



ComASP™ Colistin / Piperacillin-tazobactam ENGLISH

System for susceptibility testing of colistin and piperacillin-tazobactam
with the broth microdilution method, according to ISO 20776-1.

DESCRIPTION

Colistin (polymyxin E) is used for the treatment of severe infections caused by multidrug-resistant microorganisms, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.

Piperacillin-tazobactam has activity against various gram-positive and gram-negative-organisms, including *Pseudomonas* and *Enterobacteria*, and is the drug of choice for the treatment of complicated skin and soft tissue infections (cSSTIs) and among its several uses has been suggested as alternative treatment to carbapenems for infections involving ESBL-producing Enterobacteriaceae.

A rational use of these two drugs is necessary to limit the spreading of resistant strains, which implies the need to determine the value of minimum inhibitory concentration (MIC) before the antibiotic is prescribed.

ComASP Colistin / Piperacillin-tazobactam is a single-isolate test panel containing the dried up antibiotics in 15 two-fold dilutions:

- colistin concentration ranges from 0.008 to 128 µg/ml;
- piperacillin concentration ranges from 0.008 to 128 µg/ml in the presence of a fixed concentration of tazobactam (4 µg/ml).

The system is used to perform the broth microdilution (BMD) method for the antimicrobial susceptibility testing of colistin (CS) and piperacillin-tazobactam (TZP) as recommended by international standards (i.e. CLSI, EUCAST, ISO) but in a simpler and less time-consuming way.

KIT CONTENT

- 4 Systems (panels) of ComASP Colistin/Pip-tazo (panels individually packed in foil with silica gel desiccant)
- 4 Vials of Mueller Hinton II Broth (7.2 ml)
- Instructions Sheet and Test Results Form

ITEMS NECESSARY BUT NOT INCLUDED IN THE KIT

- McFarland 0.5 Barium Sulphate Standard (ref.80400)
- Solution reservoir for multichannel pipette (ref. 96761)
- Physiological Solution (ref. 20095)
- Tips for multi.channel pipette (ref.96758)
- Multichannel pipette 30-300 µl (ref.96759)

CONFIGURATION

CS		Colistin concentration (µg/ml)					
Growth	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5
1	2	4	8	16	32	64	128
TZP		Piperacillin*-tazobactam concentration (µg/ml)					
Growth	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5
1	2	4	8	16	32	64	128

*Values on the panel refer to piperacillin while tazobactam is present at a fixed concentration of 4 µg/ml.

Growth indicates growth control: No antimicrobial agent in the well.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Each panel is used for the susceptibility testing of 1 isolate.

Wells are rehydrated with a standardized microbial suspension.

After incubation in thermostat the result is read and interpreted.

NOTE: ComASP Colistin/Pip-tazo meets the recommendations of the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group for MIC determination of colistin as summarized below.

- Cation-adjusted Mueller Hinton Broth is provided with the kit
- No additives are included in any part of the testing process (in particular no polysorbate-80 or other surfactants are added)
- Panels are made of polystyrene
- Sulphate salt of colistin is used for preparing the antibiotic solutions

COLLECTION AND STORAGE OF THE SAMPLE

ComASP Colistin/Pip-tazo is not for use directly with clinical or other specimens. The microorganism to be tested must first be isolated on a suitable non-selective culture medium. In case of mixed culture, selected colonies should be purified by subculturing.

TEST PROCEDURE

1. Take a panel from its envelope and leave it at room temperature for 10 min.
2. Prepare a suspension of the test organism using either the direct colony suspension or growth method.
3. Standardize the suspension to the density of a McFarland 0.5 standard.
4. Optimally within 15 min of preparation, dilute the adjusted suspension 1:20 in saline; this will be the **Solution A**.
5. Add 0.8 ml of Solution A to a tube of MH II Broth* provided in the kit to obtain the **Solution B**.
6. Dispense 100 µl of Solution B in each well of the test.
7. Cover the panel with the lid provided and incubate at $36 \pm 2^\circ\text{C}$ for 16-20 hours in ambient air.

* Mueller Hinton II Broth (g/l): Beef Extract 3.0 g; Acid Hydrolysate of Casein 17.5 g; Starch 1.5 g; Distilled Water 1000 ml;
pH 7.3 ± 0.1
(adjusted with appropriate salts to provide 20-25 mg/l of calcium and 10-12.5 mg/l of magnesium)

READING THE RESULTS

At the end of the incubation period observe the growth in the wells and establish the MIC, i.e. the lowest concentration of antibiotic that inhibits visible growth.

The result can be read visually or automatically. Reading by the naked eye can be improved by use of bright indirect lighting against a dark background.

Growth appears as turbidity or as a button at the bottom of the well (compare with the amount of growth in the growth-control well).

The growth-control well should be evaluated first. Make sure it is positive for growth. If not, check the viability of the colonies picked and repeat the test using a new panel and a microbial culture of recent growth.

Note the results on the Test Results Form included in the kit (copy as many form as necessary).

INTERPRETATION OF THE RESULTS

The MIC obtained should be interpreted according to current EUCAST or CLSI interpretative criteria.

USER QUALITY CONTROL

Quality control of ComASP Colistin/Pip-tazo is performed using the reference strains reported on the next page.

Strain		QC MIC range (µg/ml)	
		Colistin	Pip-tazo
1. <i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922, NCTC 12241	0.25 - 2	1 - 4
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 27853, NCTC 12903	0.5 - 4	1 - 8
3. <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 positive)	NCTC 13846	2 - 8 (target 4)	---
4. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 29213, NCTC 12973	---	0.25 - 2
5. <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212, NCTC 12697	---	1 - 4
6. <i>Escherichia coli</i>	ATCC® 35218, NCTC 11954	---	0.5 - 2
7. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 700603, NCTC 13368	---	8 - 32

Concentration of tazobactam is fixed at 4 µg/ml.

FACTORS THAT MAY INVALIDATE THE RESULTS

Contaminated culture; poor standardization of the inoculum; clinical material unsuitable; use of expired panels or expired supplementary reagents; non compliance with temperatures and times of incubation.

PRECAUTIONS

The product ComASP Colistin/Pip-tazo does not contain hazardous substances in concentrations exceeding the limits set by current legislation and therefore is not classified as dangerous. It is nevertheless recommended to consult the safety data sheet for its correct use. ComASP Colistin/Pip-tazo is a disposable device to be used only for diagnostic use *in vitro*. The product must be used in the laboratory by properly trained personnel, using approved aseptic and safety methods for handling pathogenic agents.

STORAGE

Store ComASP Colistin/Pip-tazo at 2-8°C in the original packaging. Keep away from direct sunlight and direct heat. Do not use the panels beyond the expiry date indicated on the label. Eliminate without using if there are signs of deterioration.

DISPOSAL OF USED MATERIAL

After use, ComASP Colistin/Pip-tazo and material that has come into contact with the sample must be decontaminated and disposed of in accordance with guidelines used in the laboratory for decontamination and disposal of potentially infected material.


REFERENCES

1. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th ed. CLSI Supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
2. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>.
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 7.0, 2017. <http://www.eucast.org>.
4. CLSI. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
5. ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.

PRESENTATION

Product	µg/ml	Packaging	Ref.
ComASPTM Colistin / Piperacillin-tazobactam	0.008 - 128 (colistin) 0.008 - 128 (piperacillin) 4 (tazobactam)	4 test	75003

TABLE OF SYMBOLS

IVD <i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device	 Do not reuse	 Manufacturer	 Contains sufficient for <n> tests	 Temperature limits
REF Catalogue number	 Fragile, handle with care	 Use by	 Caution, consult accompanying documents	LOT Batch code



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
 Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.com





ComASP™ Colistin / Piperacillin-tazobactam

ITALIANO

Sistema per i test di sensibilità della colistina e piperacillin-tazobactam
con il metodo della microdiluzione in brodo, secondo ISO 20776-1.

DESCRIZIONE

La colistina (polimixina E) è utilizzata per il trattamento di infezioni severe causate da microrganismi multi-resistenti (MRD) come *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi.

La piperacillina-tazobactam ha attività antimicrobica nei confronti di svariati microrganismi gram-positivi e gram-negativi, compreso *Pseudomonas* ed *Enterobacteria*, ed è il farmaco di elezione per il trattamento di infezioni complicate di cute e tessuti molli (CSSTIs). Tra le sue molteplici applicazioni è stata suggerita come un'alternativa ai carbapenemi per il trattamento delle infezioni che coinvolgono Enterobacteriaceae produttori di ESBL.

Si rende necessario un uso razionale di questi due farmaci al fine di limitare la diffusione dei ceppi resistenti, e ciò implica il bisogno di determinare il valore di minima concentrazione inibente (MIC) prima di prescrivere l'antibiotico.

ComASP Colistin / Piperacillin-tazobactam è un dispositivo contenente gli antibiotici essiccati in concentrazioni scalari:

- Il range di concentrazione della colistina va da 0.008 a 128 µg/ml;
- Il range di concentrazione della piperacillina va da 0.008 a 128 µg/ml in presenza di una concentrazione fissa di tazobactam (4 µg/ml);

Il sistema è utilizzato per eseguire il metodo della microdiluzione in brodo (BMD) per l'antibiogramma della colistina (CS) e della piperacillina-tazobactam (TZP) come raccomandato dagli standard internazionali (i.e. CLSI, EUCAST, ISO) ma in maniera più semplice e meno dispendiosa in termini di tempo.

CONTENUTO DEL KIT

- 4 Sistemi (pannelli) di ComASP Colistin/Pip-tazo (pannelli confezionati singolarmente in bustina con gel essiccante)
- 4 Provette di Mueller Hinton II Broth (7.2 ml)
- Istruzioni per l'Uso e Modulo Raccolta Dati

PRODOTTI NECESSARI MA NON CONTENUTI NEL KIT

- McFarland 0.5 Barium Sulphate Standard (ref. 80400)
- Puntali per pipetta multicanale (ref. 96758)
- Vaschetta per soluzione inoculo per pipetta multicanale (ref. 96761)
- Pipetta multicanale 30-300 µl (ref. 96759)
- Physiological Solution (ref. 20095)

CONFIGURAZIONE

CS		Concentrazione Colistina (µg/ml)					
Growth	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5
1	2	4	8	16	32	64	128

TZP		Concentrazione Piperacillin*-tazobactam (µg/ml)					
Growth	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5
1	2	4	8	16	32	64	128

*I numeri sul pannello si riferiscono a colistina e piperacillina mentre il tazobactam è presente con una concentrazione fissa di 4 µg/ml.
"Growth" indica il controllo di crescita: pozzetto non contenente l'agente antimicrobico.

PRINCIPIO DEL METODO

Ciascun pannello permette di effettuare il test di sensibilità di 1 isolato.
I pozzetti vengono reidratati con una sospensione microbica standardizzata.
I risultati si leggono ed interpretano dopo l'incubazione in termostato.

NOTA: ComASP Colistin/Pip-tazo soddisfa le raccomandazioni dalle linee guida (joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group) per la determinazione della MIC della colistina come riassunte di seguito.

- Brodo Mueller Hinton Cation-adjusted (supplementato con cationi per gli ioni calcio e magnesio) fornito con il kit
- Non sono inclusi additivi in alcuna parte della procedura del test (in particolare non sono aggiunti polisorbato-80 or altri surfattanti)
- Pannelli fatti di polistirene
- Si utilizza il sale di solfato della colistina per la preparazione della soluzione antibiotica

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

ComASP Colistin/Pip-tazo non è utilizzato direttamente con campioni clinici o di altro genere. I microrganismi da testare devono prima essere isolati su un terreno di coltura appropriato non selettivo. In caso di colture miste, le colonie selezionate dovrebbero essere purificate mediante subcoltura.

PROCEDURA DEL TEST

1. Prelevare un pannello dalla sua bustina e lasciare a temperatura ambiente per 10 min.
2. Preparare una sospensione del microrganismo da testare utilizzando direttamente la sospensione della colonia (direct colony suspension) o il metodo di crescita (growth method).
3. Standardizzare la sospensione alla densità 0.5 McFarland.
4. Approssimativamente entro 15 min dalla preparazione, diluire la sospensione 1:20 in fisiologica; questa sarà la **Soluzione A**.
5. Trasferire 0.4 ml di Soluzione A in una provetta di MH II Broth* fornita nel kit per ottenere la **Soluzione B**.
6. Dispensare 100 µl di Soluzione B in ciascun pozzetto del test.
7. Coprire il pannello con il coperchio fornito ed incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 16-20 ore in atmosfera aerobica.

* Mueller Hinton II Broth (g/l): Estratto di Manzo 3.0 g; Idrolizzato Acido di Caseina 17.5 g; Amido 1.5 g; Acqua Distillata 1000 ml; pH 7.3 ± 0.1 (formulazione compensata e/o corretta con sali adeguati per ottenere 20-25 mg/l di calcio e 10-12.5 mg/l di magnesio)

LETTURA DEI RISULTATI

Al termine del periodo di incubazione osservare la crescita nei pozzetti e stabilire la MIC, i.e. la concentrazione più bassa di antibiotico in grado di inibire una crescita visibile.

Il risultato può essere letto visualmente o automaticamente. La lettura ad occhio nudo può essere agevolata utilizzando luce indiretta e luminosa contro un fondo scuro.

La crescita appare come torbidità o come un bottone sul fondo del pozzetto (confrontare con la crescita nel pozzetto di controllo).

Valutare per prima il pozzetto di controllo. Assicurarsi che sia positivo per la crescita. Se negativo, controllare la vitalità delle colonie prelevate e ripetere il test utilizzando un nuovo pannello e una coltura microbica fresca.

Trascrivere i risultati sul Modulo Raccolta Dati incluso nel kit (fotocopiare il numero necessario di moduli).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il valore di MIC ottenuto va interpretato secondo i criteri aggiornati forniti da EUCAST o CLSI

CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo qualità del ComASP Colistin/Pip-tazo viene effettuato utilizzando i ceppi di riferimento riportati alla pagina seguente.

Ceppo		Range CQ MIC (µg/ml)	
		Colistin	Pip-tazo
1. <i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922, NCTC 12241	0.25 - 2	1 - 4
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 27853, NCTC 12903	0.5 - 4	1 - 8
3. <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 positivo)	NCTC 13846	2 - 8 (target 4)	---
4. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 29213, NCTC 12973	---	0.25 - 2
5. <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212, NCTC 12697	---	1 - 4
6. <i>Escherichia coli</i>	ATCC® 35218, NCTC 11954	---	0.5 - 2
7. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 700603, NCTC 13368	---	8 - 32

La concentrazione del tazobactam è fissa a 4 µg/ml.

FATTORI CHE POSSONO INVALIDARE I RISULTATI

Culture contaminate; scarsa standardizzazione dell'inoculo; materiale clinico non adatto; utilizzo di pannelli scaduti o reagenti supplementari scaduti; non rispetto delle temperature e tempi di incubazione.

PRECAUZIONI

Il prodotto ComASP Colistin/Pip-tazo non contiene sostanze dannose in concentrazioni superiori ai limiti fissati dalla normativa vigente e perciò non è classificato come pericoloso. Ciononostante si raccomanda di consultare la scheda di sicurezza per il corretto utilizzo. ComASP Colistin/Pip-tazo è un dispositivo monouso per esclusivo uso diagnostico *in vitro*. Il prodotto deve essere utilizzato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.

CONSERVAZIONE

Conservare ComASP Colistin/Pip-tazo a 2-8°C nella confezione originale. Tenere al riparo dalla luce diretta del sole e da fonti di calore. Non utilizzare i pannelli oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta. Non utilizzare ed eliminare se vi sono segni di deterioramento.

ELIMINAZIONE DEL MATERIALE UTILIZZATO

Dopo l'utilizzo, ComASP Colistin/Pip-tazo ed il materiale venuto a contatto con il campione devono essere decontaminati e smaltiti in accordo con le tecniche in uso in laboratorio.








BIBLIOGRAFIA

1. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th ed. CLSI Supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
2. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>.
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 7.0, 2017. <http://www.eucast.org>.
4. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Tenth Edition. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
5. ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.

PRESENTAZIONE

Prodotto	µg/ml	Confezionamento	Ref.
ComASP™ Colistin/Piperacillin-tazobactam	0.008 - 128 (colistin) 0.008 - 128 (piperacillin) 4 (avibactam)	4 test	75003

TABELLA DEI SIMBOLI

IVD Dispositivo Medico Diagnostico <i>In Vitro</i>	 Non riutilizzare	 Fabbricante	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Temperature limits
REF Numero di catalogo	 Fragile, maneggiare con cura	 Utilizzare entro	 Attenzione, consultare i documenti all'interno	LOT Codice del lotto



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.com

