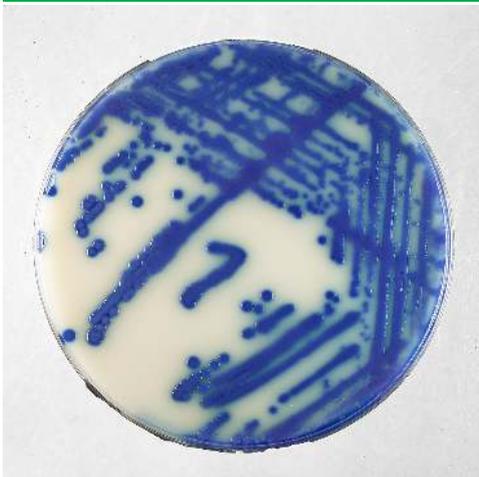


**ISTRUZIONI PER L'USO**
**ChromArt**
**CRE**
**Piastre pronte all'uso**

 ChromArt CRE:  
*K.pneumoniae* resistente ai carbapenemi

**1- DESTINAZIONE D'USO**

 Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno cromogeno per la determinazione presuntiva delle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE) in campioni clinici.

**2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA \***

Peptoni	16,00 g
Fattori di crescita	5,00 g
Opacizzante	10,00 g
Triptofano	2,00 g
Miscela di cromogeni	0,40 g
Miscela di antimicrobici	0,21 g
Agar	16,00 g
Acqua purificata	1000 mL

\*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

**3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

 I meccanismi di resistenza ai carbapenemi tra i microrganismi Gram-negativi sono eterogenei ma sono principalmente suddivisi in due grandi categorie: meccanismi basati sulla produzione di carbapenemasi e meccanismi con assenza carbapenemasi. Per questi ultimi, la resistenza ai carbapenemi è mediata da modificazioni delle porine o della pompa di efflusso o dalla combinazione di queste con la produzione di ESBL e/o AmpC, a seconda dell'organismo Gram-negativo.<sup>1</sup> La produzione di carbapenemasi è il meccanismo principale che media una maggiore resistenza ai carbapenemi tra i batteri Gram-negativi.<sup>1</sup> Le carbapenemasi sono  $\beta$ -lattamasi che idrolizzano le penicilline, nella maggior parte dei casi le cefalosporine e, a vari livelli, i carbapenemi ed i monobattami (questi ultimi non sono idrolizzati dalle metallo- $\beta$ -lattamasi).<sup>2</sup>

 La colonizzazione gastrointestinale di organismi resistenti ai carbapenemi è un importante serbatoio per la trasmissione di questi patogeni critici in ambito ospedaliero.<sup>1</sup> Le infezioni causate da batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi sono un grave problema a causa dell'elevata capacità di diffusione di questi microrganismi, le scarse opzioni terapeutiche disponibili e l'elevata mortalità. La loro identificazione precoce nei campioni clinici è un fattore determinante per prevenire o limitare la loro diffusione e preservare l'efficacia terapeutica dei carbapenemi. I terreni cromogeni sono raccomandati per la rilevazione della colonizzazione gastrointestinale di organismi resistenti ai carbapenemi.<sup>1,3,4</sup>

 ChromArt CRE è un terreno di screening, cromogeno e selettivo, per l'isolamento e la differenziazione delle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE). La selettività del terreno è dovuta alla presenza di una miscela di antibiotici, inibitoria per i batteri Gram-positivi, funghi e batteri Gram-negativi sensibili ai carbapenemi. La differenziazione batterica è ottenuta con una miscela di composti cromogeni atti ad evidenziare le attività enzimatiche specifiche ( $\beta$ -galattosidasi,  $\beta$ -glucosidasi, triptofanasi), di *E.coli*, dei batteri del gruppo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) e del gruppo *Proteus-Morganella-Providencia*. Il fondo opaco del terreno consente una migliore evidenziazione delle colonie ed una loro più facile lettura.

**4 - CARATTERISTICHE FISICHE**

Aspetto del terreno	grigio, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,2 $\pm$ 0,2

**5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
ChromArt CRE	Piastre pronte all'uso	548015	2 x 10 piastre $\varnothing$ 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

**6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

**7 - CAMPIONI**

 È possibile utilizzare qualsiasi tipo di campione, tuttavia le feci e il tampone rettale sono i più sensibili per rilevare la colonizzazione CRE; se il tampone rettale non è fattibile o accettabile, sono utilizzabili altri campione clinici quali sangue, tampone dalla ferita o urina.<sup>3</sup> Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici; quando possibile raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antibiotica.


## 8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.

Inoculare strisciando il campione con un'ansa sui quattro quadranti della piastra per ottenere colonie ben isolate, assicurandosi che le sezioni 1 e 4 non si sovrappongano. In alternativa, se il materiale viene seminato direttamente da un tampone, ruotare il tampone su una piccola area della superficie vicino al bordo; quindi strisciare su tutta la piastra da questa zona inoculata.

Incubare in aerobiosi, a 35-37°C per 18-24 ore.

## 9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

Le *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi mostrano le seguenti colonie caratteristiche:

Colonie rosa / rosso-magenta: *E. coli*

Colonie blu / verde-blu / blu-viola / grigio-viola: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*

Colonie brune con alone marrone: *Proteus-Morganella-Providencia*

I ceppi di *Enterobacteriaceae* isolati sul terreno devono essere sottoposti a test di conferma; consultare i riferimenti riportati in bibliografia.<sup>1-3</sup>

## 10 - CONTROLLO QUALITA' DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	35-37°C / 18-24H / A	crescita, colonie blu
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / A	inibito
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	35-37°C / 18-24H / A	inibito

A: aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

## 11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le prestazioni di Chromart CRE sono state valutate in uno studio clinico da un Laboratorio di Microbiologia Clinica del nord-Italia<sup>5</sup> su 110 ceppi di batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi, 40 ceppi di Enterobatteri resistenti alle cefalosporine di 3a generazione o produttori di ESBL.

I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono. Le tabelle 1, 2, 3, 4 si riferiscono a 92 Enterobatteri e 18 Gram-negativi non fermentanti il lattosio resistenti ai carbapenemi attraverso diversi meccanismi di resistenza (inclusi 13 ceppi resistenti per perdita di porine) ed inoltre 40 Enterobatteri sensibili ai carbapenemi ma resistenti agli antibiotici beta-lattamici (ceppi AmpC ed ESBL).

Tab.1: Riassunto dei risultati riferiti ai ceppi produttori di carbapenemasi. (Ambler class A, B, D)

Meccanismo di resistenza	n° di ceppi	Crescita su ChromArt CRE*	Crescita su Tryptic Soy Agar*
KPC	60	60	60
KPC +ESBL	1	1	1
OXA	12	12	12
VIM	15	15	15
NDM	3	3	3
IMP	4	4	4
MBL	2	2	2
<b>TOTALI</b>	<b>97</b>	<b>97</b>	<b>97</b>

\*Semina di 100 µl di una sospensione batterica pari a circa 1,5x10<sup>4</sup> e 1,5x10<sup>6</sup> CFU

Tab. 2: Riassunto dei risultati riferiti ai ceppi resistenti ai carbapenemi per impermeabilità di membrana.

Meccanismo di resistenza	n° di ceppi	Crescita su ChromArt CRE*	Crescita su Tryptic Soy Agar*
AmpC + perdita porine	5	3	5
ESBL + perdita di porine	8	8	8
<b>TOTALI</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>13</b>

\*Semina di 100 µl di una sospensione batterica pari a circa 1,5x10<sup>4</sup> e 1,5x10<sup>6</sup> CFU





Tab 3: Riassunto dei risultati riferiti a ceppi sensibili ai carbapenemi.

Meccanismo di resistenza	N° di ceppi ***	crescita su ChromArt CRE *	crescita su Tryptic Soy Agar*
AmpC	10	0	10
ESBL	40	0	40
<b>TOTALI</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>50</b>

\*Con semina di 100 mcl di una sospensione microbica pari a circa  $1,5 \times 10^7$  UFC

Tab 4 : Sensibilità e specificità riferita ai targets

	Target: ceppi resistenti ai carbapenemi	Crescita su ChromArt CRE*	Target: ceppi produttori di carbapenemasi	Crescita su ChromArt CRE*
Veri positivi	110	108	97	97
Veri negativi	50	50	63	11
Falsi negativi		2		0
Falsi positivi		0		11
Sensibilità	98,2		100	
Specificità	100		85,1	

I dati dimostrano che il terreno ChromArt CRE rileva batteri Gram negativi resistenti ai carbapenemi con elevata sensibilità mentre non consente la crescita di organismi sensibili ai carbapenemi ma che possiedono altri meccanismi che possono causare resistenza agli antibiotici beta-lattamici, come ESBL o la sovrapproduzione di AmpC. Se l'obiettivo della ricerca è la determinazione dei ceppi produttori di carbapenemasi, la specificità è ridotta poiché il terreno consente la crescita di ceppi resistenti ai carbapenemi dovuta all'impermeabilità della membrana da perdita di porine.

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di ChromArt CRE e delle materie prime impiegate per la loro produzione (terreno in polvere Chromart CRE-ESBL Base REF 408025, addizionato di Chromart CRE Supplement REF 4240082) vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *K.pneumoniae* ATCC BAA-1705, ceppi d'isolamento clinico resistenti ai carbapenemi di *E.cloacae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, i ceppi target mostrano buone crescite con caratteristiche cromatiche tipiche.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate, con metodo ecometrico semiquantitativo, appropriate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non-target: *P.aeruginosa* ATCC 27853, *C.albicans* ATCC 10231, *S.aureus* (MR) ATCC 43300, *K.pneumoniae* ATCC 700603 produttore di ESBL, ceppo d'isolamento clinico di *E.cloacae* produttore di AmpC. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, la crescita di *P.aeruginosa* e *S.aureus* è totalmente inibita mentre la crescita degli altri ceppi non-target è parzialmente inibita.

## 12 - LIMITI DEL METODO

- Sul terreno possono crescere alcuni batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi per impermeabilità di membrana.
- Possono crescere sul terreno batteri Gram-negativi multiresistenti diversi dalle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (*Acinetobacter* e *Pseudomonas*).
- Ci sono poche prove che dimostrano come l'incubazione prolungata aumenti la sensibilità dei terreni cromogeni per CRE, ma ci sono prove che dimostrano che la specificità viene diminuita.<sup>1</sup>
- Lo screening per la colonizzazione intestinale da CRE è importante per lo sviluppo di strategie di controllo delle infezioni. Tuttavia, l'utilizzatore finale deve stabilire le modalità ottimali di screening per ciascuna sede e per ogni scopo specifico.
- I metodi colturali potrebbero non essere ottimali per il rilevamento della produzione di bassi livelli di carbapenemasi, che hanno comunque un significato epidemiologico.<sup>6</sup>
- Le procedure basate su metodi colturali richiedono sempre test di conferma per rilevare il tipo di gene *bla* presente, dopo che è stato rilevato un ceppo potenzialmente resistente.
- La crescita sul terreno dipende dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo e dalla resistenza agli antimicrobici presenti; alcuni ceppi target potrebbero non essere in grado di crescere sul terreno o potrebbero mostrare una crescita.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

## 13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni d'uso specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it) il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.





- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

**14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ**

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

**15 - BIBLIOGRAFIA**

1. Simner PJ, Humphries R. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. *In* Carrol KC, Pfaller MA *et al.* editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
2. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.01, July 2017.
3. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations (SMI) B 60: detection of bacteria with carbapenem hydrolysing  $\beta$ -lactamases (carbapenemases); September 2020.
4. Perry JD. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30:449-479.
5. Bracco S, Mauri C, Meroni E, Principe L, Pini B, Luzzaro F. Valutazione del terreno ChromArt CRE (Biolife) per la rilevazione di batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi. XLIII Congresso AMCLI, Sezione Poster, 2014.
6. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, Perez F, Endimiani A, Bonomo RA. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29:1-27.

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

<b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b>	<b>LOT</b> Numero di lotto	<b>IVD</b> Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Non riutilizzare	Fragile maneggiare con cura	

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	12/2020
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

