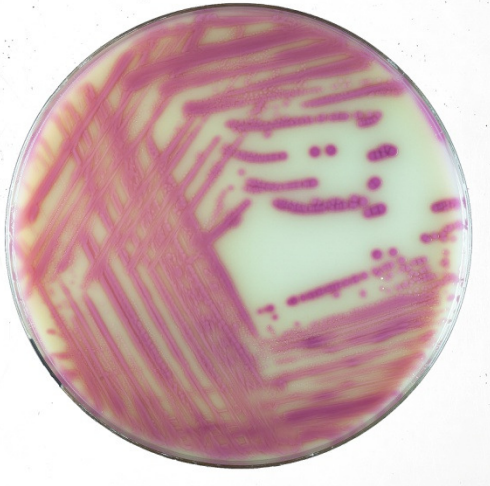


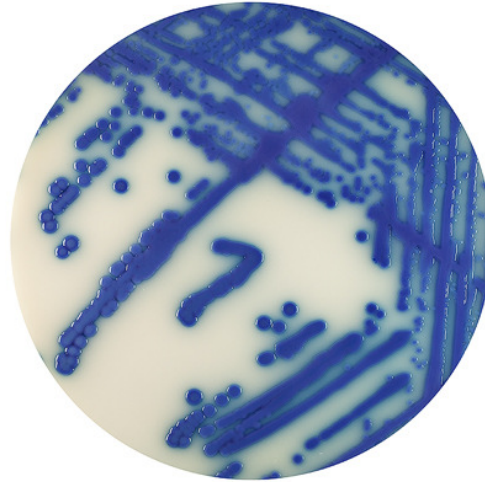


**ChromArt**

**CRE - ESBL Base**  
**ESBL Supplement - CRE Supplement**  
Terreno di coltura in polvere e supplementi selettivi



ESBL Medium:  
*Escherichia coli* produttore di ESBL



CRE Medium:  
*Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi

**DESTINAZIONE D'USO**

Terreno di base e supplementi selettivi per l'isolamento e l'identificazione presuntiva degli Enterobatteri produttori di ESBL in campioni clinici (ESBL Medium) e per l'isolamento e l'identificazione presuntiva dei batteri Gram negativi resistenti ai carbapenemi (CRE Medium).

**FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)\***

**CRE-ESBL Base (REF 4080252)**

Peptoni	16,0 g
Fattori di crescita	5,0 g
Opacizzante	10,0 g
Triptofano	2,0 g
Miscela di cromogeni	0,4 g
Agar	16,0 g

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

**CONTENUTO DEL FLACONE**

**ESBL Supplement (REF 4240080)**

Miscela di antimicrobici	0,21 g
--------------------------	--------

**CONTENUTO DEL FLACONE**

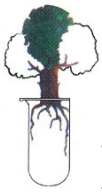
**CRE Supplement (REF 4240082)**

Miscela di antimicrobici	0,21 g
--------------------------	--------

**DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

**ESBL Medium**

Le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) sono enzimi trasferibili in grado di idrolizzare la maggior parte degli antibiotici betalattamici, comprese le cefalosporine di ultima generazione e i monobattami. La loro diffusione è ormai a livelli preoccupanti, sia in ambiente ospedaliero che comunitario. Il terreno in polvere addizionato del supplemento selettivo (ESBL Medium) è un terreno di screening, cromogeno selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione degli Enterobatteri produttori di ESBL. La selettività del terreno è dovuta alla presenza di una miscela di antibiotici inibitoria nei confronti dei batteri Gram-positivi, dei funghi ed dei batteri Gram negativi sensibili alle cefalosporine di terza o quarta generazione. La differenziazione batterica è ottenuta con una miscela di composti cromogeni atti ad evidenziare le attività enzimatiche specifiche di *E.coli*, dei batteri del gruppo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter Serratia*, *Citrobacter*) e del gruppo *Proteus-Morganella-Providencia*. *Acinetobacter* e *Pseudomonas* coltivano sul terreno con colonie incolori. Il fondo opaco del terreno consente una migliore evidenziazione delle colonie ed una loro più facile lettura.

**CRE Medium**

Le infezioni causate da batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi sono ormai un grave problema a livello mondiale, data l'elevata capacità di diffusione di tali microrganismi e la scarsità di opzioni terapeutiche disponibili. La loro precoce individuazione nei campioni clinici è un fattore determinante per prevenirne o limitarne la diffusione e preservare l'efficacia terapeutica dei carbapenemi. Il terreno in polvere addizionato del supplemento selettivo è un terreno di screening, cromogeno, selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi. La selettività del terreno è dovuta alla presenza di una miscela di antibiotici inibitoria nei confronti dei batteri Gram-positivi, dei funghi ed dei batteri Gram negativi sensibili ai carbapenemi. La differenziazione è ottenuta con una miscela di composti cromogeni atti ad evidenziare le attività enzimatiche specifiche di *E.coli*, dei batteri del gruppo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter Serratia*, *Citrobacter*) e del gruppo *Proteus-Morganella-Providencia*. *Acinetobacter* coltiva sul terreno con colonie incolori. Il fondo opaco del terreno consente una migliore evidenziazione delle colonie ed una loro più facile lettura.

**PREPARAZIONE**

Sciogliere 49,4 g di terreno in polvere ChromArt CRE-ESBL Base (REF 408025) in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50 °C.

Ad aliquote da 500 ml addizionare uno dei due supplementi (ESBL o CRE).

**ESBL Medium:** addizionare il contenuto di un flacone di ChromArt ESBL Supplement (REF 4240080) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile a 500 ml di terreno di base preparato e raffreddato come descritto.

**CRE Medium:** addizionare il contenuto di un flacone di ChromArt CRE Supplement (REF 4240082) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile a 500 ml di terreno di base preparato e raffreddato come descritto.

**CARATTERISTICHE DEL TERRENO****ChromArt CRE - ESBL Base**

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, grigia

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

terreno opaco di colore grigio

pH (20-25 °C)

7,2 ± 0,2

**CARATTERISTICHE DEI SUPPLEMENTI****ChromArt ESBL Supplement**

Aspetto del liofilizzato

pastiglia alta omogenea, rossastra

Aspetto della soluzione

rossastra opalescente

**ChromArt CRE Supplement**

Aspetto del liofilizzato

pastiglia alta omogenea, rossastra

Aspetto della soluzione

rossastra limpida o leggermente opalescente

**MATERIALI FORNITI**

Terreno di coltura in polvere ESBL-CRE Base e supplemento selettivi ESBL Supplement, CRE supplement

**MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI**

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

**CAMPIONI**

Il terreno può essere seminato direttamente con le feci raccolte su tampone e conservate in terreno semisolido di trasporto o con le feci sospese in soluzione fisiologica o in altro terreno liquido di trasporto. I terreni qui descritti possono essere inoculati anche con colture preparate da ceppi isolati da campioni clinici. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

**PROCEDURA DELL'ANALISI**

ESBL Medium e CRE Merdium: lasciare asciugare la superficie del terreno in piastra ed inoculare con il materiale fecale raccolto come sopra descritto, oppure inoculare con una ansata di crescita di una brodocoltura, con opacità pari a Mc Farland 0,5, ottenuta da una colonia isolata.

Strisciare con un'ansa su quattro quadranti, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate.

Incubare le piastre inoculate a 37 °C. In caso di assenza di crescita, proseguire l'incubazione per ulteriori 24 ore (48 ore complessive di incubazione).

**LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

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

Colonie	Identificazione presuntiva su CRE Medium	Identificazione presuntiva su ESBL Medium
Larghe colonie rosa / rosso-magenta	<i>E.coli</i> resistente ai carbapenemi	<i>E.coli</i> produttore di ESBL
Colonie blu/ verde-blu / blu-viola / grigio-viola	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> resistenti ai carbapenemi	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> produttori di ESBL



Colonie con alone marrone	<i>Proteus-Morganella-Providencia</i> resistenti ai carbapenemi	<i>Proteus-Morganella-Providencia</i> produttori di ESBL
Colonie bianche	<i>Acinetobacter</i> o altri Gram negativi non fermentanti, resistenti ai carbapenemi	<i>Acinetobacter, Pseudomonas</i> o altri Gram negativi non fermentanti, produttori di ESBL

Confermare la produzione di ESBL o la produzione di carbapenemasi con appropriati test diagnostici (es. kit per le resistenze Rosco).

**CONTROLLO QUALITÀ**

Ciascun lotto dei prodotti qui descritti è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. E' comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

**ESBL Medium (37°C per 24 ore)**

*K.pneumoniae* SHV-18 ATCC 700603: buona crescita colonie blu

*E.coli* ATCC 25922 crescita inibita

*C.albicans* ATCC 10231 crescita inibita

**CRE Medium**

*K.pneumoniae* ATCC BAA-1705: buona crescita colonie blu,

*E.coli* ATCC 25922 crescita inibita

*C.albicans* ATCC 10231 crescita inibita

A: incubazione in aerobiosi; M: incubazione in microaerofilia; A: Aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

**VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI ESBL MEDIUM**

Le prestazioni del terreno ESBL Medium sono state valutate in uno studio clinico da un Laboratorio di Microbiologia Clinica del nord-Italia (1) su: 2500 urinocolture e 38 colture di altri campioni clinici (emoculture e liquor). I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono.

Tab.1: Riassunto dei risultati ottenuti su 2538 campioni

	N°	Ceppi di Enterobatteri isolati	Enterobatteri confermati come produttori di ESBL*	Enterobatteri confermati come NON produttori di ESBL*
Campioni di urine	2500	736	79	657
Altri campioni clinici °	38	37	6	31
Totale	2538	773	85	688
<b>Crescita su ESBL Medium</b>			<b>84</b>	<b>12**</b>

\* la conferma della produzione di ESBL è stata eseguita con la tecnica del doppio disco

° 37 emocolture ed 1 liquor

Tab.2: Calcolo della sensibilità e specificità

	ESBL POS	ESBL NEG
<b>Crescita su ESBL Medium</b>	84 (veri positivi)	12 (falsi positivi)**
<b>Nessuna crescita su ESBL Medium</b>	1 (falso negativo)	688 (veri negativi)

\*\* : 9 dei 12 falsi positivi erano ceppi iper-produttori di AmpC

Sensibilità: 98,82%;

Specificità: 98,29%

I dati dimostrano che il terreno ChromArt ESBL è in grado di rilevare gli Enterobatteri produttori di ESBL con elevate sensibilità e specificità.

**VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI CRE MEDIUM**

Le prestazioni del CRE Medium sono state valutate in uno studio clinico da un Laboratorio di Microbiologia Clinica del nord-Italia (2) su: 110 ceppi di batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi, 40 ceppi di Enterobatteri resistenti alle cefalosporine di 3a generazione o produttori di ESBL, 25 tamponi rettali.

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 CRE Medium	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>Totale</b>	<b>97</b>	<b>97</b>	<b>97</b>

\*Semina di 100 µl di una sospensione batterica pari a circa  $1,5 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^6$

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

Meccanismo di resistenza	N° di ceppi	Crescita su CRE Medium	Crescita su Tryptic Soy Agar
AmpC + perdita di porine	5	3	5
ESBL + perdita di porine	8	8	8
<b>Totale</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>13</b>

\*Semina di 100 µl di una sospensione batterica pari a circa  $1,5 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^6$

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

Meccanismo di resistenza	N° di ceppi	Crescita su CRE Medium	Crescita su Tryptic Soy Agar
AmpC	10	0	10
ESBL	40	0	40
<b>Totale</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: produzione di carbapenemasi	Crescita su CRE Medium	Target: resistenza ai carbapenemi	Crescita su CRE Medium
Veri positivi	97	97	110	108
Veri negativi	63	11	50	0
Falsi positivi		11		0
Falsi negativi		0		2

Sensibilità	100%
Specificità	85.1%

98.2%
100%

I dati dimostrano che il terreno CRE Medium è in grado di rilevare batteri Gram negativi resistenti ai carbapenemi con elevate sensibilità mentre non consente la crescita di microrganismi sensibili ai carbapenemi ma che possiedono altri meccanismi che possono causare resistenza agli antibiotici beta-lattamici, come ESBL o iperproduttori di AmpC. Se il target della ricerca è la determinazione dei ceppi produttori di carbapenemasi, la specificità si riduce poiché il terreno consente la crescita di ceppi resistenti ai carbapenemi causata dalla impermeabilità di membrana per perdita di porine.

#### LIMITI DEL METODO (ESBL MEDIUM)

- Sul terreno possono crescere ceppi di batteri Gram-negativi iper-produttori di AmpC.
- Il terreno, contenendo cefpodoxime, può risultare inibitorio per i ceppi produttori di carbapenemasi del tipo Oxa-48.
- La crescita sul terreno qui descritto dipende dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo e dalla resistenza agli antimicrobici presenti; è possibile che alcuni ceppi target non siano in grado di coltivare sul terreno.
- Il terreno 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 dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

#### LIMITI DEL METODO (CRE MEDIUM)

- Sul terreno possono crescere ceppi di batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi per un meccanismo di impermeabilità di membrana ma non produttori di carbapenemasi.
- La crescita sul terreno qui descritto dipende dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo e dalla resistenza agli antimicrobici presenti; è possibile che alcuni ceppi target non siano in grado di coltivare sul terreno.
- Il terreno 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 dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.



### PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I terreni in polvere devono essere manipolati con una adeguata protezione delle vie respiratorie. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza del terreno in polvere e del supplemento selettivo.
- 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 questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto qui descritto con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare). Scaricare da sito web [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it) il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alla TSE.
- Il terreno di coltura ed i supplementi selettivi qui descritti sono diagnostici *in vitro* di tipo qualitativo, sono per uso professionale e devono essere usati in Laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Smaltire il terreno ed i supplementi non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).

### CONSERVAZIONE

**Terreno in polvere:** conservare a +2°C / +8°C al riparo della luce e dall'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento).

**Supplementi selettivi:** conservare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a 2-8 °C.

### BIBLIOGRAFIA

- 1- Valutazione del terreno ChromArt ESBL (Biolife) per la rilevazione degli Enterobatteri produttori di ESBL in campioni clinici. Cristina Comi, Silvia Bracco, Laura Colombo, Patrizia Bartesaghi, Rita Barletta, Martha Silva, Francesco Luzzaro. XLIII Congresso AMCLI, Sezione Poster, 2014
- 2- Valutazione del terreno ChromArt CRE (Biolife) per la rilevazione di batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi. Silvia Bracco, Carola Mauri, Elisa Meroni, Luigi Principe, Beatrice Pini, Francesco Luzzaro. XLIII Congresso AMCLI, Sezione Poster, 2014.

### CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
ChromArt CRE ESBL Base*	Terreno in polvere	4080252	500 g (10,1 L)
ChromArt ESBL Supplement **	Supplemento liofilizzato	4240080	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
ChromArt CRE Supplement **	Supplemento liofilizzato	4240082	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

\*CODICE CND W0104010101; \*\*CODICE CND W0104010104



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.