.5 mL di mezzo di coltura per <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a base di un brodo nutriente arricchito con un fattore di crescita, uno zucchero e violetto di bromocresolo come indicatore di pH.   | 10       |
| <b>Galleria Rapid Polymyxin Pseudomonas</b> : galleria contenente un pozzetto di controllo negativo C-, tre pozzetti. Test contenenti colistina a concentrazioni di 2, 4 e 8 mg/L e un pozzetto Controllo della crescita batterica C+. Galleria confezionata in bustina di alluminio con essiccante integrato | 10       |
| <b>RP TC Pseudomonas (Turbidity Control)</b> : fiala da 3 mL di soluzione di solfato di bario per controllo della torbidità   | 1        |
| <b>Sistema di chiusura</b> : coperchio di protezione della galleria inoculata in plastica traslucida  | 10       |

### 5 - PRECAUZIONI D'IMPIEGO

I reagenti di questo cofanetto sono destinati esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* e devono essere maneggiati da personale autorizzato.

Campioni, colture batteriche e reagenti inoculati sono potenzialmente infettivi, devono essere manipolati con le precauzioni d'uso nel rispetto delle norme igieniche e dei regolamenti in vigore nel paese di utilizzo per questo tipo di prodotto.

Si raccomanda l'uso di una stazione di sicurezza microbiologica (MSP). Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.

I reagenti devono essere conservati a temperature comprese tra +2 e +8 °C.

Non utilizzare reagenti danneggiati o conservati in modo improprio prima dell'uso  
Non usare fiale di RP Medium Pseudomonas che mostrano segni di perdite.

I risultati ottenuti con il test RP PSEUDOMONAS riflettono la sensibilità o resistenza alla colistina di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* presenti nel campione, ma non possono essere usati da soli per effettuare una diagnosi clinica. Questo deve essere fatto dal medico, sulla base di tutti i risultati biologici e dei segni clinici.

### 6 - PRELIEVO DI CAMPIONI

I microrganismi da esaminare devono essere stati isolati preferibilmente su mezzi di coltura come Mueller Hinton, TSA, Drigalski, agar eosina al blu di metilene, Colombia al sangue. Altri agar come agar cioccolato PolyVitest, Uriselect possono causare un rallentamento della crescita. L'attuazione del test deve essere effettuata a partire da colonie giovani (da 16 a 24 ore di incubazione).

### 7 - PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Tutti i reagenti forniti sono pronti per l'uso. Kit e reagenti conservati a +2 e +8 °C nella confezione originale sono stabili fino alla data di scadenza indicata sul cofanetto.

I reagenti RP Medium Pseudomonas e RP NaCl sono monouso. Se si utilizza il reagente RP TC Pseudomonas per la taratura degli inoculi da colonie isolate, deve essere conservato fino al momento dell'uso dell'ultimo reagente RP Medium Pseudomonas presente nel kit.

Il reagente RP TC Pseudomonas deve essere conservato a +2/+8 °C al riparo dalla luce.

### 8 - REAGENTE E MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Contenitori per rifiuti contaminati  
Densitometro  
Pipetta e coni  
Forno qualificato a +36 °C/+/-2 °C

### 9 - MODALITÀ OPERATIVA

Il fenotipo dei batteri GRAM negativi deve essere verificato con la realizzazione di una colorazione di GRAM.

Il test deve essere eseguito solo a partire da colonie identificate da MALDI-TOF come appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa*.

Portare i reagenti a temperatura ambiente per 10 minuti. Identificare la galleria con il campione sottoposto a prova.

Rimuovere l'adesivo che copre i pozzetti dalla galleria (pozzetti C-, 2, 4, 8 e C+).

#### • Preparazione del controllo negativo:

distribuire nel pozzetto C- n. 1:  
- 75 µL di RP Medium Pseudomonas non inoculato  
- 25 µL di RP NaCl non inoculato

• **Preparazione della sospensione batterica nella fiala RP NaCl:**  
raccogliere tre o quattro colonie identiche isolate con l'aiuto di un'ansa da 10 µL o di una pipetta Pasteur tappata.  
Scaricarle in una fiala di RP NaCl e omogeneizzare bene.

#### • Standardizzazione dell'inoculo

Si raccomanda di standardizzare l'inoculo utilizzando un densitometro. Tuttavia, è disponibile una fiala di RP TC Pseudomonas a condizioni di buone pratiche d'uso (vedere paragrafo *Fiala RP TC Pseudomonas*).

#### - Utilizzando un densitometro

Verificare con un densitometro che la torbidità del mezzo di coltura inoculato sia compreso tra 1,5 e 2 Mac Farland (Mc F). Si consiglia di tenere conto del valore più basso ottenuto ruotando la fiala nell'apparecchio.

Se il Mc F è inferiore a 1,5 (inoculo insufficiente), inoculare nuovamente la fiala fino a ottenere un McF compreso tra 1,5 e 2. Se il Mc F è superiore a 2 (inoculo troppo ricco), diluire con una nuova fiala RP NaCl fino a ottenere una corretta opacità. A tale scopo sono inclusi nella confezione 2 fiale di RP NaCl aggiuntive, che devono essere scartate dopo l'uso.

In caso di incompatibilità tra la fiala di RP NaCl in dotazione e il densitometro, si raccomanda di:

- trasferire il contenuto in una provetta compatibile con il dispositivo,  
- ottenere un valore di 0 Mc F,  
- quindi aggiungere le colonie fino a ottenere un McF tra 1,5 e 2.

#### - In relazione alla fiala RP TC Pseudomonas

Questo metodo di lettura visiva può essere soggettivo e richiede una buona pratica di laboratorio per garantire l'affidabilità dell'ottenimento di un Mc F di 1,5-2 nella fiala RP NaCl inoculata.

Al fine di garantire la densità ottica attesa dalla fiala RP NaCl inoculata rispetto alla torbidità RP TC Pseudomonas fornita, è necessario convalidare il processo di realizzazione della torbidità dell'inoculo.

#### Metodologia:

Regolare l'opacità del mezzo inoculato su quella del controllo di torbidità di RP TC Pseudomonas utilizzando le linee nere sull'etichetta della fiala. Se è necessario regolare la torbidità, operare come indicato in precedenza.

#### • Preparazione dell'inoculo in RP Medium Pseudomonas e distribuzione in galleria

- Trasferire 500 µL di RP NaCl inoculato nella fiala RP Medium Pseudomonas  
- Omogeneizzare bene e distribuire il RP Medium Pseudomonas inoculato:

- 100 µL nei pozzetti Test n. 2, 3 e 4 (contenenti colistina)  
 - 100 µL nel pozzetto n. 5 per il controllo della crescita batterica C+ (senza colistina)  
 Coprire la galleria agganciando il coperchio "sistema di chiusura".  
 Identificare la galleria con i riferimenti del campione testato.  
 Incubare la galleria a +36 °C +/- 2 °C per 3-4 ore.  
 Una prima osservazione va fatta dopo 3 ore di incubazione (vedere condizione per la lettura e l'interpretazione del risultato finale al paragrafo 10 - Lettura e interpretazione).

## 10 - LETTURA E INTERPRETAZIONE

La lettura dei risultati è basata sull'identificazione e sul confronto del colore dei pozzetti Test con quelli dei pozzetti C+ e C- e sul rispetto dei tempi di lettura.

### • Controllo negativo di lettura (pozzetto di controllo negativo C- n.1):

Il pozzetto di controllo negativo n. 1 (C-) mostra il colore iniziale (verde) del mezzo. Qualsiasi variazione di colore di questo pozzetto rispetto al colore iniziale è segno di contaminazione del mezzo. In questo caso non interpretare il risultato e ripetere il test.

### • Convalida (pozzetto di controllo positivo C+ n. 5):

Verificare che il mezzo corrispondente al controllo della crescita batterica (C+) sia diventato grigio-violetto o violetto. Se il colore del pozzetto di controllo C+ ha un colore troppo vicino a quello del pozzetto C- (verde scuro) rendendo troppo soggettiva la valutazione del cambiamento di colore di C+, prolungare l'incubazione e ripetere la lettura dopo 4 ore.

### • Lettura e interpretazione dei pozzetti Test n. 2, 3 e 4:

La valutazione di un cambiamento di colore dei pozzetti Test viene eseguita in relazione al controllo C+ (pozzetto n. 5).

La capacità del ceppo di svilupparsi alla concentrazione indicata nei pozzetti Test (ceppo resistente alla concentrazione indicata di colistina di 2, o 2 e 4 mg/L o 2, 4 e 8 mg/L) dà come risultato:

- un cambiamento di colore del mezzo da inizialmente verde (come il colore di C -, pozzetto n. 1) a grigio-violetto o violetto,
- un colore del pozzetto Test identico a quello del pozzetto C+.

Lo sviluppo del ceppo è stato inibito (ceppo sensibile alla concentrazione di colistina indicata) se:

- non vi sono cambiamenti di colore del mezzo nei pozzetti Test (il mezzo rimane verde come il colore del pozzetto C-, n. 1),
- o se il colore del mezzo nei pozzetti Test è diverso dal colore del pozzetto C+.

### • Tempo di lettura da rispettare:

#### 1) Effettuare una prima osservazione dopo 3 ore di incubazione:

Se il pozzetto di controllo positivo C+ (pozzetto n. 5) presenta un viraggio al grigio-violetto o violetto, leggere i pozzetti di test (pozzetti n. 2, 3 e 4) e interpretarli rispetto al controllo C+.

**1-a** Se uno o più pozzetti Test sono di colore grigio-violetto o violetto e di colore **identico** al pozzetto C+ (pozzetto n. 5) il ceppo è **resistente** alla colistina per la concentrazione indicata (2, o 2 e 4 mg/L o 2, 4 e 8 mg/L o 2, 4 e 8 mg/L): registrare il risultato **ceppo resistente. Il risultato è definitivo dopo 3 h.** Non reincubare e non rileggere dopo 4 h.

**1-b** Se i pozzetti Test sono di colore **verde, o presentano un colore diverso da quello del pozzetto C+** il ceppo è **sensibile** alla colistina nella concentrazione indicata (2, o 2 e 4 mg/L). **Il risultato è definitivo in 3 h.** Non reincubare e non rileggere dopo 4 h.

#### 2) Per la lettura e l'interpretazione a 4 ore di incubazione, procedere come in 1-a e 1-b

In caso di convalida del pozzetto di controllo positivo C+ (n. 5) dopo 4

ore di incubazione

Verificare che il mezzo corrispondente al controllo della crescita batterica (C+) sia diventato grigio-violetto o violetto.

**2- a** Se i pozzetti Test sono di colore grigio-violetto o violetto e di colore **identico** al pozzetto C+ (pozzetto n. 5) il ceppo è **resistente** alla colistina per la concentrazione indicata (2, o 2 e 4 mg/L o 2, 4 e 8 mg/L): registrare il risultato **ceppo resistente**.

**2- b** Se i pozzetti sono di colore **verde, o presentano un colore diverso dal pozzetto C+** il ceppo è **sensibile** alla colistina per la concentrazione indicata (2, o 2 e 4 mg/L o 2, 4 e 8 mg/L).

La tabella seguente presenta, a titolo indicativo, le categorie cliniche interpretate secondo i quadri di riferimento.

| Interpretazione della crescita batterica | Concentrazioni indicate (mg/L) |   |   | Riferimento interpretativo |
|--|--------------------------------|---|---|----------------------------|
|  | 2                              | 4 | 8 |                            |
| inibita: -<br>crescita: +                | 2                              | 4 | 8 | CLSI (1-2) / EUCAST (3)    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            | -                              | - | - | S                          |
|  | +                              | - | - | R                          |
|  | +                              | + | - | R                          |
|  | +                              | + | + | R                          |

## 11 - CONTROLLO DI QUALITÀ

Può essere eseguito un controllo del test con un ceppo di raccolta:

- ceppo di controllo, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ceppo sensibile alla colistina in incubazione di 3 h (pozzetto C+ violetto, pozzetti TEST 2, 4 e 8 mg/L verdi e pozzetto C- verde).

**12 - CAUSE DI ERRORE - CASI PARTICOLARI** L'inoculazione dei pozzetti deve essere eseguita entro 60 minuti dalla creazione della sospensione batterica con torbidità di Mc F 1,5 nel reagente RP NaCl.

Il cambiamento di colore del controllo positivo della galleria prima delle 3 ore di incubazione non significa che i risultati del test siano interpretabili. Per tutti i ceppi *Pseudomonas aeruginosa* è indispensabile rispettare il tempo di incubazione consigliato di 3 h.

Una lettura precoce, prima delle 3 ore di incubazione consigliate, può portare a un risultato errato: una falsa sensibilità alla colistina per un ceppo resistente. È indispensabile procedere alla prima lettura dopo 3 ore.

Se il controllo positivo della galleria non mostra il cambiamento di colore atteso (da grigio-violetto a violetto) dopo 4 ore di incubazione, non è possibile interpretare i pozzetti. È necessario eseguire un nuovo test.

Un ceppo testato con un inoculo nel RP NaCl troppo debole (inferiore a Mc F 1,5) può portare a un risultato di sensibilità falso.

## 13 - LIMITI DELLA METODOLOGIA

Le colonie batteriche da sottoporre a test devono essere state isolate su agar adatte alla prova (cfr. paragrafo 6 - Raccolta di campioni).

## 14 - PRESTAZIONI

Una valutazione multicentrica delle prestazioni è stata eseguita in tre laboratori utilizzando isolati batterici provenienti da diversi campioni clinici:

- dal CNR della Resistenza agli antibiotici, Laboratorio di batteriologia, CHRU di Besançon, Francia,

- dell'Unità di resistenza emergente agli antibiotici, Microbiologia medica e molecolare, Dipartimento di medicina, Facoltà di scienze dell'Università di Friburgo, Svizzera. Pr. P. Nordmann,  
 - del Laboratorio di ricerca e sviluppo d'ELITech MICRO-BIO, Signes, Francia.

Le concentrazioni inibitorie minime (MIC) degli isolati testati sono state determinate utilizzando il metodo di riferimento per la microdiluzione liquida in brodo Mueller-Hinton corretto a cationi, come raccomandato nella linea guida del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) (1,2).

La percentuale di concordanza clinica del test RP PSEUDOMONAS è del **90,5%** rispetto al metodo del MIC in mezzo liquido. La sensibilità del test è dell'**89,7%** e la specificità del **90,8%**.

In totale sono stati testati **148** ceppi.

Il quadro di distribuzione dei ceppi testati è il seguente:

| MIC di rif. (mg/L) | ceppi sensibili N= 119 |      |     |    |    |   | ceppi resistenti N = 29 |    |    |    |     |      | Totale |
|--------------------|------------------------|------|-----|----|----|---|-------------------------|----|----|----|-----|------|--------|
|                    | 0,12                   | 0,25 | 0,5 | 1  | 2  | 4 | 8                       | 16 | 32 | 64 | 128 | ≥128 |        |
| Numero di ceppi    | 1                      | 6    | 18  | 75 | 19 | 3 | 7                       | 6  | 1  | 3  | 7   | 2    | 148    |

I risultati ottenuti con il test RP PSEUDOMONAS sono confrontati con quelli ottenuti con il metodo di riferimento in microdiluzione liquida e interpretati secondo gli standard del Comitato europeo per i test di sensibilità antimicrobica (EUCAST) (3).

Dei 29 ceppi resistenti selezionati, 3 sono classificati come falsamente sensibili (3 DTM o discordanza molto importante) perché resistenti con il metodo di riferimento: 2 ceppi (Università di Friburgo, MIC = 4 mg/L e MIC = 8 mg/L) e 1 ceppo MIC = 128 mg/L (laboratorio Elitech MICROBIO).

Tra gli 88 ceppi sensibili, 11 (CNR de Besançon) sono classificati come falsamente resistenti (11 DM o discordanze importanti) perché sensibili utilizzando il metodo di riferimento: 1 ceppo MIC = 0,5 mg/L, 7 ceppi MIC = 1 mg/L e 3 ceppi MIC = 2 mg/mL.

## 15 - ELIMINAZIONE DEI RIFIUTI

I rifiuti devono essere smaltiti in conformità con le norme e i regolamenti igienici in vigore per questo tipo di reagenti nel Paese di utilizzo.

## 16 - BIBLIOGRAFIA

1 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 10° ed. Documento M07-A10. Wayne (PA): The Institute; gennaio 2015.

2 - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for anti-microbial susceptibility testing. 28° edizione. Documento M100-28. Wayne (PA): The Institute; 2018.

3 - Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2017. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, V1.0 marzo 2017.

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziati in grigio.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau  
allée d'Athènes  
83870 SIGNES

FRANCE

☎ 33 (0)4 94 88 55 00

Fax: 33 (0)4 94 32 82 61

http://www.elitechgroup.com

