

# Test di agglutinazione al lattice per la proteina legante la penicillina (PBP2')

REF DR0900A.....

V50

IT

## 1. USO PREVISTO

Questo saggio rapido di agglutinazione al lattice permette di rivelare la proteina PBP2' (chiamata anche PBP2a)<sup>7</sup> in isolati di stafilococco per facilitare l'identificazione di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) e degli stafilococchi coagulasi-negativi resistenti alla meticillina.

## 2. PRINCIPI DEL TEST

Gli stafilococchi sono tra le principali cause al mondo di infezioni nosocomiali e acquisite in comunità<sup>2</sup>. In molti istituti, il 25-50% circa dei ceppi di *S. aureus* e il 75% degli stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS) è resistente alla meticillina<sup>12</sup>. Un fattore particolarmente preoccupante è la facilità con cui alcuni ceppi epidemici di MRSA si diffondono e colonizzano i pazienti debilitati. Per il trattamento dei ceppi sensibili è preferibile usare le penicilline resistenti alla penicillinasi (PRP) in quanto i farmaci beta-lattamici sono più facilmente assorbiti nei liquidi e nei tessuti corporei, causano meno complicanze e non selezionano microrganismi resistenti alla vancomicina. È quindi importante identificare in modo affidabile i ceppi resistenti alla meticillina.

I ceppi di *S. aureus* con suscettibilità ridotta alle PRP sono classificati nel modo seguente:

- iii(i) *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA), che produce la proteina legante la penicillina PBP2' a bassa affinità, codificata dal gene mecA<sup>3,6</sup>
- ii(ii) *S. aureus* con resistenza borderline alla meticillina (BORSA), la cui resistenza è generalmente attribuita all'iperproduzione di beta-lattamasi di tipo A<sup>10</sup>
- (iii) ceppi con PBP modificate in seguito all'alterata capacità di legare la penicillina o all'iperproduzione di PBP (MODSA)<sup>1,2</sup>. I MODSA sono stati isolati solo raramente e la loro risposta clinica alla terapia con beta-lattamici non è stata ben studiata. A scopi clinici, quindi, a parte rare eccezioni, la presenza di PBP2' è responsabile della resistenza alla meticillina nel trattamento delle infezioni da *S. aureus* e CoNS<sup>2,6</sup>.

Il fenotipo resistente alla meticillina può essere fortemente eterogeneo, il che ne rende difficile l'identificazione attraverso i test tradizionali di sensibilità agli antibiotici, come la concentrazione minima inibente (MIC), la disco-diffusione e lo screening su agar. L'accuratezza di questi metodi è influenzata dalla dimensione dell'inoculo, dal tempo e dalla temperatura di incubazione, dal terreno, dal pH, dalla concentrazione di sali e da altri fattori<sup>8,9</sup>. Inoltre, questi metodi di coltura necessitano di 24 ore di incubazione per fornire risultati accurati. I CoNS spesso producono quantità inferiori di PBP2' e necessitano di induzione mediante esposizione a una delle PRP per produrre una quantità di proteina sufficiente a essere rivelata<sup>2,3,12</sup>.

La rivelazione del gene mecA è stata considerata lo standard di riferimento per la determinazione della resistenza alla meticillina in virtù della sua precisione, ma è un metodo piuttosto laborioso e la sua esecuzione è costosa<sup>1,6</sup>. Il test al lattice PBP2' Oxoid ha il vantaggio di rilevare direttamente la proteina PBP2' in tempi rapidi e con una lavorazione minima. È potenzialmente anche più accurato della rivelazione del gene mecA in quanto non si verificano falsi positivi dovuti a ceppi che possiedono il gene, ma non sono in grado di sintetizzare la relativa proteina. Inoltre, il saggio non rivela ceppi iperproduttori di beta-lattamasi o PBP.

Il test PBP2' Oxoid è stato precedentemente valutato a livello mondiale, dimostrando estremamente sensibile e specifico<sup>4,5,11</sup>.

Le particelle di lattice sensibilizzate con un anticorpo monoclonale contro PBP2' reagiscono in modo specifico con gli stafilococchi resistenti alla meticillina determinando un'agglutinazione visibile a occhio nudo.

## 3. COMPONENTI DEL KIT

### TEST LATEX

DR0901 Particelle di test di lattice sintetico sensibilizzate con un anticorpo monoclonale contro PBP2'

### CONTROL LATEX

DR0902 Particelle di controllo di lattice sintetico rivestite con anticorpo di coniglio sensibilizzate con un anticorpo monoclonale della stessa sottoclasse di IgG, che non mostra alcuna reattività alle proteine di *S. aureus*  
DR0903 Reagente di estrazione 1

### EXTRACTION REAGENT 1

### EXTRACTION REAGENT 2

DR0904 Reagente di estrazione 2

### EXTRACTION REAGENT 1

### EXTRACTION REAGENT 2

Cartoncini di reazione  
Bastoncini per mescolare  
Foglietto di istruzioni

## 4. MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Micropipetta e puntali (50 µl)
- Anse per microbiologia (5 µl/1 µl)
- Bagno termostatico o blocco riscaldante
- Centrifuga (1500 x g)
- Provette per microcentrifuga (con chiusura di sicurezza)
- Disinfettante da laboratorio idoneo

## 5. PRECAUZIONI

**IVD** Questo prodotto è solo per uso diagnostico *in vitro*.

Il tempo di riscaldamento deve essere di tre minuti. Il riscaldamento per più di cinque minuti può causare una riduzione della sensibilità. Il riscaldamento per solo un minuto o meno può causare un'agglutinazione non specifica. Quando si rimuove il surnatante dopo la centrifugazione per usarlo nel test, ritirare attentamente la pipetta per evitare di aspirare il materiale solido sul fondo della provetta. La contaminazione con materiale solido può causare un'agglutinazione non specifica. Prima dell'uso, agitare bene i reagenti contenenti lattice per formare una sospensione omogenea.

I reagenti contengono lo 0,095% di sodio azide come conservante. La sodio azide è tossica e può reagire con le tubature in piombo o rame producendo azidi metalliche che sono esplosive per detonazione da contatto. Per impedire l'accumulo di azidi nelle tubature, far scorrere abbondante acqua subito dopo aver eliminato i rifiuti.

Poiché i campioni possono contenere microrganismi patogeni, manipolarli con le opportune precauzioni. La procedura di estrazione potrebbe non uccidere i batteri, per cui l'estratto deve essere manipolato con le stesse precauzioni.

I reagenti di estrazione 1 e 2 contengono una sostanza leggermente irritante e un acido debole. Evitare il contatto diretto indossando dispositivi di protezione idonei. Se il materiale entra in contatto con la pelle, le mucose o gli occhi, lavare immediatamente la zona con abbondante acqua.

## 6. CONSERVAZIONE



Conservare il kit a 2-8 °C. In queste condizioni i reagenti mantengono la loro reattività fino alla data di scadenza indicata sulla scatola.

## 7. PROCEDURE DI CONTROLLO

Per ogni nuovo lotto del kit e successivamente con frequenza settimanale, devono essere effettuate le seguenti procedure di controllo.

### 1. Controllo positivo

Utilizzare un ceppo di MRSA noto, come ATCC<sup>®</sup> 43300 (Thermo Scientific Culti-Loops<sup>™</sup> R4609022). Seguire il metodo indicato nelle istruzioni del test. Assicurarsi che l'agglutinazione avvenga entro 3 minuti.

### 2. Controllo negativo

Utilizzare un ceppo di *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina (MSSA) noto, come ATCC<sup>®</sup> 25923 o ATCC<sup>®</sup> 29213 (Thermo Scientific Culti-Loops<sup>™</sup> R4607010 o R4607011). Seguire il metodo indicato nelle istruzioni del test. Assicurarsi che non avvenga alcuna agglutinazione entro 3 minuti. Non utilizzare il test se le reazioni con i microrganismi di controllo non sono corrette.

3. Non utilizzare i kit dopo la data di scadenza.

## 8. NOTA PROCEDURALE IMPORTANTE

Evitare la contaminazione dei reagenti impendendo alla punta del contagocce di toccare il campione sul cartoncino di reazione. Assicurarsi che i tappi siano saldamente inseriti dopo l'uso per impedire che i reagenti vengano contaminati o si seccino. Dopo l'uso, riporre il kit in frigorifero, assicurandosi che i flaconi siano in posizione verticale.

## 9. PREPARAZIONE DELLA CULTURA

Possono essere testate colonie sviluppate su uno dei seguenti terreni di coltura:

Agar soia triptone (agar soia triptico) addizionato con 5% di sangue di pecora (TSA sangue), agar Columbia addizionato con 5% di sangue di pecora, agar Mueller-Hinton. Si raccomanda l'uso di culture fresche (18-24 ore). Possono comunque essere testate anche culture di 24-48 ore, se necessario per ottenere una crescita sufficiente. I dati sulle prestazioni riportati in questo foglietto di istruzioni sono stati ottenuti usando i terreni indicati, nel quadro della domanda di autorizzazione presentata alla Food and Drug Administration nordamericana. I dati in archivio mostrano che il test è efficace anche con colonie di *S. aureus* cresciute su agar soia triptone e agar Columbia addizionati con 5% di sangue di cavallo, agar Iso-Sensitest e DSTA. Questi terreni sono comunemente utilizzati in Europa ma non in Nord America per cui non sono stati usati negli studi impiegati per ottenere i dati riportati nella sezione Caratteristiche prestazionali.

### Requisiti speciali:

Il test PBP2' deve essere effettuato solo su specie di *Staphylococcus* (cocchi Gram-positivi). Per determinare se l'isolato è di *S. aureus* o di un'altra specie di stafilococco deve essere effettuato un test della coagulasi o equivalente.

### Preparazione dell'inoculo:

Per *S. aureus*, il test può essere effettuato a partire da colonie ben isolate sulla piastra di primo isolamento se la crescita è sufficiente oppure a partire da una sottocoltura dell'isolato. Eventuali altri microrganismi presenti sulla piastra non hanno dimostrato di interferire con il saggio. Per gli stafilococchi coagulasi-negativi, è necessaria un'induzione per ottenere quantità sufficienti di PBP2'.

1. Preparare una sospensione del microrganismo in brodo, con torbidità equivalente a 1 standard McFarland, e seminarla per striscio su TSA sangue, agar Columbia sangue o agar Mueller-Hinton. In alternativa, inoculare la piastra di agar con diverse colonie ed eseguire lo striscio in quattro quadranti.
2. Collocare un disco di oxacillina (1 µg/ml) sullo striscio o sul quadrante di inoculo principale.
3. Incubare a 37 °C per almeno 24 ore ma per non più di 48 ore.

Attenzione: per evitare risultati falsi negativi, non effettuare il test se non è disponibile inoculo sufficiente. Prelevare sempre i microrganismi vicino al disco.

## 10. METODO DEL TEST

### Procedura di estrazione della PBP2'

1. Aggiungere quattro gocce di Reagente di estrazione 1 in una provetta per microcentrifuga.
2. Per il test sono necessarie all'incirca  $1,5 \times 10^9$  (3-5 µl) cellule. Questa quantità può essere ottenuta utilizzando un'ansa sterile da 5 µl e rimuovendo una quantità sufficiente a colmare il diametro interno dell'ansa. In alternativa, è possibile utilizzare un'ansa sterile da 1 µl per rimuovere diverse colonie e raccogliere una quantità pari circa a 1 mm, che copra il diametro esterno dell'ansa. Sospendere la coltura nella provetta per microcentrifuga. Passare al vortex se sono presenti aggregati. La sospensione deve apparire molto torbida.
3. Mettere la provetta in acqua bollente o sul blocco riscaldante (a temperatura superiore a 95 °C) per tre minuti.
4. Togliere la provetta per microcentrifuga e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente.
5. Aggiungere una goccia di Reagente di estrazione 2 nella provetta e mescolare bene.
6. Centrifugare per cinque minuti a 1500 x g (3000 rpm con un raggio di rotazione di 15 cm o 4500 rpm con un raggio di rotazione di 4,5 cm). Utilizzare il surnatante per il test.

### Procedura di agglutinazione al lattice

1. Per ogni surnatante da testare, contrassegnare sul cartoncino di reazione un cerchio per il lattice di test e uno per il lattice di controllo.
2. Mescolare bene i reagenti contenenti lattice agitando vigorosamente per rendere il lattice uniforme e aggiungere una goccia di lattice di test o di lattice di controllo a ciascun cerchio contrassegnato.
3. Collocare 50 µl di surnatante sul cerchio del lattice di test e sul cerchio del lattice di controllo, evitando attentamente il pellet. Mescolare accuratamente il lattice e il surnatante in ciascun cerchio con uno degli appositi bastoncini.
4. Afferrare il cartoncino, muoverlo con movimento rotatorio per al massimo tre minuti e osservare l'agglutinazione in normali condizioni di illuminazione. Registrare i risultati del test e delle reazioni di controllo.
5. Smaltire in modo sicuro il cartoncino di reazione immergendolo in un disinfettante o gettarlo nei rifiuti infetti.

## 11. LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Agglutinazione osservata entro 3 minuti con il lattice di test ma non con il lattice di controllo	Positivo per la PBP2' (MRSA)
Assenza di agglutinazione entro 3 minuti con entrambi i reagenti contenenti lattice	Negativo per la PBP2' (MSSA)
Agglutinazione osservata entro 3 minuti con il lattice di controllo	Indeterminato

### Forza della reazione di agglutinazione

Negativa (-)	= sospensione omogenea di particelle senza aggregati visibili
Debolmente positiva (+)	= aggregati piccoli ma definiti su sfondo torbido
Fortemente positiva (+)	= aggregati grandi e piccoli su sfondo leggermente torbido o aggregati grandi su sfondo molto limpido.

Nota: occasionalmente, le reazioni negative possono presentare un aspetto finemente granulato o essere filamentose. In questi casi, il grado di trasparenza dello sfondo deve essere usato per interpretare il risultato. Uno sfondo opaco indica un risultato negativo e uno sfondo limpido deve essere interpretato come un risultato positivo.

## 12. LIMITAZIONI

I risultati indeterminati devono essere nuovamente analizzati con un estratto fresco. Se, dopo la ripetizione del test, il risultato risulta ancora indeterminato, la resistenza alla meticillina deve essere determinata con altri metodi. Possono verificarsi risultati falsi negativi se per il test viene utilizzata una quantità insufficiente di coltura. In questi casi, il test deve essere ripetuto con una quantità sufficiente.

I risultati veri positivi presentano generalmente reazioni forti.

Le reazioni false positive si verificano raramente ma presentano generalmente una debole agglutinazione. Questi risultati possono essere verificati ripetendo il test su una coltura fresca.

I ceppi di *S. aureus* modificati (MODSA) e quelli con resistenza borderline (BORSA) non possiedono PBP2' e non si prevede che reagiscano in questo test.

Alcuni ceppi di microrganismi possono avere un basso livello di resistenza alla meticillina o, in rari casi, produrre piccole quantità di PBP2' e fornire risultati falsi negativi.

A causa delle limitazioni di sensibilità e specificità dei test di sensibilità CLSI per gli stafilococchi coagulasi-negativi<sup>9</sup>, specialmente per i ceppi diversi da *Staphylococcus epidermidis*, i risultati ottenuti con il saggio PBP2' potrebbero non corrispondere a quelli dei test di sensibilità standard. Ceppi con valori di MIC  $\geq 0,5$  µg/ml devono essere considerati resistenti alla meticillina, indipendentemente dai risultati del saggio PBP2'.

## 13. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

1. Il test di agglutinazione al lattice per la proteina legante la penicillina Oxoid è stato valutato in quattro laboratori situati in diverse aree geografiche su isolati clinici freschi di *Staphylococcus aureus*. Sono stati testati 201 isolati con metodi NCCLS e con il test PBP2' Oxoid, a partire da tre diversi terreni. Su TSA sangue è stato ottenuto un risultato falso positivo debole alla reazione al lattice Oxoid (la ripetizione del test ha dato risultato negativo). Tutte le reazioni positive erano forti, tranne 3 reazioni deboli (ma positive) su agar Mueller-Hinton. La sensibilità del test al lattice nel rilevare gli MRSA su ciascun terreno è stata del 100%, la specificità del 99% per TSA sangue e del 100% per i test su tutti gli altri terreni.

**Risultati dei test sui 201 isolati clinici freschi di *S. aureus* nei 4 laboratori:**

	MRSA	BORSA <sup>A</sup>	MSSA
N. di isolati testati	68	3	130
Crescita su agar sale oxacillina (NCCLS)	68	0	0
MIC $\geq 4$ $\mu\text{g/ml}$ (NCCLS)	68	0	0
Lattice positivo su TSA sangue	68	0	1 (1) <sup>B</sup>
Lattice positivo su Columbia sangue	68	0	0
Lattice positivo su Mueller-Hinton	68 (3) <sup>B</sup>	0	0

<sup>A</sup> Le MIC erano di 2  $\mu\text{g/ml}$  e il risultato per mecA era negativo.

<sup>B</sup> Il numero di reazioni deboli è mostrato tra parentesi.

**2. Saggio di ceppi problematici di *S. aureus* in tre aree geografiche distinte:**

Tre laboratori hanno esaminato ciascuno un gruppo di ceppi problematici di *S. aureus* raccolti precedentemente e hanno confrontato i risultati del test PBP2' con i metodi NCCLS di determinazione degli MRSA. In totale, sono stati testati 724 ceppi coltivati su TSA sangue. La sensibilità del test PBP2' Oxoid è stata del 98,5% e la specificità del 100%. La sensibilità del test su agar e dei metodi MIC è stata rispettivamente del 98,7% e del 99,2% e la specificità del 90,0% e dell'88,7%. Sono stati anche testati separatamente due ceppi di MODSA; entrambi hanno fornito un risultato negativo con il test al lattice.

**3. Saggio di stafilococchi coagulasi-negativi**

Due laboratori hanno testato per la presenza di PBP2' stafilococchi coagulasi-negativi dopo induzione con dischi di oxacillina. Un laboratorio ha testato 115 ceppi resistenti alla meticillina e 45 ceppi sensibili alla meticillina, tra cui 58 isolati clinici freschi. La sensibilità è risultata pari al 96,5% per i test su TSA sangue e al 95,6% per quelli su agar Mueller-Hinton. La specificità è risultata pari al 100% per i test su TSA sangue e al 98% per quelli su agar Mueller-Hinton. Ottenere un buon inoculo è stato più difficile con l'agar Mueller-Hinton. Il secondo laboratorio ha testato 212 ceppi resistenti alla meticillina e 203 ceppi sensibili alla meticillina con una sensibilità del 99,5% e una specificità del 99,5%, usando agar Columbia per l'inoculo.

**4. Riproducibilità**

Dieci diversi ceppi di *S. aureus* ben caratterizzati (3 MRSA, 3 MSSA, 3 BORSA e 1 MODSA) sono stati inviati a tre laboratori situati in aree geografiche diverse; ciascun ceppo è stato inviato 5 volte usando una codifica in cieco. Tutti i 150 test hanno fornito risultati concordi con quelli attesi evidenziando una riproducibilità del 100%. I tre ceppi positivi per mecA sono risultati positivi ogni volta che sono stati testati (45/45 test). I tre ceppi di MSSA e i tre ceppi di BORSA hanno fornito risultati negativi ogni volta che sono stati testati (90/90 test). I ceppi di MODSA, che presentavano una MIC di 16  $\mu\text{g/ml}$  per l'oxacillina, hanno fornito un risultato negativo al test al lattice Oxoid, come previsto, ogni volta in cui esso è stato effettuato (15/15 test).

**14. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- Bignardi G.E., Woodford N., Chapman A., et al (1996). J. Antimicrobiol. Chemother., 37:53-63.
- Chambers H.F., (1997). Clin. Microbiol. Rev., 10:781-791.
- Gerberding J.L., Miick C., Liu H.H., et al (1991). Antimicrob. Agents Chemother., 35:2574-2579.
- Hussain Z., Stoakes L., Garrow S., et al (2000). J. Clin. Microbiol., 38:2051-2054.
- Louie L., Matsumura S.O., Choi E., et al (2000). J. Clin. Microbiol., 38:2170-2173.
- Murakami K., Minamide W., Wada K., et al (1991). J. Clin. Microbiol., 29:2240-2244.
- Nakatomi Y., and Sugiyama J., (1998). Microbiol. Immunol., 42:739-743.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000 Approved Standard Fifth Edition (M7-A5)). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Tenover F.C., Jones R.N., Swenson J.M., et al (1999). J. Clin. Microbiol., 37:4051-4058.
- Thornsbury C. and McDougal L. (1983). J. Clin. Microbiol., 18:1084-1091.
- Yamazumi T., Marshall S.A., Wilke W.W., et al (2001). J. Clin. Microbiol., 39:53-56.
- York M.K., Gibbs L., Chehab F., et al (1996). J. Clin. Microbiol., 34:249-253.

**15. LEGENDA DEI SIMBOLI**

	Numero di catalogo
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
	Consultare le istruzioni per l'uso (IFU)
	Limiti di temperatura (temp. di conservazione)
	Contiene materiali sufficienti per <N> test
	Codice del lotto (numero di lotto)
	Utilizzare entro (data di scadenza)
	Prodotto da



L'emblema ATCC Licensed Derivative™, il marchio denominativo ATCC Licensed Derivative® e i marchi del catalogo ATCC sono marchi di fabbrica di ATCC. Oxoid Limited è autorizzata a utilizzare questi marchi di fabbrica e a vendere prodotti derivati dalle colture di ATCC®.



IFU X6555C, revisione ottobre 2015 Stampato nel Regno Unito



Oxoid Limited,  
Wade Road,  
Basingstoke,  
Hampshire, RG24 8PW  
Regno Unito

Per assistenza tecnica, rivolgersi al proprio distributore di zona.