

**ISTRUZIONI PER L'USO****HAEMOPHILUS TEST MEDIUM****Piastre pronte all'uso**Haemophilus Test Medium:
AST di *H. influenzae***1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno per l'esecuzione del test di sensibilità agli antibiotici con il metodo della disco-diffusione su *Haemophilus* spp. isolati da campioni clinici, in accordo a CLSI.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Estratto di carne	2,0 g
Digerito acido di caseina	17,5 g
Amido solubile	1,5 g
Agar	17,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
NAD	15,0 mg
Ematina bovina	15,0 mg
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

Lo sviluppo della resistenza batterica agli antibiotici nella prima metà del XX secolo, ha comportato la necessità per i medici di richiedere al laboratorio di microbiologia di testare l'agente patogeno contro varie concentrazioni di un determinato antimicrobico per determinare la suscettibilità o la resistenza a quel farmaco.¹ William M.M. Kirby propose un metodo a disco singolo per il test di sensibilità antimicrobica e, successivamente, Kirby e Bauer, revisionarono la letteratura sui test di sensibilità e pubblicarono i loro risultati, consolidando e aggiornando tutte le precedenti descrizioni del metodo della disco-diffusione.²

Attualmente, il Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) per gli USA ed EUCAST per l'Europa sono responsabili dell'aggiornamento e della modifica della procedura originale, attraverso un processo di consenso globale.^{3,4} Nei documenti pubblicati sono incluse anche le linee guida interpretative per le zone di inibizione.^{3,5}

Mueller Hinton Agar con l'aggiunta di estratto di lievito, NAD ed ematina (Haemophilus Test Medium-HTM) come additivi per stimolare la crescita di *Haemophilus*, è stato descritto da Jorgesen *et al.* nel 1987 ed è attualmente raccomandato da CLSI³ per l'esecuzione del test di sensibilità agli antibiotici con il metodo della disco-diffusione su *Haemophilus* spp. Il documento CLSI M100⁴ riporta i breakpoints e le categorie interpretative per *H. influenzae* ed *H. parainfluenzae*; le raccomandazioni per l'esecuzione del test ed i breakpoints interpretativi per altre specie di *Haemophilus* sono incluse nel documento CLSI M45.⁷ Il test di diffusione su disco eseguito con HTM consente una classificazione accurata dei ceppi sensibili e resistenti ed una più agevole lettura ed interpretazione dei risultati rispetto al test eseguito con agar cioccolato Mueller-Hinton.⁶

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in piastra
pH finale a 25 °C

beige ambrato, limpido
7,3 ± 0,1

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Haemophilus Test Medium CND: W0104010403; EDMA: 14.01.04.03; RDM: 1444123/R	Piastre pronte all'uso	549901	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, materiali per la generazione di condizioni d'incubazione con CO₂, dischi di carta con antibiotici.

7 - CAMPIONI

Il test di sensibilità con il metodo della disco-diffusione è effettuato su colture pure dei ceppi in esame, isolati da campioni clinici. Haemophilus Test Medium non è destinato all'isolamento microbico direttamente da campioni clinici.

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

- Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.
- Preparare l'inoculo utilizzando colonie di *Haemophilus* spp. da una coltura di 20-24 ore su una piastra di agar cioccolato. Sospendere le colonie in soluzione salina e mescolare fino a ottenere una torbidità uniforme. Regolare la densità della sospensione fino ad ottenere una opacità simile a quello dello Standard McFarland 0,5 aggiungendo soluzione salina o più batteri. Le sospensioni 0,5 McFarland contengono approssimativamente da 1 a 4 x10⁸ UFC/mL. Fare attenzione nella preparazione di questa sospensione perché concentrazioni di inoculo più elevate possono portare a risultati di falsa resistenza con alcuni agenti antimicrobici β-lattamici, in particolare quando vengono testati ceppi di *H. influenzae* produttori di β-lattamasi.
- Immergere un tampone di cotone nella sospensione ed inoculare la piastra di Haemophilus Test Medium facendo uso di un inoculatore rotante automatico o strisciando manualmente su tutta la superficie del terreno avendo cura di verificare che non vi siano zone della piastra prive di inoculo.





- Entro 15 minuti dalla semina delle piastre posizionare i dischi con antibiotici. Prima della apertura delle cartucce contenenti i dischi lasciare che raggiungano la temperatura ambiente. Premere leggermente i dischi in modo che aderiscano bene alla superficie del terreno; una volta depositi sulla piastra non spostarli per nessuna ragione.
- Il numero di dischi su una piastra deve essere limitato per evitare la sovrapposizione delle zone di inibizione e l'interferenza tra gli agenti antimicrobici. È importante che i diametri delle zone possano essere misurati in modo affidabile. Testare un massimo di 9 dischi su una piastra da 140 mm e 4 dischi su una piastra da 90 mm.
- Entro 15 minuti dalla deposizione dei dischi, capovolgere le piastre, assicurandosi che non vi sia caduta dei dischetti di carta, e trasferire in termostato.
- Incubare a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in CO_2 al 5%, per 16-18 ore.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Misurare il diametro delle zone di completa inibizione, considerando l'area che non mostra una crescita evidente e visibile che può essere rilevata ad occhio nudo, comprendendo il diametro del disco. Tenere le piastre a pochi centimetri sopra uno sfondo nero illuminato con luce riflessa. Ignorare la debole crescita di minuscole colonie che possono essere rilevate solo con una lente d'ingrandimento sul bordo della zona di inibizione della crescita.

Con trimetoprim e sulfonamidi, gli antagonisti nel terreno consentono una lieve crescita all'interno dell'area di inibizione; ignorare tale leggera crescita (20% o meno di crescita) e misurare il margine più evidente per determinare il diametro della zona.

Interpretare i diametri delle zone di inibizione in categorie di suscettibilità secondo le tabelle dei breakpoint riportate da CLSI M100³ per *H.influenzae* e *H.parainfluenzae* e da CLSI M45 per altre specie di *Haemophilus*.⁷

10 - CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comune responsabilità 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. Selezionare il ceppo per il controllo di qualità specificato da CLSI e riportato di seguito, per monitorare le prestazioni del test.

H.influenzae ATCC 49247

Per i dettagli sulla frequenza suggerita dei controlli qualità, la scelta degli antibiotici e gli intervalli di accettabilità, consultare il documento CLSI.³

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita un campione rappresentativo di tutti i lotti di piastre pronte per l'uso di *Haemophilus* Test Medium è testato mediante test di sensibilità antimicrobica secondo la procedura CLSI³ con *H.influenzae* ATCC 49247 ed i seguenti dischi: tetraciclina 30 µg, imipenem 10 µg, ampicillina 10 µg, cefotaxime 30 µg, trimetoprim-sulfametossazolo 25 µg. Dopo incubazione a $35\text{-}37^\circ\text{C}$, in CO_2 al 5%, per 16-18 ore, vengono misurate le zone di inibizione, registrate e valutate in riferimento agli intervalli di controllo di qualità riportati dal CLSI.³

Le concentrazioni degli ioni Ca^{++} e Mg^{++} sono determinata su tutti i lotti di produzione della materia prima terreno in polvere Mueller Hinton Agar II (REF 401740) per assicurare una riproducibilità di risultati tra lotti diversi.

12 - LIMITI DEL METODO

- Con trimetoprim e sulfonamidi, gli antagonisti del terreno consentono una leggera crescita all'interno dell'area di inibizione; pertanto, leggere l'alone al punto in cui vi è una riduzione della crescita $\geq 80\%$ rispetto al controllo.
- Per i ceppi di *H.influenzae* isolati dal liquor, è opportuno segnalare solo i risultati dei test con ampicillina, una qualsiasi delle cefalosporine di terza generazione elencate di seguito, cloramfenicolo e meropenem.³
- Amoxicillina-clavulanato, azitromicina, cefaclor, cefdinir, cefepodoxime, cefprozil, cefuroxime e claritromicina sono usati come terapia empirica per le infezioni del tratto respiratorio dovute a *Haemophilus* spp. I risultati dei test di sensibilità con questi agenti antimicrobici spesso non sono necessari per la gestione dei singoli pazienti.³
- L'ottenimento di risultati accurati nel test di sensibilità dipende oltre che dalla qualità del terreno di coltura, dalla qualità dei dischi con antibiotici. EUCAST in uno studio del 2016, riporta variazioni consistenti nelle prestazioni di 16 tipi diversi di antibiotici reperiti da nove produttori.⁸ È responsabilità dell'utilizzatore implementare un piano per il controllo qualità dei dischi con antibiotici.
- Una concentrazione errata dell'inoculo, la conservazione impropria dei dischi con antimicrobici, la conservazione impropria delle piastre, con conseguente modifica dello strato del terreno e del pH, l'umidità eccessiva delle piastre, misurazioni scorrette delle zone di inibizione, sono tutti elementi che possono produrre risultati errati.⁹ Per garantire risultati affidabili è necessaria la stretta aderenza al protocollo di lavoro sopra riassunto.
- Consultare i documenti pubblicati da CLSI per i dettagli della procedura di lavoro, della lettura e dell'interpretazioni delle zone di inibizione, per le avvertenze, per i documenti di orientamento per il test di sensibilità, per le linee guida per il rilevamento dei meccanismi di resistenza, per i breakpoint clinici.
- Vengono pubblicati periodicamente supplementi informativi al documento CLSI M100, o versioni riviste, contenenti revisioni delle tabelle dei dischi e degli standard interpretativi. Consultare le tabelle più recenti per le raccomandazioni correnti.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alle scelte terapeutiche per le 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 europea 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 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.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- 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 tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito 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. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology (ASM), December 8, 2009.
2. Bauer AW, Perry DM, Kirby WM. Single disk antibiotic sensitivity testing of staphylococci. Analysis of technique and results. Arch Intern Med 1959; 104:208
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 8.0 (January 2020). <http://www.eucast.org>.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
6. Jorgensen JH, Redding JS, Maher LA, Howell AW. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of Haemophilus influenzae. J Clin Microbiol 1987; 25:2105-2113.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.
8. Ahman J, Matushek E, Kahlmeter G. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers EUCAST evaluations in 2014 and 2017. Clinical Microbiology and Infection 2019; 25:346-352
9. Matushek E. EUCAST Educational Workshop. Technical problems and controversies in antimicrobial susceptibility testing. ECCMID 2017, Vienna, Austria.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD 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 5	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	10/2020

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

