

Istruzioni per l'uso delle pastiglie NEO-SENSITABS™

Revisione
Data di emissione
Lingua

DBV0004F
12.04.2013
Italiano

NEO-SENSITABS™

Test di sensibilità antimicrobici

Produttore

Rosco Diagnostica A/S, Taastrupgaardsvej 30, DK-2630 Taastrup, Danimarca, www.rosco.dk

Scopo

Le pastiglie Neo-Sensitabs si usano nei test di sensibilità semiquantitativa *in vitro* durante l'esecuzione del test di diffusione su agar mediante dischetto/pastiglia sugli organismi comuni non esigenti a rapida crescita, su certe varietà di agenti patogeni batterici esigenti, e sui lieviti.

Principi su cui si basa il procedimento

Le pastiglie Neo-Sensitabs contengono una gamma di agenti antimicrobici che vengono applicati alla superficie di un terreno agarizzato adatto allo scopo, che è stato a sua volta inoculato con coltura pura di isolati clinici.

Gli organismi non esigenti, tra cui *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Vibrio cholerae*, possono essere saggiati su terreno senza sangue o altro supplemento come l'agar secondo Mueller-Hinton II (MH). *Haemophilus influenzae* richiede l'Haemophilus test media (HTM), *Neisseria gonorrhoeae* l'agar base GC (GCA), *Streptococcus pneumoniae* e altri streptococchi richiedono l'agar secondo Mueller-Hinton II + 5 % sangue (MH+B). Il lievito deve essere saggiato su agar RPMI-1640 oppure su agar Shadomy modificato e gli anaerobi richiedono procedimenti speciali.^{1,2}

Dopo l'incubazione, si procede all'esame delle piastre, alla misurazione dei diametri delle zone di inibizione attorno alle pastiglie e al successivo confronto dei dati con le tabelle interpretative delle zone dei singoli antibiotici al fine di determinare l'agente o gli agenti più idonei all'impiego nella terapia antimicrobica.

Le pastiglie Neo-Sensitabs sono standardizzate in conformità alle break-point di MIC raccomandate dal CLSI (NCCLS).^{3,4} e EUCAST. Inoltre, le pastiglie Neo-Sensitabs sono adattate in base alle MIC di break-point di MIC raccomandate dai "Gruppi di standardizzazione dei test di sensibilità" presenti in Francia e Regno Unito. I criteri interpretativi del diametro delle zone dei diversi paesi si possono trovare nella Guida all'utilizzo delle pastiglie di Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹

Reagenti

Le pastiglie Neo-Sensitabs hanno un diametro di 9 mm e contengono antimicrobici cristallini accuratamente mescolati con granulato protettivo. Su entrambi i lati delle pastiglie è impresso un codice unico a 5 caratteri. Le pastiglie Neo-Sensitabs sono fornite in cartucce contenenti 50 pastiglie ciascuna. Le cartucce possono essere utilizzate con un distributore automatico (dispenser) per le pastiglie Neo-Sensitabs. Il distributore automatico rilascia 7, 9, 12 o 16 pastiglie Neo-Sensitabs alla volta e le pastiglie aderiscono automaticamente al terreno di coltura rendendo superflua l'applicazione di ulteriori pressioni.

Istruzioni per la conservazione

1) Al ricevimento del prodotto, controllare il simbolo della temperatura sull'astuccio esterno. Le pastiglie Neo-Sensitabs in cui compare il simbolo 2 °C -8 °C devono essere conservate in un frigorifero, mentre le Neo-Sensitabs il cui astuccio esterno reca il simbolo di una temperatura pari a o inferiore a 25 °C devono essere conservate a temperatura ambiente.

- 2) Una volta prelevate le cartucce dal frigorifero, aspettare che raggiungano la temperatura ambiente prima di aprirle, ad es. 30 – 60 min, per evitare la formazione di condensa sulle pastiglie.
- 3) Le pastiglie Neo-Sensitabs con il simbolo della temperatura compreso tra i 2 °C e gli 8 °C possono essere lasciate a temperatura ambiente fino a 2 mesi, senza perdita sostanziale dell'attività.
- 4) Le cartucce aperte e inserite nel distributore devono essere usate entro 2 mesi nel caso di pastiglie Neo-Sensitabs con il simbolo della temperatura compreso tra i 2 °C e gli 8 °C, ed entro i 12 mesi nel caso di pastiglie Neo-Sensitabs con il simbolo della temperatura inferiore ai 25 °C.

La data di scadenza riportata sulle cartucce riguarda solo le cartucce munite di coperchio e conservate alla giusta temperatura.

Precauzioni

Seguire le istruzioni per l'utilizzo. L'azione del prodotto Neo-Sensitabs dipende non solo dalla potenza delle pastiglie, ma anche dall'utilizzo dell'inoculo e delle piastre di agar più adatti, dalla temperatura di incubazione, dalla corretta interpretazione del diametro delle zone, dalla corretta conservazione delle pastiglie Neo-Sensitabs, e dall'utilizzo di colture di controllo.⁵

Campione

Il campione deve essere tipico del sito di infezione, ossia è necessario compiere tutti gli sforzi possibili per ottenere un campione rappresentativo dei batteri patogeni pertinenti. Vedere le istruzioni, in cui è spiegata anche la preparazione dell'inoculo.

PROCEDIMENTO

Materiali forniti: Pastiglie Neo-Sensitabs come indicato.

Materiali richiesti ma non forniti: Terreni di coltura, reagenti, organismi di controllo della qualità e attrezzature di laboratorio necessarie all'esecuzione del test di sensibilità mediante diffusione su agar secondo il procedimento standardizzato. Preparare uno standard di torbidità McFarland 0,5 aggiungendo 0,5 mL di 0,048 M BaCl₂ (1,175 % wt/vol BaCl₂·2H₂O) a 99,5 mL di 0,18 M H₂SO₄ (1% (vol/vol)) mescolando continuamente. In alternativa è possibile acquistare uno standard preparato. Procedere alla verifica mediante uno spettrofotometro con un percorso ottico di 1 cm e dotato di una cuvetta per il riferimento; l'assorbanza a 625 nm deve essere di 0,08-0,10.^{3,4}

I. Istruzioni per l'uso/Batteri

I.1. Standardizzazione dell'inoculo secondo il CLSI (NCCLS)³ e EUCAST

Metodo di sospensione diretta delle colonie:

Tenendo in sospensione diverse colonie morfologicamente analoghe prelevate da una piastra di agar di 18-24 ore (non selettiva) in 4-5 mL 0.9 % di soluzione NaCl, si può sviluppare la torbidità equivalente a quella di BaSO₄ standard (McFarland 0,5). Il metodo equivale al metodo standard del CLSI (NCCLS) e richiede meno tempo. Si raccomanda questo approccio quando occorre saggiare organismi esigenti come *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, pneumococchi/streptococchi e gli stafilococchi per la potenziale resistenza alla meticillina o all'oxacillina.³

I.2. Inoculo

- a) Nell'arco di 15 minuti, intingere un tampone di cotone sterile nella sospensione adattata e rimuovere l'inoculo dal tampone esercitando una forte pressione all'interno della provetta.
- b) Il tempo massimo per inoculare le piastre mediante i tamponi è di 15 minuti.
- c) Inoculare la superficie asciutta della piastra agar idonea strisciando il tampone su tutta la superficie. Attendere 3-5 minuti perché la superficie si asciughi o un massimo di 15 minuti prima di applicare le pastiglie Neo-Sensitabs ai terreni.
- d) Scegliere le pastiglie adatte, ad esempio quelle raccomandate da CLSI (NCCLS).⁶ Non utilizzare più di nove pastiglie Neo-Sensitabs per una piastra di 150 mm o quattro pastiglie Neo-Sensitabs per una piastra di 100 mm per il saggio di *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, e *Streptococcus* spp..

I.3. Incubazione e lettura delle piastre

- a) Nell'arco di 15 minuti, collocare le piastre, con il lato contenente l'agar rivolto verso l'alto, in un'incubatrice a 35 °C. *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* e altri streptococchi devono essere incubati in atmosfera arricchita di CO₂ al 5 %.
- b) Esaminare le piastre dopo 16-18 ore di incubazione (20-24 ore per *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* e altri streptococchi). Si raccomanda l'incubazione per 24 ore per l'identificazione dello *Staphylococcus aureus* resistente alla *Meticillina* (MRSA) e dell'*Enterococcus* spp. per la resistenza alla vancomicina. Mantenere la piastra vicino alla luce trasmessa ed esaminare le zone dell'oxacillina e della vancomicina alla ricerca della scarsa crescita (colonie minute) delle colonie resistenti alla meticillina o alla vancomicina, con evidenti zone di inibizione. Qualunque crescita visibile all'interno della zona di inibizione è indicativa di resistenza alla meticillina o alla vancomicina. I margini delle zone di inibizione contengono numerose piccole colonie quando si usano le pastiglie di Trimetoprim, Sulfonamidi e Trimetoprim + Sulfametossazolo. In questo caso le zone di inibizione vengono confrontate con le colonie di dimensioni normali (ignorare la crescita modesta e misurare i margini più evidenti). Per ulteriori dettagli consultare la Guida all'utilizzo delle pastiglie Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹
- c) I diametri delle zone di completa inibizione sono misurati a occhio. Le misure delle zone sono arrotondate al millimetro intero più vicino.

II. Istruzioni per l'uso/Lieviti

II.1. Preparazione dell'inoculo

L'inoculo deve dare luogo solo a una crescita confluyente. Per la maggior parte dei ceppi l'inoculo deve contenere all'incirca 5x10⁵CFU/ mL (McFarland 0,5 diluito 1+1 con soluzione salina). Per la *Candida krusei* utilizzare un inoculo equivalente a McFarland 0,5, diluito 1:10 e per *Cryptococcus* spp. utilizzare un inoculo equivalente a McFarland 1,0, non diluito.

II.2. Inoculazione

- a) Le piastre devono essere fatte asciugare per 20-25 minuti a 35 °C prima dell'inoculazione.
- b) 0,5 mL (piastra di 9 cm) o 1,0 mL (piastra di 14 cm) dell'inoculo preparato devono essere versati sulla superficie dell'agar e il liquido in eccesso rimosso immediatamente con una pipetta.
- c) Lasciare asciugare la piastra aperta a una temperatura di 35 °C per 10 minuti e successivamente adagiare le pastiglie sulla superficie dell'agar.

II.3. Incubazione e lettura delle piastre

L'incubazione a 35 °C durante la notte è indicata per la maggior parte dei ceppi isolati dalle infezioni sistemiche. L'esame e la lettura della piastra devono essere eseguiti dopo 18-24 ore. Se la crescita non è ancora visibile con alcuni ceppi, è possibile incubare di nuovo le piastre per 24 ore o più. Nel caso dello *Cryptococcus* spp. incubare a 30 °C per 42-48 ore.

II.4. Misurazione delle zone di inibizione

Nel caso dei polieni (Amfotericina B e Nistatina) si misura la zona trasparente senza segni di crescita visibili all'interno. Nel caso di questi antifunghini, le colonie all'interno della zona devono essere considerate mutanti resistenti. Nel caso degli Azoli, Imidazoli e Terbinafina le zone devono essere confrontate con le colonie di normali dimensioni. Accade spesso di rilevare una zona di crescita di colonie parzialmente inibite, le cui dimensioni sono più piccole in prossimità della pastiglia che al margine della zona reale. Queste colonie di dimensioni piccole e medie non sono mutanti resistenti. Le pastiglie Neo-Sensitabs a base di Imidazoli/azoli contengono doxiciclina per migliorare la qualità della lettura delle loro zone. Nel caso della Fluorocitosina confrontare la zona con le colonie di normali dimensioni. Le singole colonie all'interno della zona sono di norma mutanti *resistenti* (isolare e saggiare di nuovo).

CONTROLLO INTERNO DELLA QUALITÀ

La procedura di controllo della qualità che si avvale dei ceppi ATCC deve essere eseguita almeno una volta alla settimana e in occasione dell'introduzione di un nuovo lotto di agar. Il diametro misurato deve rientrare nei limiti del diametro della zona di controllo per la specifica associazione delle pastiglie Neo-Sensitabs con i ceppi di controllo. I limiti dei ceppi di controllo sono riportati nelle tabelle e indicano l'andamento corretto dell'intera procedura.^{1,3}

RISULTATI

Confrontare il diametro della zona registrata con quelli indicati nelle tabelle. Il risultato con organismi specifici può essere definito Sensibile (S), Intermedio (I) o Resistente (R)³:

Sensibile (S): Si può supporre che l'infezione dovuta al ceppo saggiato risponda al dosaggio normale dell'agente antimicrobico della pastiglia.

Se sono specificati solamente i criteri "S": Per alcune associazioni organismo/agente antimicrobico, l'assenza di ceppi resistenti preclude la definizione di una categoria diversa da sensibile. Nel caso di ceppi che producono risultati indicativi di "non sensibilità", è necessario confermare l'identificazione degli organismi e i risultati dei test di sensibilità agli antimicrobici. Successivamente, gli isolati devono essere sottoposti a un Laboratorio di Riferimento per ulteriori test.

Intermedio (I): La categoria intermedia implica l'applicazione clinica nei siti corporei dove si concentrano i farmaci (ad esempio le urine) o quando si può utilizzare un antimicrobico ad alto dosaggio (per esempio beta-lattamici). La categoria intermedia comprende anche una "zona tampone", che serve a prevenire che piccoli e incontrollati fattori tecnici siano causa di notevoli discrepanze nelle interpretazioni; pertanto, quando una zona rientra nell'intervallo intermedio, i risultati possono essere considerati fuorvianti e, qualora non siano disponibili farmaci alternativi, può essere indicato il test della MIC. **Resistente (R):** In questo caso non si può consigliare l'antimicrobico per il trattamento.

Test di Screening e Conferma per le Beta-Lattamasi a Spettro Esteso (ESBL)

Le beta-lattamasi mediate dai plasmidi trasferibili che producono resistenza nei confronti della cefalosporine di terza generazione e dei monobattami (ad esempio aztreonam) sono state descritte nei ceppi di *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e di altre Enterobacteriaceae. Questi enzimi sono classificati come beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e sono stati implicati nella resistenza clinica ai monobattami e alle cefalosporine ad ampio spettro. Alcuni di questi ceppi mostrano zone di inibizione sotto i ceppi sensibili normali, ma sopra i break-point standard per alcune cefalosporine ad ampio spettro o per aztreonam. Questi ceppi possono essere sottoposti a screening mediante l'uso dei break-point di screening ESBL adatti. La maggior parte delle ESBL sono inibite dall'acido clavulanico, dal tazobactam o dal sulbactam e possono essere facilmente rilevate mediante il test della sinergia a doppio dischetto (pastiglia).⁶ Ceftazidima + Clavulanato e Cefepima + Clavulanato sono di estremo aiuto nei test di conferma dell' ESBL. Ulteriori informazioni possono essere ottenute consultando la Guida all'utilizzo delle pastiglie Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹ Tutti i ceppi ESBL devono essere indicati come resistenti a tutte le penicilline, cefalosporine e aztreonam.

Stafilococchi resistenti alla Meticillina

Lo screening per la resistenza ai MRSA e alla meticillina (oxacillina) negli stafilococchi coagulasi-negativi deve essere effettuato utilizzando Oxacillina 1 µg e Cefoxitina. La resistenza indica che tutte le beta-lattamine devono essere indicate come resistenti. Ulteriori informazioni possono essere ottenute consultando la Guida all'utilizzo delle pastiglie Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹

Staphylococcus aureus con ridotta sensibilità alla vancomicina (hVISA, VISA(GISA) e VRSA)

Lo *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (VRSA) dovrebbe essere identificato usando la Vancomicina 5 µg ma la capacità di identificare i ceppi VRSA è sconosciuta (coiè non è ancora stata valutata dal momento che ci sono stati pochi isolamenti clinici di VRSA in tutto il mondo). I ceppi con ridotta sensibilità alla vancomicina (hVISA e VISA(GISA)) non possono essere identificati con i metodi di diffusione abituali. Ulteriori informazioni possono essere ricavate dalla Guida all'uso delle Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹

Enterococchi resistenti alla Vancomicina (VRE)

L'identificazione degli VRE mediante il metodo di diffusione richiede:

- 1) Utilizzo delle pastiglie Neo-Sensitabs contenenti Vancomicina 5 µg,
- 2) Incubazione per 24 ore,
- 3) Attento esame della zona di inibizione.

Nel caso dei ceppi sensibili le zone hanno un margine netto, mentre con i ceppi resistenti è indistinto. Ulteriori informazioni possono essere ottenute consultando la Guida all'utilizzo delle pastiglie Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).¹

Resistenza ad alto grado agli aminoglicosidi (HLR)

La resistenza ad alto grado agli aminoglicosidi indica che un isolato enterococcico non risentirà degli effetti sinergici dovuti all'associazione di una penicillina o di un glicopeptide con un aminoglicoside. Lo screening per la resistenza ad alto grado alla gentamicina e alla streptomina deve essere eseguito sugli isolati di enterococco provenienti da sangue o CSF. Le pastiglie Neo-Sensitabs ad alto contenuto come Gentamicina 250 µg, Kanamicina 500 µg e Streptomina 500 µg trovano impiego nello screening di questo tipo di resistenza.

LIMITAZIONI DEI METODI DI DIFFUSIONE

Lo scopo delle pastiglie Neo-Sensitabs è fornire un test di sensibilità agli antimicrobici che sia rapido e preciso. I risultati accettabili derivanti dai ceppi dei controlli di qualità non sono garanzia di risultati precisi con tutti gli isolati di pazienti. Nel caso si riscontrassero risultati atipici o incoerenti, è necessario ripetere il test e/o il procedimento di identificazione al fine di garantire risultati precisi. Bisogna tenere presente la possibilità che vengano riportati risultati inattesi e in tal caso sarebbe consigliabile inviare gli isolati ai laboratori di riferimento per sottoporli a ulteriori saggi.

Si possono avere risultati pericolosamente fuorvianti quando vengono testati certi tipi di antimicrobici contro microrganismi specifici.^{3,6} I meccanismi di resistenza di alcune specie sono più difficili da individuare rispetto ad altri e alcuni risultati possono apparire attivi in vitro, benché gli agenti antimicrobici non siano clinicamente efficaci. Sono inclusi in queste associazioni:

- Tutti gli antibiotici beta-lattamici (eccetto oxacillina, meticillina) contro gli stafilococchi resistenti alla meticillina
- Cefalosporine, aminoglicosidi (eccetto il test per la resistenza ad alto grado), clindamicina, e trimetoprim + sulfametossazolo contro gli enterococchi
- Le cefalosporine di prima e seconda generazione e gli aminoglicosidi contro *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.
- Cefalosporine contro *Listeria* spp.
- Glicopeptidi diretti contro *S. aureus* con ridotta sensibilità alla vancomicina
- Cefalosporine e aztreonam diretti contro ceppi di *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* produttori di ESBL (beta lattamasi a spettro esteso).

Le relazioni periodiche sui risultati dei ceppi isolati da CSF potrebbero essere pericolosamente ambigue per la cura del paziente nei casi seguenti:

- Agenti somministrati solo per via orale
- Cefalosporine di I e II generazione (eccetto la Cefuroxima sodica)
- Clindamicina
- Macrolidi
- Tetracicline
- Fluorochinoloni

Alcuni antimicrobici si associano alla comparsa della resistenza durante la terapia prolungata. Di conseguenza, gli isolati inizialmente sensibili possono diventare resistenti nell'arco di pochi giorni dall'avvio del trattamento. Ciò si verifica assai frequentemente con:

- *Enterobacter*, *Citrobacter*, e *Serratia* spp. con la terza generazione di cefalosporine
- *Pseudomonas aeruginosa* con la maggior parte degli antimicrobici
- Stafilococchi con i chinoloni

In pratica, tutti gli isolati di *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Proteus* spp. (eccetto *P. mirabilis*), *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, possiedono i geni per la produzione delle beta-lattamasi del I Gruppo. Non sono pertanto disponibili informazioni utili che dimostrino l'induzione in vitro dell'enzima. I laboratori devono ripetere i saggi (ogni 3-4 giorni) degli isolati ripetutamente prelevati dai pazienti infetti durante la terapia per individuare la selezione di cloni che produce in maniera costitutiva le beta-lattamasi del Gruppo I.

RIFERIMENTI:

- 1) Neo-Sensitabs User's Guide. 2013. www.rosco.dk.
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard M11-A6. 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-S10. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard M31-A2. 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
- 5) Ericsson H.M. and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic susceptibility testing. Report of an international collaborative study. Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl. 217: 1-90.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S23. 23rd Informational Suppl. CLSI, Wayne, Pa., USA.