BIOANALYSE®

Реагенты in vitro на дисках для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Инструкция по применению (Руководство по эксплуатации изделия)

В клинической бактериологии чувствительность бактерий к сульфаниламидам и антибиотикам обычно определяется методом диффузии в геле.

Реагенты диагностические для дифференциации микроорганизмов Bioanalyse® изготовлены из бумаги с высокой впитывающей способностью. Реагенты изготовлены с соблюдением точной стандартизации и прошли микробиологический контроль и контроль стерильности.

Стандартный тест на чувствительность

- 1. *Среда:* Наиболее пригодной средой для диагностики антибиотикочувствительности обычно считается среда Мюллера Хинтона, которая и использовалась при исследовании и контроле качества продукции. В чашки Петри разливается среда, остывшая после стерилизации до 45 50 С.
- 2. *Глубина агарового слоя* должна составлять 4 мм. Для одной чашки Петри диаметром 90 мм достаточно 25 мл среды.
- 3. *рН:* рН среды должен составлять 7,2–7,4.
- 4. Хранение: Чашки Петри со средой хранить при +4 С. Во избежание высыхания среды хранить чашки Петри в полиэтиленовых удалить пакетах. Чтобы избыточное увлажнение и капельки воды на поверхности среды, необходимо перед использованием выдержать чашки Петри 30 минут термостате или 1 час при комнатной температуре. Для большинства аэробных микроорганизмов добавления крови в среду не требуется, однако для требовательных к среде бактерий, таких как стрептококки и гонококки, после охлаждения среды до 45 -50 C следует добавить К ней дефибринированной овечьей, кроличьей или лошадиной крови. Среда в чашках Петри может храниться, пока её поверхность остаётся влажной, а получаемые на ней результаты – достоверными.
- 5. Подготовка материала: Взять с помощью стерилизованной на огне петли 4-5 колоний с похожей морфологией использованной для первичного выделения. Суспендировать в 4 –5 мл бульона (Мюллера-Хинтона, триптиказеиново-соевого или с сердечно-мозговой вытяжкой), и инкубировать 2 – 5 часов при 37 С. Если по истечении этого времени бульон помутнел, его мутность сравнивается со стандартом Макфарленда (0,5 мл 1,75 % раствора ВаСІ₂·2Н₂0 + 99,5 мл серной 1% (0,36N)кислоты)

- физиологическим раствором или бульоном, после чего выполняется инокуляция. При малой концентрации бактерий инкубация продлевается на 2–8 часов.
- 6. Инокуляция чашек Петри: Выполняется по методике, описанной Bauer & Kirby [1]. Подготовленную бактериальную суспензию следует перемешать стерильным аппликатором и удалить с него избыток жидкости, отжимая (с вращением) об стенку пробирки. Затем провести аппликатором три диаметральные полосы по агару в чашке Петри, поворачивая чашку Петри на 60° после каждой полосы, и распределить инокулят аппликатором по всей поверхности агара.
- 7. **Альтернативный (наливной) метод:** Налить бактериальную суспензию на поверхность агара (от 2 до 5 мл в зависимости от площади поверхности) и затем удалить, насколько возможно, избыток жидкости путём аспирации.
- 8. *После инокуляции* дать чашкам Петри подсохнуть 15–20 минут при комнатной температуре.
- 9. Аппликация реагентов: Открыть картридж над пламенем и вытолкнуть реагент на поверхность агара с помощью подавателя. Затем слегка вдавить реагенты в агар с помощью пинцета, стерилизованного в пламени и затем охлаждённого. Для чёткого разграничения зон ингибирования расстояние между реагентами должно составлять не менее 24 мм, а расстояние между реагентом и краем чашки Петри не менее 1 см.
- 10. *Инкубация:* Перевернуть чашки Петри вверх дном и поместить их на ночь в термостат на 37 С. Сравнить диаметры образовавшихся зон ингибирования с данными, приведёнными в таблице.
 - При изготовлении реагентов Bioanalyse® для их проверки использовались стандартные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC25923.
- 11. Определение зон ингибирования: После ночной инкубации в чашках Петри для определения антибиотикочувствительности образуются чётко различимые зоны ингибирования. Эти зоны могут быть видны уже после первичной инкубации в течение 6—8 часов, однако должны быть подтверждены ночной инкубацией. Диаметры зон ингибирования измеряются со стороны дна

чашки Петри (для сред, содержащих кровь, диаметры измеряются со стороны поверхности агара). Результаты измерения сравниваются с приведённой ниже таблицей и в соответствии с ней интерпретируются как «чувствительность», «пограничный результат» или «устойчивость».

Возможные причины ошибок

- 1. Плохая стандартизация: При недостаточно тщательной стандартизации бактериальной суспензии по стандарту Макфарленда концентрация бактерий может быть слишком высокой, что приводит к сужению зон ингибирования.
- 2. Использование смешанной культуры: Одним из основных принципов метода стандартизованных культур является использование чистой культуры. Смешанная культура может дать неверные результаты.
- 3. Избыточная влага на поверхности среды может вызвать интенсивный рост, приводящий к сужению зон ингибирования. Слишком сухая поверхность агара, напротив, может привести к слабому росту и расширению зон ингибирования.

ЛИТЕРАТУРА:

- 1. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck, 1966. Am. J. Clin. Pathol., 45: 493 496.
- 2. Çetin, E.T., 1973. Genel ve Pratik Mikrobiyoloji, 3. Baskı, Sermet Matbaası, 444 447.
- 3. Ericsson, H.M., and J.C. Sherris, 1971. Antibiotic Sensitivity Testing: Report Study. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Section B, Suppl. 217, 1 90.
- 4. World Health Organization Technical Report Service, 1977. Rep. No. 610, W.H.O., Geneva.

Таблица оценки зон ингибирования роста, в мм смотри в приложении

Escherichia coli ATCC 25922

(NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434)

Antimicrobial agent	(n	MIC ng/L)	Disk content	Inhibition zone diameter (mm)		
	Target ¹	Range ²	(µg)	Target ¹	Range ³	
Amikacin	1-2	0.5-4	30	22-23	19-26	
Amoxicillin	4	2-8	1-	-	-	
Amoxicillin-clavulanic acid ^{4,5}	4	2-8	20-10	21	18-24 ⁶	
Ampicillin	4	2-8	10	18-19	15-22 ⁶	
Ampicillin-sulbactam ^{5,7}	2	1-4	10-10	21-22	19-24 ⁶	
Aztreonam	0.125	0.06-0.25	30	32	28-36	
Cefadroxil	-	-	30	17	14-20	
Cefalexin	8	4-16	30	18	15-21	
Cefepime	0.03-0.06	0.016-0.125	30	34	31-37	
Cefixime	0.5	0.25-1	5	23	20-26	
Cefotaxime	0.06	0.03-0.125	5	28	25-31	
Cefoxitin	4	2-8	30	26	23-29	
Cefpodoxime	0.5	0.25-1	10	25-26	23-28	
Ceftaroline	0.06	0.03-0.125	5	27	24-30	
Ceftazidime	0.125-0.25	0.06-0.5	10	26	23-29	
Ceftazidime-avibactam ^{8,9}	0.125-0.25	0.06-0.5	10-4	27	24-30	
Ceftibuten	0.25	0.125-0.5	30	31	27-35	
Ceftobiprole	0.06	0.03-0.125	5	28	25-31	
Ceftolozane-tazobactam ^{10,11}	0.25	0.125-0.5	30-10	28	24-32	
Eftriaxone	0.06	0.03-0.125	30	32	29-35	
Cefuroxime	4	2-8	30	23	20-26	
chloramphenicol	4	2-8	30	24	21-27	
iprofloxacin	0.008	0.004-0.016	5	33	29-37	
Colistin ¹²	0.5-1	0.25-2	-	-	-	
Ooripenem	0.03	0.016-0.06	10	31	27-35	
rtapenem	0.008	0.004-0.016	10	32-33	29-36	
osfomycin ¹³	1	0.5-2	200 ¹⁴	30	26-34 15	
Sentamicin	0.5	0.25-1	10	22-23	19-26	
nipenem	0.125	0.06-0.25	10	29	26-32	
evofloxacin	0.016-0.03	0.008-0.06	5	33	29-37	
lecillinam ¹⁶	0.06-0.125	0.03-0.25	10	27	24-30	
leropenem	0.016-0.03	0.008-0.06	10	31-32	28-35	
loxifloxacin	0.016-0.03	0.008-0.06	5	31-32	28-35	
alidixic acid	2	1-4	30	25	22-28	
etilmicin	-	≤0.5-1	10	21	18-24	
itrofurantoin	8	4-16	100	20	17-23	
itroxoline	Note ¹⁷	Note ¹⁷	30	21	18-24	
orfloxacin	0.06	0.03-0.125	10	31-32	28-35	
floxacin	0.03-0.06	0.016-0.125	5	31	29-33	
efloxacin	-	-	5	29	26-32	
iperacillin	2	1-4	30	24	21-27	
peracillin-tazobactam ^{10,11}	2	1-4	30-6	24	21-27	
icarcillin	8	4-16	75	27	24-30	
carcillin-clavulanic acid ^{4,5}	8	4-16	75-10	27	24-30	
gecycline ¹⁸	0.06-0.125	0.03-0.25	15	23-24	20-27	
obramycin	0.5	0.25-1	10	22	18-26	
rimethoprim	1	0.5-2	5	24-25	21-28	
rimethoprim-sulfamethoxazole ¹⁹	≤0.5 ²	-	1.25-23.75	26	23-29	

Staphylococcus aureus ATCC 29213

(NCTC 12973, CIP 103429, DSM 2569, CCUG 15915, CECT 794)

β-lactamase-producing strain (weak)

Antimiavabial arout	1	MIC	Disk content (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	
Antimicrobial agent		ng/L)			
A	Target ¹	Range ²	,	Target ¹	Range ³
Amikacin	2	1-4	30	21	18-24
Ampicillin	-	-	2	18	15-21
Azithromycin	1	0.5-2	-	-	-
Benzylpenicillin	0.5-1	0.25-2	1 unit	15	12-18
Cefoxitin	2	1-4	30	27	24-30
Ceftaroline	0.25	0.125-0.5	5	27	24-30
Ceftobiprole	0.25-0.5	0.125-1	5	25	22-28
Chloramphenicol	4-8	2-16	30	24	20-28
Ciprofloxacin	0.25	0.125-0.5	5	24	21-27
Clarithromycin	0.25	0.125-0.5	-	-	-
Clindamycin	0.125	0.06-0.25	2	26	23-29
Dalbavancin⁴	0.06	0.03-0.125	-	-	-
Daptomycin ⁵	0.25-0.5	0.125-1	-	-	-
Doxycycline	0.25	0.125-0.5	-	-	-
Erythromycin	0.5	0.25-1	15	26	23-29
osfomycin ⁶	1-2	0.5-4	-	-	
usidic acid	0.125	0.06-0.25	10	29	26-32
Gentamicin	0.25-0.5	0.125-1	10	22	19-25
evofloxacin	0.125-0.25	0.06-0.5	5	26	23-29
inezolid	2	1-4	10	24	21-27
Minocycline	0.125-0.25	0.06-0.5	30	26	23-29
Moxifloxacin	0.03-0.06	0.016-0.125	5	28	25-23
Mupirocin	0.125	0.06-0.25	200	34	31-37
Netilmicin	≤0.25 ²	-	10	23	20-26
Vitrofurantoin	16	8-32	100	20	17-23
Vorfloxacin	1	0.5-2	100	21	18-24
Ofloxacin	0.25-0.5	0.125-1	5	24	21-27
Oritavancin ⁴	0.03-0.06	0.016-0.125	-	-	21-21
Quinupristin-dalfopristin	0.5	0.25-1	15	24	21-27
Rifampicin	0.008	0.004-0.016	5	33	30-36
edizolid	0.5	0.25-1	-	-	-
eicoplanin	0.5	0.25-1	-		
elavancin ⁴	0.06	0.03-0.125	-		
elavaricin	0.125	0.06-0.25	15	IP	IP
etracycline	0.25-0.5	0.125-1	30	27	
igecycline ⁷	0.06-0.125	0.03-0.25	15		23-31
obramycin	0.25-0.5			22	19-25
rimethoprim	2	0.125-1	10	23	20-26
		1-4	5	25	22-28
rimethoprim-sulfamethoxazole8	≤0.5 ²	-	1.25-23.75	29	26-32
/ancomycin	1	0.5-2	-	-	-

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

(NCTC 12903, CIP 76.110, DSM 1117, CCUG 17619, CECT 108)

Antimicrobial agent	(m	/IIC ig/L)	Disk content	Inhibition zone diameter (mm)	
	Target ¹	Range ²	(µg)	Target ¹	Range ³
Amikacin	2	1-4	30	22	18-26
Aztreonam	4	2-8	30	26	23-29
Cefepime	1-2	0.5-4	30	28	25-31
Ceftazidime	2	1-4	10	24	21-27
Ceftazidime-avibactam ^{4,5}	1-2	0.5-4	10-4	24	21-27
Ceftolozane-tazobactam ^{6,7}	0.5	0.25-1	30-10	28	25-31
Ciprofloxacin	0.5	0.25-1	5	29	25-33
Colistin ⁸	1-2	0.5-4	-	-	-
Doripenem	0.25	0.125-0.5	10	31-32	28-35
Fosfomycin ⁹	4	2-8	-	-	-
Gentamicin	1	0.5-2	10	20	17-23
Imipenem	2	1-4	10	24	20-28
Levofloxacin	1-2	0.5-4	5	22-23	19-26
Meropenem	0.5	0.25-1	10	30	27-33
Netilmicin	2	0.5-8	10	18	15-21
Piperacillin	2-4	1-8	-	-	-
Piperacillin-tazobactam ^{6,7}	2-4	1-8	30-6	26	23-29
Ticarcillin	16	8-32	-	-	-
Ticarcillin-clavulanic acid 10,11	16	8-32	75-10	24	20-28
Tobramycin	0.5	0.25-1	10	23	20-26

¹ Calculated by EUCAST.

² From International Standards Organisation, ISO 20776-1: 2006 (with updates as in the latest CLSI M100 document). All ranges have been validated by EUCAST.

³ From Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S27, 2017, except ranges in bold/italics established by EUCAST. All ranges have been validated by EUCAST.

⁴ For MIC testing, the concentration of avibactam is fixed at 4 mg/L.

⁵ *K. pneumoniae* ATCC 700603 is used to check the inhibitor component (see Routine quality control for β-lactam-β-lactamase inhibitor combinations).

⁶ For MIC testing, the concentration of tazobactam is fixed at 4 mg/L.

⁷ Either *E. coli* ATCC 35218 or *K. pneumoniae* ATCC 700603 can be used to check the inhibitor component (see Routine quality control for β-lactamase inhibitor combinations).

⁸ Quality control of colistin must be performed with both a susceptible QC strain (*E. coli* ATCC 25922 or *P. aeruginosa* ATCC 27853) and the colistin resistant *E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1* positive). For *E. coli* NCTC 13846 (CCUG 70662, DSM 105182), the colistin MIC target value is 4 mg/L and should only on occasion be 2 or 8 mg/L.

⁹ Agar dilution is the reference method for fosfomycin. Fosfomycin MICs must be determined in the presence of glucose-6-phosphate (25 mg/L in the medium). Follow the manufacturer's instructions for commercial systems.

 $^{^{10}}$ E. coli ATCC 35218 is used to check the inhibitor component (see Routine quality control for β-lactam-β-lactamase inhibitor combinations).

¹¹ For MIC testing, the concentration of clavulanic acid is fixed at 2 mg/L.

Enterococcus faecalis ATCC 29212

(NCTC 12697, CIP 103214, DSM 2570, CCUG 9997, CECT 795)

Antimicrobial agent	-	IIC g/L)	Disk content	Inhibition zone diameter (mm)	
	Target ¹	Range ²	(µg)	Target ¹	Range ³
Ampicillin	1	0.5-2	2	18	15-21
Ciprofloxacin	0.5-1	0.25-2	5	22	19-25
Gentamicin	8	4-16	30 ⁴	15	12-18
Imipenem	1	0.5-2	10	27	24-30
Levofloxacin	0.5-1	0.25-2	5	22	19-25
Linezolid	2	1-4	10	22	19-25
Nitrofurantoin	8	4-16	100	21	18-24
Norfloxacin	4	2-8	10	19	16-22
Quinupristin-dalfopristin	4	2-8	15	14	11-17
Streptomycin	Note ⁵	Note ⁵	300 ⁶	17	14-20 ⁷
Teicoplanin	0.5	0.25-1	30	18	15-21
Tigecycline ⁸	0.06	0.03-0.125	15	23	20-26
Trimethoprim	0.25	0.125-0.5	5	28	24-32
Trimethoprim-sulfamethoxazole9	≤0.5 ²	-	1.25-23.75	30	26-34
Vancomycin	2	1-4	5	13	10-16

¹ Calculated by EUCAST.

² From International Standards Organisation, ISO 20776-1: 2006 (with updates as in the latest CLSI M100 document). All ranges have been validated by EUCAST.

³ Established and validated by EUCAST.

⁴ Screening disk for high-level aminoglycoside-resistance in enterococci.

⁵ There is currently no MIC range for *E. faecalis* ATCC 29212 and streptomycin.

 $^{^{\}rm 6}\,\rm Screening$ disk for high-level streptomycin-resistance in enterococci.

⁷ From Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S27, 2017.

⁸ For tigecycline broth microdilution MIC determination, the medium must be prepared fresh on the day of use.

⁹ Trimethoprim:sulfamethoxazole in the ratio 1:19. MIC values are expressed as the trimethoprim concentration.

Quality control strains for detection of resistance mechanisms with disk diffusion on Mueller-Hinton agar

See EUCAST Breakpoint Tables for short descriptions of MIC and disk diffusion methodology.

ESBL production in Enterobacteriaceae

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

(NCTC 13368, CCUG 45421, CECT 7787)

SHV-18 ESBL-producer

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	Target susceptibility ¹	Range ² (mm)	Comments
Aztreonam	30	R	9-17	
Cefotaxime	5	I or R	12-18	
Cefpodoxime	10	R	9-16	
Ceftazidime	10	I or R	6-12	
Ceftriaxone	30	I or R	16-22	

Methicillin resistance in Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus NCTC 12493

(CCUG 67181)

Methicillin resistant (MRSA), mecA positive

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	Target susceptibility ¹	Range ² (mm)	Comments
Cefoxitin	30	R	14-20	

vanB -mediated glycopeptide resistance in enterococci

Enterococcus faecalis ATCC 51299

(NCTC 13379 ,CIP 104676, DSM 12956, CCUG 34289)

vanB-positive strain

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	Target susceptibility ¹	Range ² (mm)	Comments
Teicoplanin	30	S	16-20	
Vancomycin	5	R		Examine zone edge with transmitted light (plate held up to light). Inhibition zones with fuzzy zone edges are interpreted as resistant, even if the zone diameter is above the susceptible breakpoint (for reading examples see the EUCAST Reading Guide or Breakpoint Tables).

High-level aminoglycoside resistance in enterococci

Enterococcus faecalis ATCC 51299

(NCTC 13379, CIP 104676, DSM 12956, CCUG 34289)

High-level gentamicin and streptomycin resistant

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	Target susceptibility ¹	Range ² (mm)	Comments
Gentamicin	30	R	6	
Streptomycin	300	R	6	

¹ Targets comply with EUCAST clinical breakpoints and are set to ensure that resistance mechanisms are correctly detected. Interpretation according to EUCAST clinical breakpoints: S=Susceptible, I=Intermediate, R=Resistant.

² From Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S27, 2017, except ranges in bold/italics established by EUCAST. All ranges have been validated by EUCAST.

Control of the inhibitor component of β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations

See EUCAST Breakpoint Tables for short descriptions of MIC and disk diffusion methodology.

Escherichia coli ATCC 35218

(NCTC 11954, CIP 102181, DSM 5923, CCUG 30600, CECT 943)

TEM-1 β-lactamase-producing strain (non-ESBL)

Antimicrobial agent	1	IIC g/L)	Disk content (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	
	Target ¹	Range ²		Target ¹	Range ²
Amoxicillin-clavulanic acid ³	8-16	4-32	20-10	19-20	17-22 ⁴
Ampicillin-sulbactam⁵	32-64	16-128	10-10	16	13-19 ⁴
Ceftolozane-tazobactam ^{6,7}	0.125	0.06-0.25	30-10	28	25-31
Piperacillin-tazobactam ^{6,7}	1	0.5-2	30-6	24	21-27
Ticarcillin-clavulanic acid ³	16	8-32	75-10	23	21-25

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

(NCTC 13368, CCUG 45421, CECT 7787)

SHV-18 ESBL producer

Antimicrobial agent		IIC g/L)	Disk content (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	
	Target ¹	Range ²		Target ¹	Range ²
Ceftazidime-avibactam ⁸	0.5-1	0.25-2	10-4	21	18-24
Ceftolozane-tazobactam ^{6,7}	1	0.5-2	30-10	21	17-25
Piperacillin-tazobactam ^{6,7}	16	8-32	30-6	17	14-20

Staphylococcus aureus ATCC 29213

(NCTC 12973, CIP 103429, DSM 2569, CCUG 15915, CECT 794)

β-lactamase-producing strain (weak)

Antimicrobial agent	M (mg		Disk content	Inhibition zone diameter (mm)	
	Target ¹	Range ²	(µg)	Target ¹	Range ²
Amoxicillin-clavulanic acid ³	Note ⁹	Note ⁹	2-1	22	19-25

¹ Calculated by EUCAST.

² From Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S27, 2017, except ranges in bold/italics established by EUCAST. All ranges have been validated by EUCAST.

³ For MIC testing, the concentration of clavulanic acid is fixed at 2 mg/L.

⁴ Ignore growth that may appear as a thin inner zone on some batches of Mueller-Hinton agar.

⁵ For MIC testing, the concentration of sulbactam is fixed at 4 mg/L.

⁶ For MIC testing, the concentration of tazobactam is fixed at 4 mg/L.

⁷ Either E. coli ATCC 35218 or K. pneumoniae ATCC 700603 can be used to check the inhibitor component.

⁸ For MIC testing, the concentration of avibactam is fixed at 4 mg/L.

⁹ For MIC testing, *E. coli* ATCC 35218 is used to check the inhibitor component.