

RAPID POLYMYXIN ACINETOBACTER

Rilevazione di sensibilità e resistenza
di *Acinetobacter baumannii* alla colistina
10 test (RIF. 23002)

CPB 0407-IT-2018-02

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



1 - OBIETTIVO

Il test Rapid Polymyxin Acinetobacter (RP ACINETOBACTER) consente di rilevare la sensibilità e la resistenza di *Acinetobacter baumannii* 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, *Acinetobacter baumannii* è una delle principali fonti di preoccupazione: questa specie è responsabile di un gran numero di infezioni comunitarie (urinarie, polmonari, intra-addominali, sanguigne) e nosocomiali. Inoltre, la sua resistenza acquisita ai β-lattamici (penicilline, cefalosporine) e l'ampio spettro delle carbapenemasi (carbapenemi, aminoglicosidi e chinoloni) è sempre più riscontrata nel mondo.

Questo sviluppo di batteri BMR ha rianimato l'interesse per una classe di antibiotici antica, 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 ACINETOBACTER permette di definire la resistenza di *Acinetobacter baumannii* alla colistina in meno di 4 ore e questo 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 ACINETOBACTER è un metodo liquido che si basa sulla rilevazione colorimetrica della rapida metabolizzazione del glucosio, correlato alla crescita batterica, in presenza di una concentrazione definita di colistina. L'acidificazione del mezzo di coltura a causa di questa crescita è visualizzata dal viraggio di colore dal rosso al giallo di un indicatore di pH (rosso di fenolo).

4 - REAGENTI

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

5 - PRECAUZIONI D'IMPIEGO

I reagenti di questo cofanetto sono destinati esclusivamente alla diagnosi *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 utilizzare fiale di RP Medium che presentano segni di perdita.

I risultati ottenuti con il test RP ACINETOBACTER riflettono la sensibilità o la resistenza alla colistina di ceppi *Acinetobacter baumannii* presenti nel campione, ma non sono utilizzabili da soli e per effettuare una diagnosi clinica. Quest'ultima deve essere effettuata 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, Agar cioccolato PolyVitec, agar eosina blu di metilene. Altri agar come Colombia al sangue, Drigalski, Uriselect possono comportare un rallentamento della crescita. L'attuazione del test deve essere effettuata a partire da colonie giovani (da 16 a 48 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 Acinetobacter e RP NaCl sono monouso. Se il reagente RP TC viene utilizzato per la calibrazione degli inoculi a partire da colonie isolate, deve essere conservato fino all'utilizzo dell'ultimo reagente RP Medium del kit. Il reagente RP TC deve essere conservato a +2 +8 °C e al riparo dalla luce.

8 - REAGENTE E MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Contentori 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 *Acinetobacter baumannii*.

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

Rimuovere l'adesivo che ricopre la parte inferiore della galleria (pozzetti 1, 2, 3 e 4).

• Preparazione del controllo negativo:

distribuire nel pozzetto C- n. 1:
- 75 µL di RP Medium Acinetobacter 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 a condizione di buona pratica d'uso (vedere paragrafo *Fia- la RP TC*).

- Utilizzando un densitometro

Verificare con un densitometro che la torbidità del mezzo di coltura inoculato sia compresa tra 3 e 3,5 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 3 (inoculo insufficiente), inoculare nuovamente la fiala fino a ottenere un McF compreso tra 3 e 3,5. Se il Mc F è superiore a 3,5 (inoculo troppo ricco), diluire con una nuova fiala RP NaCl fino a ottenere un'opacità corretta. 2 fiale RP NaCl supplementari sono incluse a questo scopo nel cofanetto e devono essere scartate dopo l'uso.

In caso di incompatibilità tra la fiala RP NaCl fornita 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 di 3-3,5.

- In relazione alla fiala RP TC

Questo metodo di lettura visiva può essere soggettivo e richiede una buona pratica di laboratorio per garantire l'affidabilità dell'ottenimento di un McF di 3-3,5 nella fiala RP NaCl inocolata.

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

Metodologia:

Regolare l'opacità del mezzo inoculato su quella del controllo di torbidità RP TC 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 Acinetobacter e distribuzione in galleria

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

- 100 µL nei pozzetti Test n. 2 e n. 3 (contenenti colistina)
- 100 µL nel pozzetto n. 4 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 per rendere il risultato di un ceppo resistente alla colistina (vedere le condizioni 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 (rosso) 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. 4):

Verificare che il mezzo corrispondente al controllo della crescita batterica (C+) sia arancione, arancione/giallo o giallo. Se il colore del pozzetto di controllo C+ ha un colore troppo vicino a quello del pozzetto C- (rosso/arancio) 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 e 3:

La valutazione di un cambiamento di colore dei pozzetti Test viene eseguita in relazione al controllo C+ (pozzetto n. 4).

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) dà come risultato:

- un cambiamento di colore del mezzo da inizialmente rosso (come il colore di C-, pozzetto n. 1) ad arancione, arancione/giallo fino al giallo,
- e un colore **identico** del pozzetto Test 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 rosso 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. 4) mostra un viraggio verso l'arancione, l'arancione/giallo o il giallo, eseguire una lettura dei pozzetti Test (pozzetti n. 2, 3) e interpretare i pozzetti Test in base al controllo C+.

1-a Se uno o due pozzetti Test sono di colore arancione, arancione/giallo o giallo e di colore **identico** al pozzetto C+ (pozzetto n. 4), il ceppo è **resistente** alla colistina per la concentrazione indicata (2, o 2 e 4 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 uno o due pozzetti Test sono di colore **rosso o presentano un colore diverso da quello del pozzetto C+** il ceppo è **sensibile** alla colistina nella alla concentrazione indicata (2, oppure 2 e 4 mg/L). In questo caso, **reincubare il test un'ora in più e reinterpretare il risultato a 4 h.**

2) Solo nel caso di un ceppo sensibile in 3 ore, osservazione del risultato a 4 ore di incubazione.

2-a Se i pozzetti Test sono di colore arancione, arancione/giallo o giallo e di colore **identico** al pozzetto C+ (pozzetto n. 4) il ceppo è **resistente**

à alla colistina nella concentrazione indicata (2, o 2 e 4 mg/L): registrare il risultato **ceppo resistente. Il risultato è definitivo in 4 h.**

2-b Se i pozzetti sono di colore **rosso, o hanno un colore diverso al pozzetto C+** il ceppo è **sensibile** alla colistina nella concentrazione indicata (2, o 2 e 4 mg/L). In questo caso, registrare il risultato **ceppo sensibile (conferma del risultato definitivo in 4 h di un ceppo sensibile).**

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 per l'interpretazione
	2	4	
inibita: - crescita: +	2	4	CLSI (1-2) ed EUCAST (3)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	S
	+	-	R
	+	+	R

11 - CONTROLLO DI QUALITÀ

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

- ceppo di controllo, *Acinetobacter baumannii* CIP 7010, ceppo sensibile alla colistina in incubazione per 3 h (pozzetto C+ giallo-arancione, pozzetti TEST n. 2 e 3 (2 e 4 mg/L): rosso/arancione, pozzetto C-: rosso).

12 - CAUSE DI ERRORE - CASI PARTICOLARI

L'inoculazione dei pozzetti deve essere eseguita entro 60 minuti dalla creazione della sospensione batterica con torbidità da Mc F 3 a 3,5 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. È obbligatorio rispettare il tempo di incubazione raccomandato di 3 ore per tutti i ceppi di *Acinetobacter baumannii*.

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.

Se il controllo positivo della galleria non mostra il cambiamento di colore previsto (arancione, arancione/giallo a giallo) dopo 4 ore di incubazione, non è possibile interpretare i pozzetti. È necessario eseguire un nuovo test.

È obbligatorio procedere a una prima lettura dopo 3 ore. Infatti, alcuni ceppi resistenti possono essere interpretati falsamente sensibili in 4 ore; il pozzetto C+ è in grado di evolvere di cromaticamente in modo più intenso rispetto al pozzetto o ai pozzetti Test colistina.

Un ceppo testato con un inoculo nel RP NaCl troppo debole (inferiore a Mc F 3) 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).

- 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). I risultati delle MIC sono stati interpretati conformemente alle norme del Comitato europeo per i test di sensibilità agli antimicrobici (EUCAST) (3).

La percentuale di concordanza clinica del test RP ACINETOBACTER è del 95,6% rispetto al metodo MIC in mezzo liquido. La sensibilità del test è del 92,11% e la specificità del 97,37%.

In totale sono stati testati 114 ceppi.

Il quadro di distribuzione dei ceppi testati è il seguente:

MIC di rif. (mg/L)	ceppi sensibili N= 76						ceppi resistenti N= 38						Totale
	0,12	≤0,25	0,5	1	2	4	8	>8	16	32	64	≥128	
Numero di ceppo	2	29	18	21	6	4	7	12	2	2	4	7	114

I risultati ottenuti con il test RP ACINETOBACTER sono confrontati con quelli ottenuti con il metodo di riferimento in microdiluzione liquida.

Dei 38 ceppi resistenti selezionati (crescita di C+), 3 (provenienti dal CNR di Besançon) sono erroneamente classificati come sensibili (3 DTM o discordanza molto importante) perché sono resistenti con il metodo di riferimento: 1 ceppo (MIC = 4 mg/L) e 2 ceppi MIC > 8 mg/L).

Dei 76 ceppi sensibili selezionati (crescita di C+), 2 sono classificati come falsamente resistenti (2 DM o discordanza importante) perché sensibili con il metodo di riferimento: 1 ceppo (CNR di Besançon, MIC = 1 mg/L) e 1 ceppo del laboratorio ELITech MICRO-BIO (MIC = 2 mg/L).

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^o ed. Documento M07-A10. Wayne (PA): The Institute; gennaio 2015.

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

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

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziate 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

