



Kat. č.: MLT00046

Pro mikrobiologii

Souprava je určena pro stanovení citlivosti Gram-negativních nefermentujících bakterií k antibiotikům na základě determinace MIC (minimální inhibiční koncentrace), tzn. nejnižší koncentrace, která zamezí viditelnému růstu bakterií. Obsahuje 10 stanovení.

Princípem testu je rehydratace antibiotik v jamkách pomocí Mueller Hinton II bujony a přidání bakteriální suspenze. Po 16 – 20 hodinové inkubaci jsou výsledky odečítány vizuálně nebo pomocí readeru.

Souprava obsahuje:

- 10 vyšetřovacích desek
- 1 víčko (nesterilní)
- 10 ks PE sáčků

Skladování a expirace soupravy:

Skladování je doporučeno při (+2 až +25) °C, expirace je vyznačena na obalu. Po vyndání z chladničky nechejte destičky temperovat při pokojové teplotě minimálně po dobu 30 minut k zamezení kondenzace vody. Po otevření hliníkového obalu a sejmutí folie nenechávejte již otevřené destičky bez ochrany. Vzdušná vlhkost ohrožuje funkčnost antibiotik!!!

Potřeby pro práci se soupravou, které nejsou součástí soupravy:

- Sterilní nepufrovaný fyziologický roztok
- Mueller Hinton bujon II adjustovaný na kationty (např. suspenzní médium MIC, kat. č. MLT00070)
- Etanol
- Sterilní zkumavky
- Inokulátor ErbaDip kat. č. 50004456
- Sterilní Petriho misky
- Sterilní vaničky 60 ml kat. č. 50004457
- Krokovací pipeta na 100 µl nebo multikanálová pipeta 100 µl
- Pipeta na 60-100 µl
- Densitometer (např. DENSILAMETER II kat.č. INS00062)
- Inkubátor 35±2°C
- Běžné laboratorní vybavení (klíčky, popisovače, kahan, atd.)

Upozornění: Souprava je určena pouze k profesionálnímu použití. Dodržujte zásady pro práci s infekčním materiálem!

Pracovní postup

Příprava bakteriální suspenze a inokulace:

A) Inokulace inokulátorem

- 1) Vyjměte destičku z hliníkového obalu a sejměte fólii. Označte destičku typem soupravy (NEFERM) a zaznamenejte číslo vyšetřované kultury. Rozpipetujte do všech jamek po 100 µl suspenzního média MIC.
- 2) Připravte zkumavku s 12 ml fyziologického roztoku. Přidejte 100 µl suspenzního média MIC ke snížení povrchového napětí inokula.
- 3) Z 18 – 24 hodinové kultury na krevním agaru setřete několik kolonií a připravte ve fyziologickém roztoku bakteriální suspenzi o 0,5 McFarland. Je důležité věnovat speciální pozornost přípravě homogenní suspenze především u pseudomonád. Alternativně může být použita růstová metoda: 3-5 kolonií je přeneseno do zkumavky s vhodným bujonem a inkubováno až do pomnožení na denzitu 0,5 McFarland. Pokud je tato denzita překročena, je hustota suspenze upravena sterilním fyziologickým roztokem nebo bujonem na požadovaný zákal o hodnotě 0,5 McFarland.
- 4) Tuto suspenzi vlijte do sterilní Petriho misky.
- 5) Inokulujte rozplněnou destičku pomocí sterilního inokulátoru: inokulátor smočte v Petriho misce s etanolem a ožehněte nad plamenem. Vychladlý inokulátor smočte v Petriho misce s bakteriální suspenzí. Přeneste inokulum do 1. poloviny destičky jemným kroužením v jamkách. Opět smočte inokulátor v Petriho misce s bakteriální suspenzí a opakujte inokulaci 2. poloviny destičky.

B) Inokulace pipetou

- 1) Připravte zkumavku s 2 ml fyziologického roztoku.
- 2) Z 18 – 24 hodinové kultury na krevním agaru setřete několik kolonií a připravte ve fyziologickém roztoku bakteriální suspenzi o denzitě 0,5 McFarland. Je důležité věnovat speciální pozornost přípravě homogenní suspenze především u pseudomonád. Alternativně může být použita růstová metoda: 3-5 kolonií je přeneseno do zkumavky s vhodným bujonem a inkubováno až do pomnožení na denzitu 0,5 McFarland. Pokud je tato denzita překročena, je hustota suspenze upravena sterilním fyziologickým roztokem nebo bujonem na požadovaný zákal o hodnotě 0,5 McFarland.
- 3) Přeneste 60 µl z bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku do zkumavky s 13 ml suspenzního média MIC a dobře homogenizujte.
- 4) Vyjměte destičku ze sáčku a sejměte fólii. Označte destičku typem soupravy (NEFERM) a zaznamenejte číslo vyšetřované kultury. Rozplňte suspenzní médium MIC s inokulem po 100 µl do každé jamky.

Poznámka: Destičku zpracujte do 60 minut po vyjmutí ze sáčku.

Inkubace:

Nainokulovanou destičku vložte do PE sáčku, jehož okraje zahnete pod desku tak, aby nedocházelo k vysychání inokula.

Destičku vložte do termostatu 35±2 °C na 16-20 hod. Pokud u pomalu rostoucích kmenů bakterií (např. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* a *Pseudomonas aeruginosa* z cystických fibros) nelze MIC odečíst, inkubace se prodlouží o 20 hodin při pokojové teplotě.

Vyhodnocení:

Destičku vyjměte z PE sáčku. Pro odečítání nárůstu v jamkách zvolte způsob, který je pro Vás nejpřijatelnější:

- 1) Odečítejte proti šedému pozadí nebo proti tabulce destičky v návodu.
- 2) Odečítejte proti přirozenému nebo umělému rozptýlenému světelnému zdroji.
- 3) Použití lupy není doporučováno.
- 4) Odečítejte s pomocí readeru a identifikačního softwaru.

Prosím věnujte pozornost:

V jamce s kontrolou růstu (K) musíte vidět nárůst! Jestliže nárůst není, test NELZE HODNOTIT! Jako MIC je hodnocena jamka s nejnižší koncentrací antibiotika, která zamezí okem viditelnému růstu bakterií. Pouze u Trimetoprimu/sulfametoxazolu musí být MIC odečítána při nejnižší koncentraci, která inhibuje růst přibližně o ≥ 80% v porovnání s jamkou pro kontrolu růstu. Odlište zrnění od případných bublin! Výsledky zaznamenejte.

Tab. 1: Rozložení antibiotik a jejich koncentračních řad v mg/l na destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
A	128/64	128	128/4	16	16	16	32	64	16	8	8	4/76
B	64/32	64	64/4	8	8	8	16	32	8	4	4	2/38
C	32/16	32	32/4	4	4	4	8	16	4	2	2	1/19
D	16/8	16	16/4	2	2	2	4	8	2	1	1	0,5/9,5
E	8/4	8	8/4	1	1	1	2	4	1	0,5	0,5	0,25/4,75
F	4/2	4	4/4	0,5	0,5	0,5	1	2	0,5	0,25	0,25	0,122,38
G	2/1	2	2/4	0,25	0,25	0,25	0,5	1	0,25	0,12	0,12	0,06/1,19
H	1/0,5	1	1/4	0,12	0,12	0,12	0,25	0,5	0,12	0,06	0,06	K

Tab 2: Klinické breakpointy MIC (mg/l) pro nefermentující bakterie dle interpretačních tabulek EUCAST (1)

Antibiotikum	Zkratka	<i>Pseudomonas sp.</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R
Ampicilin / sulbaktam	AMS	-	-	-				IE		IE
Piperacilin	PIP	≤16		≥32				IE		IE
Piperacilin / tazobaktam	PIT	≤16/4		≥32/4				IE		IE
Ceftazidim	CAZ	≤8		≥16				-	-	-
Aztreonam	AZT	≤1	2-16	≥32				-	-	-
Meropenem	MER	≤2	4-8	≥16				≤2	4-8	≥16
Gentamicin	GEN	≤4		≥8				≤4		≥8
Amikacin	AMK	≤8	16	≥32				≤8	16	≥32
Kolistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloxacín	CIP	≤0.5		≥1				≤1		≥2
Tigecyklin	TGC	-	-	-				IE		IE
Trimetoprim/sulfametoxazol	T/S	-	-	-	≤4/76			≥8/152	≤2/38	4/76

Tab 3: Klinické breakpointy MIC (mg/l) pro nefermentující bakterie dle dokumentu CLSI (2)

Antibiotikum	Zkratka	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Burkholderia cepacia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R
Ampicilin / sulbaktam	AMS							≤8/4	16/8	≥32/16
Piperacilin	PIP	≤16	32-64	≥128				≤16	32-64	≥128
Piperacilin / tazobaktam	PIT	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4				≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Ceftazidim	CAZ	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32
Aztreonam	AZT	≤8	16	≥32						
Meropenem	MER	≤2	4	≥8	≤4 jen pro B. cepacia	8 jen pro B. cepacia	≥16 jen pro B. cepacia	≤2	4	≥8
Gentamicin	GEN	≤4	8	16				≤4	8	≥16
Amikacin	AMK	≤16	32	≥64				≤16	32	≥64
Kolistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloxacín	CIP	≤1	2	≥4				≤1	2	≥4
Tigecyklin	TGC									
Trimetoprim/sulfametoxazol	T/S				≤2/38		≥4/76	≤2/38		≥4/76

Poznámky k interpretacím:

Dle stanovené MIC se testovaný kmen řadí do kategorie citlivý – intermediární - rezistentní k danému antibiotiku na základě aktuálních interpretačních tabulek EUCAST (1) nebo CLSI dokumentu M100 (2). IE dle EUCAST (1) indikuje, že není dostatek důkazů o tom, že *Acinetobacter spp.* je dobrým cílem pro léčbu daným antibiotikem. Výsledek může obsahovat MIC s komentářem, avšak bez kategorizace S, I nebo R.

V závislosti na národních nebo laboratorních standardech je nutné použít další interpretační kritéria, např. EUCAST Expert rules (3) nebo CLSI dokument M100 (2) a M07 (4). Při interpretaci výsledků je třeba zohlednit druhovou identifikaci kmene, původ vzorku, anamnézu pacienta, případně výsledky doplňujících testů. U druhů *S. maltophilia* a *B. cepacia* doporučujeme hodnotit MIC pouze u antibiotik doporučených dle EUCAST nebo CLSI.

Kontrola kvality:

Pro kontrolu kvality soupravy doporučujeme níže uvedené kontrolní kmeny. Při vyhodnocení výsledků testování kontrolními kmeny se řídte standardem EUCAST nebo CLSI.

CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
-	1-8	1/4-8/4	1-4	2-8	0,25-1	0,5-2	1-4	0,5-4	0,25-1	-	-

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
2/1-8/4	1-4	1/4-4/4	0,06-0,5	0,06-0,25	0,008-0,06	0,25-1	0,5-4	0,25-2	0,004-0,015	0,03-0,25	≤0,5/9,5

CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT									
8/4-32/16	>64	0,5/4-2/4									

NCTC 13846 <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 pozitivní) MIC (mg/l)											
-	-	-	-	-	-	-	COL 4* (výjimečně 2 nebo 8)	-	-	-	-

*Hodnota platí pro ≥ 90 % izolátů, v ojedinělých případech může být pozorována MIC 2 nebo 8 mg/L (zdroj: EUCAST)

ATCC – American Type Culture Collection

CCM – Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, přírodovědecká fakulta, Kamenice 5, budova A25, 625 00 Brno, Tel: 549 491 430, Fax: 549 498 289, <http://www.sci.muni.cz/ccm>, e-mail: ccm@sci.muni.cz

Ochrana zdraví: Komponenty soupravy nejsou klasifikovány jako nebezpečné.

Likvidace použitého materiálu: Po použití vložte destičku do nádoby pro infekční materiál a likvidujte dle vlastních interních předpisů, autoklávejte nebo zničte spálením. Prázdné papírové obaly se předají do sběru k recyklaci.

Literatura:

- (1) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI dokument M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI dokument M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Datum revize: 9.4. 2018

POUŽITÉ SYMBOLY



Katalogové číslo



In vitro diagnostikum



Výrobce



Čtete návod k použití



Číslo šarže



Teplota skladování



Datum expirace



Cat. N.: MLT00046

For microbiology

The kit is designed to test antimicrobial susceptibility of Gram-negative non-fermentative bacteria on the basis of MIC (minimal inhibitory concentration) determination, i.e. the lowest concentration, which inhibits bacterial growth. The kit contains 10 examinations (plates). The test is based on the rehydration of antibiotics in the wells with Muller Hinton II broth and addition of bacterial suspension. The results are read visually or by reader after 16-20 hours of incubation.

The kit contains:

- 10 plates for examination
- A lid (non-sterile)
- 10 pc of PE bags

Storage and expiration of the kit:

It is recommended to store the kit at (+2 to +25) °C. The date of expiration is indicated on each package. Leave plate at room temperature at least for 30 minutes before you open it to avoid water condensation. After the aluminium package is opened, don't leave opened plates unprotected!!! Exposition to air humidity leads to antibiotic activity failure!!!

Material required to perform a test, not included in the kit:

- Sterile physiological solution (unbuffered)
- Muller Hinton broth II cations adjusted (e.g. suspension medium MIC Cat. N. MLT00070)
- Ethanol
- Sterile tubes
- Inoculator ErbaDip Cat. N. 50004456
- Sterile Petri dishes
- Sterile basins 60 ml Cat. N. 50004457
- A stepper or multichannel pipette for dosage of 100 µl
- A pipette for dosage of 60-100 µl
- Densitometer (e.g. DENSILAMETER II Cat. N. INS00062)
- Incubator 35±2 °C
- Regular microbiological laboratory equipment (loops, marker, burner, etc.)

Caution: The kit is for professional use only! Respect the rules for work with infectious material!

Instructions for Use

Preparation of bacterial suspension and inoculation (recommended procedure):

A) Inoculation with inoculator

- 1) Remove a plate from aluminium bag and remove aluminium cover. Mark the frame with a type of kit (NEFERM) to avoid mistake in reading results after incubation. Record number of examined strain on the plate. Fill 100 µl of suspension medium MIC into each well.
- 2) Prepare a tube with 12 ml of physiological solution. Add 100 µl of suspension medium MIC to decrease surface tension.
- 3) Remove few colonies from 18 – 24 hour culture on blood agar and prepare a bacterial suspension of density of 0.5 on McF scale in physiological solution. It is necessary to give extra attention to achieving a smooth suspension of 0.5 McFarland when preparing inoculum of *Pseudomonas* spp. The growth method can be used alternatively: 3-5 colonies are transferred into a tube with suitable broth medium and incubated until the turbidity of 0.5 Mc Farland is achieved or exceeded. The turbidity of the broth culture is adjusted with sterile saline or broth to 0.5 Mc Farland standard.
- 4) Pour the bacterial suspension into a sterile Petri dish.
- 5) Use sterile inoculator to inoculate the plate: dip inoculator into Petri dish with ethanol and flame it. Dip the cooled inoculator into a Petri dish with prepared bacterial suspension. A thin film of bacterial suspension is adhered to metal spikes of inoculator. Transfer inoculum to the first half of the plate by dipping into wells and careful mixing. Make a new dip into the Petri dish with prepared bacterial inoculum and inoculate the second half of the plate.

B) Inoculation with pipette

- 1) Prepare a tube with 2 ml of physiological solution.
- 2) Remove few colonies from 18 – 24 hour culture on blood agar and prepare a bacterial suspension of density of 0.5 on McFarland scale in physiological solution. It is necessary to give extra attention to achieving a smooth suspension of 0.5 McFarland when preparing inoculum of *Pseudomonas* spp. The growth method can be used alternatively: 3-5 colonies are transferred into a tube with suitable broth medium and incubated until the turbidity of 0.5 Mc Farland is achieved or exceeded. The turbidity of the broth culture is adjusted with sterile saline or broth to 0.5 Mc Farland standard.
- 3) Place 60 µl of bacterial suspension into a tube with 13 ml of suspension medium MIC, homogenise well.
- 4) Remove a plate from aluminium bag and remove aluminium cover from the plate. Mark the frame with a type of kit (NEFERM) to avoid mistake in reading results after incubation. Record number of the examined strain on the plate.
- 5) Inoculate each well of the plate with 100 µl of bacterial suspension prepared in suspension medium MIC.

Note: Process a plate within 60 minutes after removing it from aluminium bag.

Incubation:

Insert the inoculated plate into a PE bag. Fold the open end of the bag under the plate to prevent evaporation during the incubation. Incubate the plate at 35±2 °C for 16 – 20 hours. If MIC can not be evaluated in slowly growing strains (e.g. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis) extend the incubation for another 20 hours at room temperature.

Evaluation:

Remove the plate from the PE bag. To read the growth in the microwells, choose a way which is the most convenient for you:

- 1) Read against a grey background or against plate layout in instructions.
- 2) Read against natural or artificial dispersed light.
- 3) Usage of magnifying glass is not recommended.
- 4) Evaluate test using reader and identification software.

Please read with attention!

You must see a growth in the control well (K)! If the growth is not present, the test MUST NOT be evaluated! The MIC is the lowest concentration of antibiotic in a well where no visible growth of the organism is observed. Exception: With Trimethoprim/sulfamethoxazol, a well with ≥ 80% growth inhibition compared to the growth control is considered as MIC. Beware to differentiate grains of growth from media bubbles. Record the results.

Tab. 1: Plate layout: antibiotics dilution series (in mg/l)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
A	128/64	128	128/4	16	16	16	32	64	16	8	8	4/76
B	64/32	64	64/4	8	8	8	16	32	8	4	4	2/38
C	32/16	32	32/4	4	4	4	8	16	4	2	2	1/19
D	16/8	16	16/4	2	2	2	4	8	2	1	1	0.5/9.5
E	8/4	8	8/4	1	1	1	2	4	1	0.5	0.5	0.25/4.75
F	4/2	4	4/4	0.5	0.5	0.5	1	2	0.5	0.25	0.25	0.12/2.38
G	2/1	2	2/4	0.25	0.25	0.25	0.5	1	0.25	0.12	0.12	0.06/1.19
H	1/0.5	1	1/4	0.12	0.12	0.12	0.25	0.5	0.12	0.06	0.06	K

Tab. 2: Clinical MIC Breakpoints (in mg/l) for Gram-negative non-fermentative bacteria according to EUCAST (1)

Antibiotics	Abbr.	<i>Pseudomonas sp.</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>			
		Sensitive S	Inter-mediate I	Resistant R	Sensitive S	Inter-mediate I	Resistant R	Sensitive S	Inter-mediate I	Resistant R	
Ampicillin / sulbactam	AMS	-	-	-				IE		IE	
Piperacillin	PIP	≤16		≥32				IE		IE	
Piperacillin / tazobactam	PIT	≤16/4		≥32/4				IE		IE	
Ceftazidime	CAZ	≤8		≥16				-	-	-	
Aztreonam	AZT	≤1	2-16	≥32				-	-	-	
Meropenem	MER	≤2	4-8	≥16				≤2	4-8	≥16	
Gentamicin	GEN	≤4		≥8				≤4		≥8	
Amikacin	AMK	≤8	16	≥32				≤8	16	≥32	
Colistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4	
Ciprofloxacin	CIP	≤0.5		≥1				≤1		≥2	
Tigecycline	TGC	-	-	-				IE		IE	
Trimethoprim/sulfamethoxazole	T/S	-	-	-	≤4/76			≥8/152	≤2/38	4/76	≥8/152

Tab. 3: Clinical MIC Breakpoints (in mg/l) for Gram-negative non-fermentative bacteria according to CLSI (2)

Antibiotics	Abbr.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Burkholderia cepacia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Sensitive S	Inter-mediate I	Resistant R	Sensitive S	Inter-mediate I	Resistant R	Sensitive S	Inter-mediate I	Resistant R
Ampicillin / sulbactam	AMS							≤8/4	16/8	≥32/16
Piperacillin	PIP	≤16	32-64	≥128				≤16	32-64	≥128
Piperacillin / tazobactam	PIT	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4				≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Ceftazidime	CAZ	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32
Aztreonam	AZT	≤8	16	≥32						
Meropenem	MER	≤2	4	≥8	≤4 only B. cepacia	8 only B. cepacia	≥16 only B. cepacia	≤2	4	≥8
Gentamicin	GEN	≤4	8	16				≤4	8	≥16
Amikacin	AMK	≤16	32	≥64				≤16	32	≥64
Colistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloxacin	CIP	≤1	2	≥4				≤1	2	≥4
Tigecycline	TGC									
Trimethoprim/sulfamethoxazole	T/S				≤2/38		≥4/76	≤2/38		≥4/76

Interpretation:

The tested strain is categorised as sensitive-intermediate-resistant to a particular antibiotic on the basis of MIC determination. This categorisation is based on EUCAST: Breakpoint (1) or according to CLSI document M100 (2). „IE“ indicates that there is insufficient evidence that the species in question is a good target for therapy with the drug. An MIC with a comment but without an accompanying S, I or R categorisation may be reported.

Other interpretative criteria have to be used depending on national and laboratory standards, e.g. EUCAST Expert rules (3) or CLSI documents M100 (2) and M07 (4). It is necessary to take into consideration following parameters when interpreting results: species identification, sample origin, patient case history, or results of additional tests. We recommend to evaluate MIC only for antibiotics recommended by EUCAST or CLSI for *S. maltophilia* and *B. cepacia*.

Quality control: We recommend following control strains for internal testing of functionality of the antibiotics in the laboratory. Follow EUCAST or CLSI standards when evaluating results.

CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
-	1-8	1/4-8/4	1-4	2-8	0.25-1	0.5-2	1-4	0.5-4	0.25-1	-	-
CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
2/1-8/4	1-4	1/4-4/4	0.06-0.5	0.06-0.25	0.008-0.06	0.25-1	0.5-4	0.25-2	0.004-0.015	0.03-0.25	≤0.5/9.5
CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT									
8/4-32/16	>64	0.5/4-2/4									
NCTC 13846 <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 positive) MIC (mg/l)											
-	-	-	-	-	-	-	COL 4* (exceptionally 2-8)	-	-	-	-

*The value is valid for ≥ 90% isolates and should only on occasion be 2 or 8 mg/L (source: EUCAST)

ATCC – American Type Culture Collection

CCM – Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Faculty of Science, Kamenice 5, building A25, 625 00 Brno, CZ, Tel. +420 549 491 430, Fax +420 549 498 289, <http://www.sci.muni.cz/ccm>, e-mail: ccm@sci.muni.cz

Health protection: Components of the kit are not classified as dangerous.

Disposal of the used material: Insert the used plate into the vessel intended for the infectious material and autoclave or destroy it by incineration. Put paper packaging waste to recycling.

Literature:

- (1) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI dokument M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI dokument M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Date of revision: 9.4.2018

USED SYMBOLS



Catalogue number



In vitro diagnostics



Manufacturer



See instruction for use



Lot number



Storage temperature



Expiry date

10020297



Nr kat.: MLT00046

Do celów mikrobiologicznych

Zestaw przeznaczony jest do oznaczenia wrażliwości na antybiotyki bakterii gramujemnych niefermentujących na podstawie określenia MIC (minimalnego stężenia hamującego), tzn. najniższego stężenia, które zahamuje widoczny wzrost bakterii. Zestaw umożliwi przeprowadzenie 10 badań. Test oparty jest na zasadzie ponownego nawodnienia antybiotyków w studzienkach za pomocą Mueller Hinton II bulionu i dodaniu zawiesiny bakterii. Po 16-20 godzinach inkubacji wyniki odczytywane są wizualnie lub za pomocą czytnika.

Zestaw zawiera:

- 10 płytek testowych
- 1 niesterylną pokrywę
- 10 szt. PE torebek

Przechowywanie i data ważności zestawu:

Zestaw zaleca się przechowywać w temperaturze +2 do +25 °C. Termin ważności podany jest na każdym opakowaniu. Po wyjęciu z lodówki należy płytki pozostawić w temperaturze pokojowej przez co najmniej 30 minut, w celu ograniczenia skraplania wody. Po otwarciu aluminiowego opakowania i zdjęciu folii nie należy pozostawiać raz otwartą płytkę bez ochrony. Wilgoć w powietrzu zagraża prawidłowej funkcji antybiotyków !!!

Materiały potrzebne do pracy z zestawem, które nie wchodzi do składu zestawu:

- Roztwór sterylnej soli fizjologicznej (niebuforowanej)
- Mueller Hinton bulion II dostosowany do kationów (np. Nośnik zawiesiny MIC nr kat. MLT00070)
- Etanol
- Probówki sterylne
- Inokulator ErbaDip nr kat. 50004456
- Sterylne płytki Petriego
- Sterylne wianiki 60 ml nr kat. 50004457
- Pipeta (dozator) na 100 µl lub wielokanałowa pipeta 100 µl
- Pipeta na 100 µl
- Densytmometr (np. DENSILAMETER II nr kat. INS00062)
- Ciepłarka 35±2 °C
- Podstawowe wyposażenie laboratoryjne (ezy, markery, palnik, itd.)

Ostrzeżenie: Zestaw przeznaczony jest wyłącznie do profesjonalnego zastosowania. Należy przestrzegać zasad pracy z materiałem zakaźnym !

Sposób postępowania

Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej oraz inokulacja:

A) Inokulacja za pośrednictwem inokulatora

- 1) Wyjąć płytkę z aluminiowego opakowania i zdjąć ochronną folię aluminiową z płytki (tuż przed rozpoczęciem inokulacji). Oznaczyć płytkę rodzajem zestawu (NEFERM), opisać numery badanych kultur. Pipetować do wszystkich studzienek po 100 µl nośnika zawiesiny MIC.
- 2) Przygotować probówkę z 12 ml sterylnej soli fizjologicznej (niebuforowanej). Podczas inokulacji dodać 100 µl nośnika zawiesiny MIC, żeby zmniejszyć napięcie powierzchniowe inokulum.
- 3) Z 18 – 24 godzinnej kultury na agarze krwawym pobrać kilka kolonii i przygotować w roztworze soli fizjologicznej zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 McFarland. Należy zwrócić szczególną uwagę na przygotowanie jednorodnej zawiesiny przede wszystkim w przypadku rodzaju *Pseudomonas*. Jako alternatywę można zastosować metodę wzrostową: 3-5 kolonii przenieść do probówki z odpowiednim bulionem i inkubować rozmnażając do gęstości 0,5 McFarland. W przypadku przekroczenia tej wartości należy gęstość dostosować za pomocą sterylnej soli fizjologicznej lub bulionu do wymaganej wartości 0,5 McFarland.
- 4) Tak przygotowaną zawiesinę wlać na sterylną płytkę Petriego.
- 5) Inokulować napełnioną płytkę za pomocą sterylnej inokulatora: inokulator nawilżyć w płycie Petriego z etanolem i wyżarzyć nad płomieniem. Ostygły inokulator nawilżyć w płycie Petriego z zawiesiną bakteryjną. Przenieść inokulum do pierwszej połowy płytki delikatnym krążeniem inokulatora w studzienkach. Ponownie nawilżyć inokulator w płycie Petriego i powtórzyć inokulację drugiej połowy płytki.

B) Inokulacja za pośrednictwem pipety

- 1) Przygotować probówkę z 2 ml sterylnej soli fizjologicznej.
- 2) Z 18 – 24 godzinnej kultury na agarze krwawym pobrać kilka kolonii i przygotować w roztworze soli fizjologicznej zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 McFarland. Należy zwrócić szczególną uwagę na przygotowanie jednorodnej zawiesiny przede wszystkim w przypadku rodzaju *Pseudomonas*. Jako alternatywę można zastosować metodę wzrostową: 3-5 kolonii przenieść do probówki z odpowiednim bulionem i inkubować rozmnażając do gęstości 0,5 McFarland. W przypadku przekroczenia tej wartości należy gęstość dostosować za pomocą sterylnej soli fizjologicznej lub bulionu do wymaganej wartości 0,5 McFarland.
- 3) Przenieść 60 µl z zawiesiny bakteryjnej w roztworze soli fizjologicznej (niebuforowanej) do probówki z 13 ml nośnika zawiesiny MIC i dokładnie zhomogenizować.
- 4) Wyjąć płytkę z aluminiowego opakowania i zdjąć ochronną folię aluminiową z płytki (tuż przed rozpoczęciem inokulacji). Oznaczyć płytkę rodzajem zestawu (NEFERM), opisać numery badanych kultur. Pipetować do wszystkich studzienek po 100 µl nośnika zawiesiny MIC z inokulum.

Uwaga: Przetwarzaj płytkę w ciągu 60 minut od wyjęcia z aluminiowego opakowania.

Inkubacja:

Płytkę po inokulacji włożyć do PE torebki, zagiąć otwarty brzeg torebki pod płytkę, aby zapobiec wysychaniu inokulum. Płytkę włożyć do ciepłarki w temp. 35±2°C na 16 – 20 godz. W przypadku wolno rosnących gramujemnych bakterii niefermentujących (np. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas aeruginosa* z mukowiscydozy) kiedy nie można odczytać MIC, należy przedłużyć inkubację o 20 godzin w temperaturze pokojowej.

Ocena:

- 1) odczytać za pomocą czytnika i identyfikacji oprogramowania.
- 2) odczytać wizualnie na szarym tle lub na tle tabelki płytki w instrukcji obsługi
- 3) odczytać wizualnie na tle naturalnego lub sztucznego rozproszonego źródła światła
- 4) użycie lupy nie zaleca się

Prosimy o zwrócenie uwagi:

W studzience z kontrolą wzrostu powinien być wzrost !!! Jeżeli nie ma wzrostu, test NIE MOŻNA OCENIAĆ !

Jako MIC ocenia się studzienkę z najniższym stężeniem antybiotyku, która zahamuje okiem widoczny wzrost bakterii. Tylko w przypadku Trimetoprimu/sulfamethoxazolu powinna być MIC odczytywana przy najniższym stężeniu, które hamuje wzrost ok. o ≥ 80% w porównaniu ze studzienką dla kontroli wzrostu.

Należy odróżnić ziarnistość od ewentualnych pęcherzyków powietrza ! Wyniki wpisać do formularza.

UWAGA: dla użytkowników systemu Mikrola wraz z programem MIKROB AUTOMAT ocenę studzienki kontroli wzrostu przeprowadza program MIKROB AUTOMAT automatycznie na podstawie odczytu za pomocą czytnika.

Tab. 1: Rozkład antybiotyków i ich stężeń na płytce w mg/l

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
A	128/64	128	128/4	16	16	16	32	64	16	8	8	4/76
B	64/32	64	64/4	8	8	8	16	32	8	4	4	2/38
C	32/16	32	32/4	4	4	4	8	16	4	2	2	1/19
D	16/8	16	16/4	2	2	2	4	8	2	1	1	0,5/9,5
E	8/4	8	8/4	1	1	1	2	4	1	0,5	0,5	0,25/4,75
F	4/2	4	4/4	0,5	0,5	0,5	1	2	0,5	0,25	0,25	0,12/2,38
G	2/1	2	2/4	0,25	0,25	0,25	0,5	1	0,25	0,12	0,12	0,06/1,19
H	1/0,5	1	1/4	0,12	0,12	0,12	0,25	0,5	0,12	0,06	0,06	K

Tab 2: Breakpointy kliniczne MIC (mg/l) dla *Enterobacteriaceae* na podstawie EUCAST (1)

Antybiotyk	Skrót	<i>Pseudomonas sp.</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>			
		Wraż. S	Średnio-wrażl. I	Oporny R	Wraż. S	Średnio-wrażl. I	Oporny R	Wraż. S	Średnio-wrażl. I	Oporny R	
Ampicillin / sulbactam	AMS	-	-	-				IE		IE	
Piperacylina	PIP	≤16		≥32				IE		IE	
Piperacylina / tazobaktam	PIT	≤16/4		≥32/4				IE		IE	
Ceftazydym	CAZ	≤8		≥16				-	-	-	
Aztreonam	AZT	≤1	2-16	≥32				-	-	-	
Meropenem	MER	≤2	4-8	≥16				≤2	4-8	≥16	
Gentamycyna	GEN	≤4		≥8				≤4		≥8	
Amikacyna	AMK	≤8	16	≥32				≤8	16	≥32	
Kolistyna	COL	≤2		≥4				≤2		≥4	
Ciprofloksacyna	CIP	≤0,5		≥1				≤1		≥2	
Tigecyklina	TGC	-	-	-				IE		IE	
Trimethoprim / sulfamethoxazol	T/S	-	-	-	≤4/76			≥8/152	≤2/38	4/76	≥8/152

Tab 3: Breakpointy kliniczne MIC (mg/l) dla *Enterobacteriaceae* na podstawie CLSI (2)

Antybiotyk	Skrót	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Burkholderia cepacia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Wraż. S	Średnio-wrażl. I	Oporny R	Wraż. S	Średnio-wrażl. I	Oporny R	Wraż. S	Średnio-wrażl. I	Oporny R
Ampicillin / sulbactam	AMS							≤8/4	16/8	≥32/16
Piperacylina	PIP	≤16	32-64	≥128				≤16	32-64	≥128
Piperacylina / tazobaktam	PIT	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4				≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Ceftazydym	CAZ	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32
Aztreonam	AZT	≤8	16	≥32						
Meropenem	MER	≤2	4	≥8	≤4 tylko dla B. cepacia	8 tylko dla B. cepacia	≥16 tylko dla B. cepacia	≤2	4	≥8
Gentamycyna	GEN	≤4	8	16				≤4	8	≥16
Amikacyna	AMK	≤16	32	≥64				≤16	32	≥64
Kolistyna	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloksacyna	CIP	≤1	2	≥4				≤1	2	≥4
Tigecyklina	TGC									
Trimethoprim / sulfamethoxazol	T/S				≤2/38		≥4/76	≤2/38		≥4/76

Uwagi do interpretacji:

Wg oznaczonego MIC badany szczep przyporządkowany jest do kategorii wrażliwy – średniowrażliwy – oporny na dany antybiotyk na podstawie tabeli interpretacyjnych EUCAST (1) lub na podstawie dokumentu CLSI M100 (2). „IE” dla EUCAST (1) wskazuje, że nie ma wystarczających dowodów na to, że *Acinetobacter spp.* jest odpowiednim celem leczenia za pomocą danego antybiotyku. Wynik może zawierać MIC z komentarzem, jednakże bez zaklasyfikowania do kategorii S, I lub R.

W zależności od krajowych lub laboratoryjnych standardów można użyć kolejne kryteria interpretacyjne, np. EUCAST Expert rules (3) dokument CLSI M100 (2) i M07 (4). Podczas interpretacji wyników należy wziąć pod uwagę identyfikację szczepu do gatunku, pochodzenie próbki, wywiad chorobowy pacjenta, ewentualnie wyniki testów uzupełniających. W przypadku gatunków *S. maltophilia* a *B. Cepacia* zalecamy oceniać MIC wyłącznie w przypadku antybiotyków zalecanych wg EUCAST lub CLSI.

Kontrola jakości:

Dla kontroli jakości zestawu zalecamy poniżej wymienione szczepy kontrolne. Podczas oceny wyników testowania szczepami kontrolnymi należy kierować się standardem EUCAST lub CLSI.

CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) MIC (mg/l)												
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S	
-	1-8	1/4-8/4	1-4	2-8	0,25-1	0,5-2	1-4	0,5-4	0,25-1	-	-	

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) MIC (mg/l)												
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S	
2/1-8/4	1-4	1/4-4/4	0,06-0,5	0,06-0,25	0,008-0,06	0,25-1	0,5-4	0,25-2	0,004-0,015	0,03-0,25	≤0,5/9,5	

CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) MIC (mg/l)												
AMS	PIP	PIT										
8/4-32/16	>64	0,5/4-2/4										

NCTC 13846 <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 positive) MIC (mg/l)												
							COL 4* (nadzwyczaj 2-8)					
-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	

*Wartość odnosi się do ≥ 90% izolatów, w rzadkich przypadkach można zaobserwować MIC 2 lub 8 mg/l (źródło: EUCAST)

ATCC – American Type Culture Collection

CCM – Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Faculty of Science, Kamenice 5, building A25, 625 00 Brno, CZ, Tel. +420 549 491 430, Fax +420 549 498 289, <http://www.sci.muni.cz/ccm>, e-mail: ccm@sci.muni.cz

Ochrona zdrowia: Odczynnik zestawu nie są klasyfikowane jako niebezpieczne.

Likwidacja zużytego materiału: Po zużyciu wszystkie płytki należy włożyć do pojemnika dla materiałów zakaźnych i likwidować wg własnych wewnętrznych przepisów, autoklawować lub spalić. Puste papierowe opakowania należy przekazać do recyklingu.

Literatura:

(1) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters, <http://www.eucast.org>

(2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI dokument M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

(3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, <http://www.eucast.org>

(4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI dokument M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Data rewizji: 9.4. 2018

UŻYTE SYMBOLE

REF Numer Katalogowy

IVD Urządzenie Diagnostyczne in Vitro

Producent

Patrz: Instrukcja Użycia

LOT Numer Partii

Temperatury Graniczne

Termin Ważności

10020297



Номер в каталоге № MLT00046

Для микробиологических исследований

Набор предназначен для определения чувствительности неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) к антибактериальным препаратам на основании определения МПК (минимальной подавляющей концентрации), т. е. наименьшей концентрации, которая подавляет бактериальный рост. Упаковка рассчитана на определение чувствительности 10 бактериальных культур (10 планшетов). Методика основана на регидратации антибиотика в лунках планшета с помощью бульона Мюллер-Хинтон II и внесении в лунки планшета бактериальной культуры. Результаты определения чувствительности учитывают визуально или с использованием автоматического анализатора-ридера через 16 – 20 часов инкубации..

Упаковка содержит:

- 10 планшетов для определения чувствительности
- Крышку (не стерильная)
- 10 шт. полиэтиленовых пакетиков

Хранение и срок годности:

Рекомендуется хранить упаковку при темп. от +2 - +25°C. Срок годности указан на индивидуальной алюминиевой упаковке каждого планшета.

Внимание! Попадание в лунки планшета влаги воздуха или конденсата может привести к потере активности антибиотиков и ложным результатам теста!!!

- Для предотвращения попадания конденсата в лунки планшета необходимо вскрывать индивидуальную упаковку спустя не менее 30 минут её пребывания при комнатной температуре!
- После вскрытия индивидуальной алюминиевой упаковки не оставлять планшет открытым для предотвращения увлажнения и контаминации лунок!

Расходные материалы необходимые для выполнения исследования, не включенные в упаковку:

- Стерильный физиологический раствор (небуферизованный)
- Мюллер-Хинтона бульон II с регулируемым катионным составом (например: суспензионная среда MIC /МПК/ номер в каталоге № MLT00070)
- Этанол
- Стерильные пробирки
- Инокулятор ErbaDip номер в каталоге № 50004456
- Стерильные чашки Петри
- Стерильные ёмкости 60 мл номер в каталоге № 50004457
- Стеллер или многоканальная пипетка до 100 мкл
- Пипетка с диапазоном дозирования 60 – 100 мкл
- Денситометр (напр.: DENSILAMETER II номер в каталоге № INS00062)
- Термостат, 35±2 °C
- Стандартное оснащение бактериологической лаборатории (петли, маркер, горелка и т. д.)

Внимание: набор предназначен только для профессионального использования ! Соблюдайте правила работы с инфицированным материалом !

Инструкция по применению

Приготовление бактериальной суспензии и инокуляция (рекомендации по процедуре):

А) Инокуляция планшета с использованием инокулятора:

- 1) Достаньте планшет из индивидуальной алюминиевой упаковки и удалите алюминиевое покрытие с поверхности. Нанесите маркировку о типе планшета (напр.: NEFERM) на рамку для предотвращения ошибок при учёте результатов после инкубации. Запишите на планшете номер исследуемой бактериальной культуры. Внесите по 100 мкл суспензионной среды в каждую лунку планшета.
- 2) Подготовьте пробирку с 12 мл физиологического раствора. Добавьте 100 мкл суспензионной среды MIC для уменьшения поверхностного натяжения.
- 3) Приготовьте бактериальную суспензию с мутностью 0,5 по МакФарланду из нескольких колоний чистой 18-24 часовой культуры, выращенной на кровяном агаре. Важно обратить особое внимание на подготовку однородной суспензии, особенно в *Pseudomonas*.
- 4) Перенесите бактериальную суспензию в стерильную чашку Петри.
- 5) Используйте стерильный инокулятор для инокуляции в планшет: погрузите инокулятор в чашку Петри с этанолом и обожгите в пламени горелки. Затем охладите инокулятор. Погрузите инокулятор в чашку Петри с бактериальной суспензией. Тонкая плёночка бактериальной суспензии адгезируется на поверхности металлических игл инокулятора. Перенесите инокулюм на половину планшета с уже добавленной суспензионной средой, погрузите иглы в лунки и аккуратно смешайте. Выполните такую же процедуру для второй половины планшета.

В) Инокуляция планшета с использованием пипетки

- 1) Подготовьте пробирку с 2 мл физиологического раствора.
- 2) Приготовьте бактериальную суспензию с мутностью 0,5 по МакФарланду из нескольких колоний чистой 18-24 часовой культуры, выращенной на кровяном агаре. Важно обратить особое внимание на подготовку однородной суспензии, особенно в *Pseudomonas*.
- 3) Поместите 60 мкл бактериальной суспензии в пробирку с 13 мл суспензионной среды MIC, тщательно перемешайте.
- 4) Достаньте планшет из индивидуальной алюминиевой упаковки и удалите алюминиевое покрытие с поверхности. Нанесите маркировку о типе планшета (напр.: NEFERM) на рамку для предотвращения ошибок при учёте результатов после инкубации. Запишите на планшете номер исследуемой бактериальной культуры. Инокулируйте в каждую лунку планшета по 100 мкл бактериальной суспензии, приготовленной в суспензионной среде MIC.

Примечание: Обработайте диск в течение 60 минут после вынимания из мешка

Инкубация:

Поместите планшет с внесённой в него бактериальной суспензией в полиэтиленовый пакетик. Подогните открытый край пакета под планшет для предотвращения испарения во время инкубации. Инкубируйте планшет в термостате при 35±2 °C 16 – 20 часов.

Учет результатов:

Достаньте планшет из полиэтиленового пакетика. Для учёта результатов роста в микролунках выберите наиболее подходящий для Вас способ:

- 1) Учитывайте результат на темном фоне или используйте для этого макет планшета, напечатанный в инструкции.
- 2) Учитывайте результаты в проходящих лучах естественного или искусственного освещения.
- 3) Использование увеличительного стекла (лупы) не рекомендуется.
- 4) Используйте автоматизированные системы учёта результатов.

ВНИМАНИЕ: Наличие роста в контрольной лунке (К) является необходимым условием для интерпретации результатов определения чувствительности! Если рост в контрольной лунке отсутствует, то результаты теста не могут быть интерпретированы!

МПК считается та наименьшая концентрация антибиотика, при которой в лунке отсутствует видимый рост бактериальной культуры. Исключением является тестирование триметоприма/сульфаметоксазола. МПК в этом случае определяется по той концентрации в лунке планшета, при которой на ≥ 80% подавляется рост бактериальной культуры с сравнении с лункой контроля (К).

Будьте внимательны при оценке результатов: различайте зернистый рост бактериальной культуры и пузырьки суспензионной среды. Запишите результаты.

Таблица 1: Макет планшета: серийные разведения антибиотиков (мг/л)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
A	128/64	128	128/4	16	16	16	32	64	16	8	8	4/76
B	64/32	64	64/4	8	8	8	16	32	8	4	4	2/38
C	32/16	32	32/4	4	4	4	8	16	4	2	2	1/19
D	16/8	16	16/4	2	2	2	4	8	2	1	1	0,5/9,5
E	8/4	8	8/4	1	1	1	2	4	1	0,5	0,5	0,25/4,75
F	4/2	4	4/4	0,5	0,5	0,5	1	2	0,5	0,25	0,25	0,12/2,38
G	2/1	2	2/4	0,25	0,25	0,25	0,5	1	0,25	0,12	0,12	0,06/1,19
H	1/0,5	1	1/4	0,12	0,12	0,12	0,25	0,5	0,12	0,06	0,06	K

Таблица 2: Клинические критерии оценки МПК (мг/л) для неферментирующих грамотрицательных бактерий на критериях EUCAST

Антибиотики	Аббр.	<i>Pseudomonas sp.</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Чувствительный S	Умеренно		Чувствительный S	Умеренно		Чувствительный S	Умеренно	
Ampicillin / sulbactam	AMS	-	-	-				IE		IE
Piperacillin	PIP	≤16		≥32				IE		IE
Piperacillin / tazobactam	PIT	≤16/4		≥32/4				IE		IE
Ceftazidime	CAZ	≤8		≥16				-	-	-
Aztreonam	AZT	≤1	2-16	≥32				-	-	-
Meropenem	MER	≤2	4-8	≥16				≤2	4-8	≥16
Gentamicin	GEN	≤4		≥8				≤4		≥8
Amikacin	AMK	≤8	16	≥32				≤8	16	≥32
Colistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloxacin	CIP	≤0.5		≥1				≤1		≥2
Tigecycline	TGC	-	-	-				IE		IE
Trimethoprim/sulfamethoxazole	T/S	-	-	-	≤4/76		≥8/152	≤2/38	4/76	≥8/152

Таблица 3: Клинические критерии оценки МПК (мг/л) для неферментирующих грамотрицательных бактерий на критериях CLSI (2)

Антибиотики	Аббр.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Burkholderia cepacia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Чувствительный S	Умеренно		Чувствительный S	Умеренно		Чувствительный S	Умеренно	
Ampicillin / sulbactam	AMS							≤8/4	16/8	≥32/16
Piperacillin	PIP	≤16	32-64	≥128				≤16	32-64	≥128
Piperacillin / tazobactam	PIT	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4				≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Ceftazidime	CAZ	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32
Aztreonam	AZT	≤8	16	≥32						
Meropenem	MER	≤2	4	≥8	≤4 Только B. cepacia	8 Только B. cepacia	≥16 Только B. cepacia	≤2	4	≥8
Gentamicin	GEN	≤4	8	16				≤4	8	≥16
Amikacin	AMK	≤16	32	≥64				≤16	32	≥64
Colistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloxacin	CIP	≤1	2	≥4				≤1	2	≥4
Tigecycline	TGC									
Trimethoprim/sulfamethoxazole	T/S				≤2/38		≥4/76	≤2/38		≥4/76

Интерпретация результатов:

Все изучаемые бактериальные культуры по отношению к тестируемым антибиотикам разделяют на категории Чувствительный (S), Умеренно-резистентный (I), Резистентный (R) на основании данных о МПК. Разделение на категории базируются на критериях EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Европейский комитет по тестированию антимикробной чувствительности): Таблица пограничных значений для интерпретации данных МПК и диаметров зон (1) или CLSI документа M100 (2).

Другие критерии интерпретации должны быть основаны на национальных и лабораторных стандартах, например: EUCAST Expert rules (3); CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing CLSI M100 (2) и M07 (4). При необходимости следует принять во внимание при интерпретации результатов следующие параметры: вид бактерий, тип биоматериала, особенности анамнеза пациента, а также результаты дополнительных исследований.

Контроль качества:

Для внутреннего лабораторного контроля качества рекомендуются следующие штаммы (см. табл.). При оценке результатов используйте стандарты EUCAST или CLSI.

CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) MIC (mg/l)												
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S	
-	1-8	1/4-8/4	1-4	2-8	0,25-1	0,5-2	1-4	0,5-4	0,25-1	-	-	
CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) MIC (mg/l)												
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S	
2/1-8/4	1-4	1/4-4/4	0,06-0,5	0,06-0,25	0,008-0,06	0,25-1	0,5-4	0,25-2	0,004-0,015	0,03-0,25	≤0,5/9,5	
CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) MIC (mg/l)												
AMS	PIP	PIT										
8/4-32/16	>64	0,5/4-2/4										
NCTC 13846 <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 положительный) MIC (mg/l)												
-	-	-	-	-	-	-	COL 4* (необычайно 2-8)	-	-	-	-	-

*Значение относится к ≥ 90% изолятов, в редких случаях может наблюдаться MIC 2 или 8 мг/л (источник: EUCAST)

ATCC – American Type Culture Collection / Американская Коллекция Типовых Культур

CCM – Czech Collection of Microorganisms / Чешская Коллекция Микробов

ГИСК, Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, г. Москва, телефон 8 (499) 241-31-19

Утилизация использованного материала: Использованный планшет поместите в емкость для сбора инфицированных отходов и дезинфицируйте автоклавированием или путем сжигания. Бумажную упаковку сдайте в макулатуру.

Литература:

- (1) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI документ M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI документ M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Дата проведения контроля: 9.4. 2018

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СИМВОЛЫ



Номер каталога



Ин vitro диагностика



Производитель



Перед использованием
Внимательно изучайте инструкцию



Номер партии



Температура хранения



Срок годности



Национальный знак
соответствия для Украины

10020297



Kat. č.: MLT00046

Pre mikrobiológiu

Súprava je určená na stanovenie citlivosti Gram-negatívnych nefermentujúcich baktérií k antibiotikám na základe determinácie MIC (minimálna inhibičná koncentrácia), tzn. najnižšej koncentrácie, ktorá zabráni viditeľnému rastu baktérií. Obsahuje 10 stanovení. Princípom testu je rehydratácia antibiotík v jamkách pomocou Mueller Hinton II bujonu a prídania bakteriálnej suspenzie. Po 16 – 20 hodinovej inkubácii sú výsledky odčítané vizuálne alebo readrom.

Súprava obsahuje:

- 10 vyšetrovacích doštičiek
- 1 viečko
- 10 ks PE sáčkov

Skladovanie a expirácia súpravy:

Skladovanie sa doporučuje pri (+2 až +25) °C, expirácia je vyznačená na obale. Po vybratí z chladničky nechajte doštičky temperovať pri izbovej teplote minimálne po dobu 30 minút, aby sa zamedzilo kondenzácii vody. Po otvorení hliníkového obalu a odstránení fólie nenechávajte už otvorené doštičky bez ochrany. Vzdušná vlhkosť ohrozuje funkčnosť antibiotík !!!

Potreby pre prácu so súpravou, ktoré nie sú súčasťou súpravy:

- Sterilný nepufrovaný fyziologický roztok
- Mueller Hinton bujon II adjustovaný na kationy (napr. suspenzné médium MIC kat. č. MLT00070)
- Etanol
- Sterilné skúmavky
- Inokulátor ErbaDip kat. č. 50004456
- Sterilné Petriho misky
- Sterilné vaničky 60 ml kat. č. 50004457
- Krokovacia pipeta na 100 µl alebo multikanálová pipeta 100 µl
- Pipeta na 60-100 µl
- Densitometer (napr. DENSILAMETER II kat. č. INS00062)
- Inkubátor 35±2 °C
- Bežné laboratórne vybavenie (kľučky, popisovače, kahan, atd.)

Upozornenie: Súprava je určená iba na profesionálne použitie. Dodržujte zásady pre prácu s infekčným materiálom!

Pracovný postup

Príprava bakteriálnej suspenzie a inokulácia:

A) Inokulácia inokulátorom

- 1) Vyberte doštičku z alumíniového sáčku a odstráňte fóliu. Označte doštičku typom súpravy (NEFERM). Zaznamenajte číslo vyšetrovanej kultúry na príslušnú doštičku. Rozpipetujte do všetkých jamiek doštičky po 100 µl suspenzného média MIC.
- 2) Pripravte skúmavku s 12 ml fyziologického roztoku. Pridajte 100 µl suspenzného média MIC aby sa znížilo povrchové napätie inokula.
- 3) Z 18 – 24 hodinovej kultúry na krvnom agare zoberte niekoľko kolónií a pripravte vo fyziologickom roztoku bakteriálnu suspenziu s hustotou 0,5 McFarland. Je dôležité venovať špeciálnu pozornosť príprave homogénnej suspenzie predovšetkým u pseudomonad. Alternatívne môže byť použitá rastová metóda: 3-5 kolónií je prenesených do skúmavky s vhodným bujónom a inkubovaných až do rozmnoženia na denzitu 0,5 McFarland. Ak je táto denzita prekročená, je hustota suspenzie upravená sterilným fyziologickým roztokom alebo bujónom na požadovaný zákal o hodnote 0,5 McFarland .
- 4) Túto suspenziu vlejte do sterilnej Petriho misky.
- 5) Inokulujte rozplnenú doštičku pomocou sterilného inokulátora: inokulátor namočte v Petriho miske s etanolom a opäťte nad plameňom. Vychladnutý inokulátor namočte v Petriho miske s bakteriálnou suspenziou. Preneste inokulum do 1. polovičky doštičky jemným krúžením v jamkách. Znova namočte inokulátor v Petriho miske s bakteriálnou suspenziou a opakujte inokuláciu 2. polovičky doštičky.

B) Inokulácia pipetou

- 1) Pripravte skúmavku s 2 ml fyziologického roztoku.
- 2) Z 18 – 24 hodinovej kultúry na krvnom agare zoberte niekoľko kolónií a pripravte vo fyziologickom roztoku bakteriálnu suspenziu s hustotou 0,5 McFarland. Je dôležité venovať špeciálnu pozornosť príprave homogénnej suspenzie predovšetkým u pseudomonad. Alternatívne môže byť použitá rastová metóda: 3-5 kolónií je prenesených do skúmavky s vhodným bujónom a inkubovaných až do rozmnoženia na denzitu 0,5 McFarland. Ak je táto denzita prekročená, je hustota suspenzie upravená sterilným fyziologickým roztokom alebo bujónom na požadovaný zákal o hodnote 0,5 McFarland .
- 3) Z bakteriálnej suspenzie vo fyziologickom roztoku preneste 60 µl do skúmavky s 13 ml suspenzného média MIC a dobre homogenizujte.
- 4) Vyberte doštičku z alumíniového sáčku a odstráňte fóliu. Označte doštičku typom súpravy (NEFERM). Zaznamenajte číslo vyšetrovanej kultúry na príslušnú doštičku. Rozplňte suspenzné médium MIC s inokulom po 100 µl do každej jamky doštičky.

Poznámka: Doštičku spracujte do 60 minút po vybratí z alumíniového sáčku.

Inkubácia:

Nainokulovanú doštičku vložte do PE sáčku, ktorého okraje zahnete pod doštičku tak, aby nedochádzalo k vysychaniu inokula. Doštičku vložte do termostatu 35±2°C na 16-20 hod. U pomaly rastúcich gramnegatívnych nefermentujúcich baktérií sa inkubácia predlži až na 48 hodín.

Vyhodnotenie:

Doštičku vyberte z PE sáčku. Na odčítanie nárastu v jamkách zvolte spôsob, ktorý je pre Vás najoptimálnejší:

- 1) Odčítajte oproti šedému pozadiu alebo oproti tabuľke doštičky v návode.
- 2) Odčítajte oproti prirodzenému alebo umelému rozptýlenému svetelnému zdroju.
- 3) Použitie lupy sa nedoporučuje.
- 4) Odčítajte pomocou readeru a identifikačného softwaru.

Prosím venujte pozornosť:

V jamke s kontrolou rastu musíte vidieť nárast! Ak nárast nie je, test NEMOŽNO HODNOTIŤ! Ako MIC je hodnotená jamka s najnižšou koncentráciou antibiotika, ktorá zamedzí okom viditeľnému rastu baktérií. Iba u Trimetoprimu/sulfamethoxazolu musí byť MIC odčítaná pri najnižšej koncentrácii, ktorá inhibuje rast približne o ≥ 80% v porovnaní s jamkou pre kontrolu rastu. Odlíšte zrníčko od prípadných bublín! Výsledky zaznamenajte.

Tab. 1: Rozloženie antibiotík a ich koncentračných radov v mg/l na doštičke

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
A	128/64	128	128/4	16	16	16	32	64	16	8	8	4/76
B	64/32	64	64/4	8	8	8	16	32	8	4	4	2/38
C	32/16	32	32/4	4	4	4	8	16	4	2	2	1/19
D	16/8	16	16/4	2	2	2	4	8	2	1	1	0,5/9,5
E	8/4	8	8/4	1	1	1	2	4	1	0,5	0,5	0,25/4,75
F	4/2	4	4/4	0,5	0,5	0,5	1	2	0,5	0,25	0,25	0,12/2,38
G	2/1	2	2/4	0,25	0,25	0,25	0,5	1	0,25	0,12	0,12	0,06/1,19
H	1/0,5	1	1/4	0,12	0,12	0,12	0,25	0,5	0,12	0,06	0,06	K

Tab 2: Číselné vyjadrenie MIC (mg/l) pre nefermentujúce baktérie podľa EUCAST (1)

Antibiotikum	Skratka	<i>Pseudomonas sp.</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Čitlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R	Čitlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R	Čitlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R
Ampicilin / sulbaktam	AMS	-	-	-				IE		IE
Piperacilin	PIP	≤16		≥32				IE		IE
Piperacilin / tazobaktam	PIT	≤16/4		≥32/4				IE		IE
Ceftazidim	CAZ	≤8		≥16				-	-	-
Aztreonam	AZT	≤1	2-16	≥32				-	-	-
Meropenem	MER	≤2	4-8	≥16				≤2	4-8	≥16
Gentamicin	GEN	≤4		≥8				≤4		≥8
Amikacin	AMK	≤8	16	≥32				≤8	16	≥32
Kolistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloxacín	CIP	≤0.5		≥1				≤1		≥2
Tigecyklin	TGC	-	-	-				IE		IE
Trimetoprim/sulfametoxazol	T/S	-	-	-	≤4/76			≥8/152	≤2/38	4/76

Tab 3: Číselné vyjadrenie MIC (mg/l) pre nefermentujúce baktérie podľa CLSI (2)

Antibiotikum	Skratka	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Burkholderia cepacia</i>			<i>Acinetobacter spp.</i>		
		Čitlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R	Čitlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R	Čitlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R
Ampicilin / sulbaktam	AMS							≤8/4	16/8	≥32/16
Piperacilin	PIP	≤16	32-64	≥128				≤16	32-64	≥128
Piperacilin / tazobaktam	PIT	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4				≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Ceftazidim	CAZ	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32
Aztreonam	AZT	≤8	16	≥32						
Meropenem	MER	≤2	4	≥8	≤4 len B. cepacia	8 len B. cepacia	≥16 len B. cepacia	≤2	4	≥8
Gentamicin	GEN	≤4	8	16				≤4	8	≥16
Amikacin	AMK	≤16	32	≥64				≤16	32	≥64
Kolistin	COL	≤2		≥4				≤2		≥4
Ciprofloxacín	CIP	≤1	2	≥4				≤1	2	≥4
Tigecyklin	TGC									
Trimetoprim/sulfametoxazol	T/S				≤2/38			≥4/76	≤2/38	≥4/76

Poznámky k interpretácii:

Podľa stanovenej MIC sa testovaný kmeň radi do kategórie citlivý - intermediárny - rezistentný k danému antibiotiku na základe aktuálnych interpretačných tabuliek EUCAST (1) alebo CLSI dokumentu M100 (2). IE podľa EUCAST (1) indikuje, že není dostatek dokazov o tom, že *Acinetobacter spp.* je dobrým cieľom pre liečbu daným antibiotikom. Výsledok môže obsahovať MIC s komentárom, avšak bez kategorizácie S, I alebo R.

V závislosti od národných alebo laboratorných štandard je možné použiť ďalšie interpretačné kritériá, napr. EUCAST Expert rules (3), alebo CLSI dokumenty M100 (2) a M07 (4). Pri interpretácii výsledkov je potrebné zohľadniť druhovú identifikáciu kmeňa, pôvod vzorky, anamnézu pacienta, prípadne výsledky doplnujúcich testov. U druhov *S. maltophilia* a *B. cepacia* doporučujeme hodnotiť MIC len u antibiotík odporúčaných podľa EUCAST alebo CLSI.

Kontrola kvality:

Na kontrolu kvality súpravy doporučujeme nižšie uvedené kontrolné kmene. Pri vyhodnotení výsledkov testovania kontrolnými kmeňmi sa riadte štandardom EUCAST alebo CLSI.

CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
-	1-8	1/4-8/4	1-4	2-8	0,25-1	0,5-2	1-4	0,5-4	0,25-1	-	-

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT	CAZ	AZT	MER	GEN	AMK	COL	CIP	TGC	T/S
2/1-8/4	1-4	1/4-4/4	0,06-0,5	0,06-0,25	0,008-0,06	0,25-1	0,5-4	0,25-2	0,004-0,015	0,03-0,25	≤0,5/9,5

CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) MIC (mg/l)											
AMS	PIP	PIT									
8/4-32/16	>64	0,5/4-2/4									

NCTC 13846 <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 pozitívne) MIC (mg/l)											
-	-	-	-	-	-	-	COL 4*	-	-	-	-
							(výnimočne 2 alebo 8)				

*Hodnota platí pre ≥ 90 % izolátov, v ojedinelých prípadoch môže byť pozorovaná MIC 2 alebo 8 mg/L (zdroj: EUCAST)

ATCC – American Type Culture Collection

CCM – Česká sbírka mikroorganizmů, Masarykova univerzita, přírodovědecká fakulta, Kamenice 5, budova A25, 625 00 Brno, Tel: 549 491 430, Fax: 549 498 289, <http://www.sci.muni.cz/ccm>, e-mail: ccm@sci.muni.cz

Ochrana zdravia: Komponenty súpravy nie sú klasifikované ako nebezpečné.

Likvidácia použitého materiálu: Po použití vložte doštičku do nádoby pre infekčný materiál a likvidujte podľa vlastných interných predpisov, autoklávujte alebo zničte spálením.

Prázdne papierové obaly sa odovzdávajú do zberu na recykláciu..

Literatúra:

- (1) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI dokument M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI dokument M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Dátum revízie: 9.4. 2018

POUŽITÉ SYMBOLY



Katalógové číslo



In vitro diagnostikum



Výrobca



Čítajte návod k použitiu



Číslo šarže



Teplota skladovania



Dátum expirácie