

Cat. N.: MLT00044

For microbiology

The kit is designed to test antimicrobial susceptibility of bacteria from *Enterobacteriaceae* family on the basis of determination MIC (minimal inhibitory concentration), 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 Mueller Hinton II broth and addition of bacterial suspension. The results are read visually or by reader after 16-20 hours of incubation. We recommend to use together with MIC G-I also MIC G-II to test susceptibility to antibiotics used in treatment of serious infections especially in hospitalized patients.

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)
- Mueller 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 (G-I) 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 McFarland scale in physiological solution.
- 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.
- 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 (G-I) 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.

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 MIC 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/sulfamethoxazole, a well with ≥ 80% growth inhibition compared to the growth control is considered as MIC. In Colistin may occur very weak growth, which is also considered a positive result. In case of doubt about the presence of growth in the wells, use ErbaScan for reading. 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
	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
A	128	128/64	16	64	16	32	64	16	4/76	8	32	32
B	64	64/32	8	32	8	16	32	8	2/38	4	16	16
C	32	32/16	4	16	4	8	16	4	1/19	2	8	8
D	16	16/8	2	8	2	4	8	2	0.5/9.5	1	4	4
E	8	8/4	1	4	1	2	4	1	0.25/4.75	0.5	2	2
F	4	4/2	0.5	2	0.5	1	2	0.5	0.12/2.38	0.25	1	1
G	2	2/1	0.25	1	0.25	0.5	1	0.25	0.06/1.19	0.12	0.5	0.5
H	1	1/0.5	0.12	0.5	0.12	0.25	0.5	0.12	0.03/0.6	0.06	0.25	K

Tab 2: Clinical MIC breakpoints (in mg/l) for *Enterobacteriaceae*

Antibiotics	Abbr.	EUCAST			CLSI		
		Sensitive S	Inter-mediate I	Resistant R	Sensitive S	Inter-mediate I	Resistant R
Ampicillin	AMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Ampicillin / sulbactam	AMS	≤8/4		≥16/4	≤8/4	16/8	≥32/16
Cefazolin (infections originating from the urinary tract) <i>E. coli</i> and <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i>)	CFZ	≤0.001	0.002-4	≥8	≤2	4	≥8
Cefuroxime parenteral <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i> Cefuroxime oral (uncomplicated UTI) <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	CXM	≤0.001	0.002-8	≥16	≤8	16	≥32
		≤8		≥16	≤4	8-16	≥32
Aztreonam	AZT	≤1	2-4	≥8	≤4	8	≥16
Gentamicin (systemic infections) Gentamicin (infections originating from the urinary tract)	GEN	(≤2) ≤2		(≥4) ≥4	≤4	8	≥16
Amikacin (systemic infections) Amikacin (infections originating from the urinary tract)	AMK	(≤8) ≤8		(≥16) ≥16	≤16	32	≥64
Colistin	COL	≤2	≤2	≥4			≥4
Trimethoprim / sulfamethoxazole	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Ciprofloxacin Ciprofloxacin, <i>Salmonella</i> spp.	CIP	≤0.25 ≤0.06	0.5*	≤1 ≥0.12	≤0.25 ≤0.06	0.5 0.12-0.5	≥1 ≥1
Chloramphenicol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracycline	TET	-	-	-	≤4	8	≥16

* ATU (Areas of Technical Uncertainty) - before interpretation of results:

- Repeat the test
- Use an alternative test
- Downgrade the susceptibility category
- Include the uncertainty as part of the report

More on www.eucast.org

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 Tables (1) or according to CLSI document M100 (2).

1) Resistance to CXM, CFZ, AZT indicates possibility of ESBL production. Confirmation tests are recommended according to EUCAST guidelines (3) or CLSI document M100 (2).

2) It is necessary to correct susceptibility of some strains to betalactam antibiotics (mainly *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. to resistant according to their intrinsic resistance). In this case betalactamase is not produced in sufficient amount *in vitro*.

3) *Proteus* spp., *Morganella morganii* and *Providentia* spp. strains are intrinsically RESISTANT to COL.

4) Aminoglycosides (EUCAST) – for systemic infections, aminoglycosides must be used in combination with other active therapy. In this circumstance, the breakpoint in brackets can be used to distinguish between organisms with and without acquired resistance mechanisms. For isolates without resistance mechanisms, include a comment in the report: "Aminoglycosides are often given in combination with other agents, either to support the activity of the aminoglycoside or to broaden the spectrum of therapy. In systemic infections, the aminoglycoside must be supported by other active therapy."

Other interpretative criteria have to be used depending on national and laboratory standards, e.g. EUCAST Expert rules (4) or CLSI documents M100 (2) and M07 (5). It is necessary to take into consideration following parameters when interpreting results: species identification, sample origin, patient case history, or results of additional tests.

Quality control:

We recommended all following control strains for internal testing of functionality of the antibiotics in the laboratory. Follow EUCAST or CLSI standards when evaluating results. Fresh strains must be used for quality control.

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)											
MIC (mg/l)											
AMP 2-8	AMS 2/1-8/4	CFZ 1-4	CXM 2-8	AZT 0.06-0.25	GEN 0.25-1	AMK 0.5-4	COL 0.25-2	T/S ≤0.5/9.5	CIP 0.004-0.015	CMP 2-8	TET 0.5-2
CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)											
MIC (mg/l)											
AMP -	AMS -	CFZ -	CXM -	AZT 2-8	GEN 0.5-2	AMK 1-4	COL 0.5-4	T/S 8/152-32/608	CIP 0.125-1	CMP -	TET 8-32
CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)											
MIC (mg/l)											
AMP > 32	AMS 8/4-32/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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

NCTC – National Collection of Type Cultures

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.

Discard paper packaging 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.

(3) EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, <http://www.eucast.org>

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

(5) 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: 5. 3. 2020

USED SYMBOLS



Catalogue number



In vitro diagnostics



Manufacturer



See instruction for use



Lot number



Storage temperature



Expiry date



Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, CZ
e-mail: diagnostics@erbalachema.com, www.erbalachema.com

M-MIC/PI/01/20/N/INT



Номер в каталоге № MLT00044

Для микробиологических исследований

Набор предназначен для определения чувствительности бактерий сем. Enterobacteriaceae 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. Для тестирования чувствительности к антибиотикам у госпитализированных пациентов при лечении тяжелых жизнеугрожающих инфекций вместе с планшетом MIC G-I /МПК Г-І/ рекомендуется использовать планшет MIC G-II /МПК Г-II/.

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 °С. 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)
- Степпер или многоканальная пипетка до 100 мкл
- Пипетка с диапазоном дозирования 60–100 мкл
- Денситометр (напр.: ДЕНСИЛАТЕСТ II, номер в каталоге № INS00062)
- Термостат, 35±2 °С
- 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):

A. Инокуляция планшета с использованием инокулятора:

- 1) Достаньте планшет из индивидуальной алюминиевой упаковки и удалите алюминиевое покрытие с поверхности. Нанесите маркировку о типе планшета (напр.: G-I) 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. Более высокая плотность бактериальной суспензии является меньшей ошибкой, чем недостаточная (менее 0,5 по МакФарланду) плотность.
- 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 племени горелки. Затем охладите инокулятор. Погрузите инокулятор в чашку Петри с бактериальной суспензией. Тонкая плёночка бактериальной суспензии адгезируется на поверхности металлических игл инокулятора. Перенесите инокулом на половину планшета с уже добавленной суспензионной средой, погрузите иглы в лунки и аккуратно смешайте. Выполните такую же процедуру для второй половины планшета.

B. 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.
- 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.: G-I) 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 °С 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). У колистина может возникнуть очень слабый рост, что также считается положительным результатом. В случае сомнений по поводу наличия роста в лунках, используйте ErbaScan для чтения.

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
	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
A	128	128/64	16	64	16	32	64	16	4/76	8	32	32
B	64	64/32	8	32	8	16	32	8	2/38	4	16	16
C	32	32/16	4	16	4	8	16	4	1/19	2	8	8
D	16	16/8	2	8	2	4	8	2	0,5/9,5	1	4	4
E	8	8/4	1	4	1	2	4	1	0,25/4,75	0,5	2	2
F	4	4/2	0,5	2	0,5	1	2	0,5	0,12/2,38	0,25	1	1
G	2	2/1	0,25	1	0,25	0,5	1	0,25	0,06/1,19	0,12	0,5	0,5
H	1	1/0,5	0,12	0,5	0,12	0,25	0,5	0,12	0,03/0,6	0,06	0,25	K

Таблица 2: Клинические критерии оценки МПК (мг/л) для *Enterobacteriaceae*

Антибиотики	Аббр.	EUCAST			CLSI		
		Чувстви- тельный	Умеренно- резистентный I	Резистентный R	Чувстви- тельный	Умеренно- резистентный I	Резистентный R
Ampicilin	AMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Ampicilin / sulbactam	AMS	≤8/4		≥16/4	≤8/4	16/8	≥32/16
Cefazolin (инфекции мочевыводящих путей) <i>E. coli</i> и <i>Klebsiella spp.</i> (за исключением <i>K. aerogenes</i>)	CFZ	≤0.001	0.002-4	≥8	≤2	4	≥8
Cefuroxime parenteral <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> (за исключением <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella spp.</i> и <i>P. mirabilis</i> Cefuroxime oral (Только неосложненные ИМП) <i>E. coli</i> , <i>Kleb- siella spp.</i> (за исключением <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella spp.</i> и <i>P. mirabilis</i>	CXM	≤0.001	0.002-8	≥16	≤8	16	≥32
Aztreonam	AZT	≤1	2-4	≥8	≤4	8	≥16
Gentamicin (системная инфекция)	GEN	(≤2)		(≥4)			
Amikacin (инфекции мочевыводящих путей)		≤2		≥4	≤4	8	≥16
Amikacin (системная инфекция)	AMK	(≤8)		(≥16)			
Amikacin (инфекции мочевыводящих путей)		≤8		≥16	≤16	32	≥64
Colistin	COL	≤2	≤2	≥4			≥4
Trimethoprim / sulfamethoxazole	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Ciprofloxacin	CIP	≤0.25	0.5*	≤1	≤0.25	0.5	≥1
Ciprofloxacin, <i>Salmonella spp.</i>		≤0.06		≥0.12	≤0.06	0.12-0.5	≥1
Chloramphenicol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracycline	TET	-	-	-	≤4	8	≥16

* ATU (Зона технической неопределенности при определении чувствительности к антибиотикам) - до интерпретации результатов:
- повторите тестирование
- используйте альтернативные тесты
- понижайте категорию чувствительности
- включайте неопределенность в отчет

Более подробная информация на сайте [HYPERLINK „http://www.eucast.org“](http://www.eucast.org) www.eucast.org

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).
1) Резистентность к цефуроксиму, цефазолину и азтреонаму указывает на вероятную продукцию бактериальным штаммом бета-лактамаз расширенного спектра (ESBL/БЛРС). Тесты для подтверждения продукции БЛРС рекомендуется выполнять согласно EUCAST-руководству по определению механизмов резистентности, их клинического и эпидемиологического значения (3) или CLSI документ M100 (2).
2) При необходимости исправьте результаты теста к бета-лактамам антибиотикам для некоторых штаммов (главным образом, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*) на резистентный результат согласно данным об их природной резистентности, так как *in vitro* у этих микробов бета-лактамазы не продуцируются в достаточном количестве.
3) Штаммы *Proteus spp.*, *Morganella morganii* и *Providentia spp.* имеют природную резистентность к колистину.
4) Аминогликозиды (EUCAST) - При системных инфекциях аминогликозиды следует использовать в сочетании с другими активными препаратами. При этих обстоятельствах, концентрации, указанные в скобках, могут использоваться для дифференциации микроорганизмов с приобретенными механизмами устойчивости и без них. Для изолятов без механизмов устойчивости комментарий в отчете: „Аминогликозиды применяют в сочетании с другими препаратами для поддержания аминогликозидной активности, либо для расширения спектра лечения. При системных инфекциях аминогликозид должен быть дополнен другой активной терапией.“
Другие критерии интерпретации должны быть основаны на национальных и лабораторных стандартах, например: (4); CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing CLSI M100 (2) и M07 (5). 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. Для контроля использовать свежепересеянные штаммы.

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) МПК (мг/л)											
AMP 2-8	AMS 2/1-8/4	CFZ 1-4	CXM 2-8	AZT 0,06-0,25	GEN 0,25-1	AMK 0,5-4	COL 0,25-2	T/S ≤0,5/9,5	CIP 0,004-0,015	CMP 2-8	TET 0,5-2
CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) МПК (мг/л)											
AMP -	AMS -	CFZ -	CXM -	AZT 2-8	GEN 0,5-2	AMK 1-4	COL 0,5-4	T/S 8/152-32/608	CIP 0,125-1	CMP -	TET 8-32
CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) МПК (мг/л)											
AMP > 32	AMS 8/4-32/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NCTC 13846 <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 положительный) MIC (мг/л)											
-	-	-	-	-	-	-	COL 4* (необычно 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 – Чешская коллекция микроорганизмов
ГСК, Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, г. Москва, телефон 8 (499) 241-31-19
NCTC – National Collection of Type Cultures

Охрана здоровья:
Набор реагентов не относится к категории опасных.

Утилизация использованного материала:
Использованный планшет поместите в ёмкость 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; Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI документ M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
(3) EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, <http://www.eucast.org>
(4) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, <http://www.eucast.org>
(5) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI документ M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Артикул	Наименование как в РУ	Номер РУ	Дата выдачи РУ
MLT00044	СЕНСИЛАТЕСТ Г- (МПК; Г-И)	ФСЗ 2011/09959	от 13.05.2019

Дата проведения контроля: 5. 3. 2020

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СИМВОЛЫ

Каталожный номер

Ин витро диагностика

Производитель

Перед использованием
внимательно изучайте инструкцию

Номер партии

Температура хранения

Срок годности

Nr kat.: MLT00044

Do celów mikrobiologicznych

Zestaw przeznaczony jest do oznaczenia wrażliwości na antybiotyki bakterii z rodziny Enterobacteriaceae na podstawie określenia MIC (minimalnego stężenia hamującego), tzn. najniższego stężenia, które zahamuje widoczny wzrost bakterii. Zestaw umożliwia 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. Dla testowania wrażliwości na antybiotyki przeznaczone do leczenia poważnych zakażeń przede wszystkim w przypadku pacjentów hospitalizowanych zaleca się użyć z zestawem MIC G-I także zestaw MIC G-II.

Zestaw zawiera:

- 10 płytek testowych
- 1 niesterylne 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 w skład 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 wianienki 60 ml (nr kat. 50004457)
- Pipeta (dozator) na 100 µl lub wielokanałowa pipeta 100 µl
- Pipeta na 100 µl
- Densytometr (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 (G-I), opisać numery badanych kultur. Pipetować do wszystkich studzienek po 100 µl nośnika zawiesiny MIC.
- 2) Przygotować próbkę 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.
- 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. Ostygly 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 próbkę z 2 ml sterylnej soli fizjologicznej (niebuforowanej).
- 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.
- 3) Przenieść 60 µl z zawiesiny bakteryjnej w roztworze soli fizjologicznej do próbki 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 (G-I), 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.

Ocena:

- 1) odczytać za pomocą automatycznego 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. 0,8 w porównaniu ze studzienką dla kontroli wzrostu. W kolistynie może wystąpić bardzo słaby wzrost, co również uważa się za wynik dodatni. W przypadku wątpliwości co do obecności wzrostu w studzienkach, użyj ErbaScan do odczytu.

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

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
A	128	128/64	16	64	16	32	64	16	4/76	8	32	32
B	64	64/32	8	32	8	16	32	8	2/38	4	16	16
C	32	32/16	4	16	4	8	16	4	1/19	2	8	8
D	16	16/8	2	8	2	4	8	2	0,5/9,5	1	4	4
E	8	8/4	1	4	1	2	4	1	0,25/4,75	0,5	2	2
F	4	4/2	0,5	2	0,5	1	2	0,5	0,12/2,38	0,25	1	1
G	2	2/1	0,25	1	0,25	0,5	1	0,25	0,06/1,19	0,12	0,5	0,5
H	1	1/0,5	0,12	0,5	0,12	0,25	0,5	0,12	0,03/0,6	0,06	0,25	K

Tab 2: Breakpointy kliniczne MIC (mg/l) dla Enterobacteriaceae

Antybiotyk	Skrót	EUCAST			CLSI		
		Wrażliwy S	Średnio-wrażliwy I	Oporny R	Wrażliwy S	Średnio-wrażliwy I	Oporny R
Ampicilina	AMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Ampicilina / sulbaktam	AMS	≤8/4		≥16/4	≤8/4	16/8	≥32/16
Cefazolina (zakażenia dróg moczowych) E. coli i Klebsiella spp. (z wyjątkiem K. aerogenes)	CFZ	≤0.001	0.002-4	≥8	≤2	4	≥8
Cefuroksym pozajelitowo E. coli, Klebsiella spp. (z wyjątkiem K. aerogenes), Raoultella spp. i P. mirabilis	CXM	≤0.001	0.002-8	≥16	≤8	16	≥32
Cefuroksym doustnie (tylko niepowikłane ZUM) E. coli, Klebsiella spp. (z wyjątkiem K. aerogenes), Raoultella spp. i P. mirabilis		≤8		≥16	≤4	8-16	≥32
Aztreonam	AZT	≤1	2-4	≥8	≤4	8	≥16
Gentamycyna (infekcje ogólnoustrojowe)	GEN	(≤2)		(≥4)			
Gentamycyna (zakażenia dróg moczowych)		≤2		≥4	≤4	8	≥16
Amikacyna (infekcje ogólnoustrojowe)	AMK	(≤8)		(≥16)			
Amikacyna (zakażenia dróg moczowych)		≤8		≥16	≤16	32	≥64
Kolistyna	COL	≤2	≤2	≥4			≥4
Trimetoprim / sulfamethoxazol	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Ciprofloksacyna	CIP	≤0.25	0.5*	≤1	≤0.25	0.5	≥1
Ciprofloksacyna, Salmonella spp.		≤0.06		≥0.12	≤0.06	0.12-0.5	≥1
Chloramfenikol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracyklina	TET	-	-	-	≤4	8	≥16

* ATU (Areas of Technical Uncertainty) – Wykonaj jeden z wariantów przed interpretacją wyników:

- Powtórzyć test
- Zastosowanie alternatywnego testu
- Zredukuj kategorię czułości
- Umieszczenie ATU w raporcie

Więcej na www.eucast.org

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).

1) Oporność na CXM, CFZ, AZT wskazuje na możliwość wytwarzania ESBL. Testy potwierdzające należy przeprowadzić zgodnie z zaleceniami EUCAST lub dokumentem CLSI M100 (2).

2) W rezultacie skorygować wynik wrażliwy niektórych szczepów (przede wszystkim *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*) na antybiotyki β-laktamowe na oporny wg oporności naturalnej. W tym przypadku jest to niewystarczające wytwarzanie β-laktamazy „in vitro”.

3) Szczepy *Proteus spp.*, *Morganella morganii* i *Providentia spp.* są naturalnie oporne na kolistynę.

4) Aminoglikozydy (EUCAST) – w zakażeniach ogólnoustrojowych aminoglikozydy muszą być stosowane w połączeniu z innymi aktywnymi terapiami. W tych okolicznościach punkty przerwania w nawiasach można wykorzystać do rozróżnienia organizmów z nabytymi mechanizmami oporności i bez nich. W przypadku izolatów bez mechanizmów oporności skomentuj w raporcie: „Aminoglikozydy są często podawane w połączeniu z innymi substancjami, albo w celu wspierania aktywności aminoglikozydów, albo w celu rozszerzenia spektrum leczenia. W zakażeniach ogólnoustrojowych aminoglikozyd musi być uzupełniony inną aktywną terapią.”

W zależności od krajowych lub laboratoryjnych standardów można użyć kolejne kryteria interpretacyjne, np. EUCAST Expert rules (4) dokument CLSI M100 (2) i M07 (5). Podczas interpretacji wyników należy wziąć pod uwagę identyfikację szczepu do gatunku, pochodzenie próbki, wywiad chorobowy pacjenta, ewentualnie wyniki testów uzupełniających.

Kontrola jakości:

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

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)											
MIC (mg/l)											
AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
2-8	2/1-8/4	1-4	2-8	0,06-0,25	0,25-1	0,5-4	0,25-2	≤0,5/9,5	0,004-0,015	2-8	0,5-2

CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)											
MIC (mg/l)											
AMP	AMS	CFZ	CXM	AZT	GEN	AMK	COL	T/S	CIP	CMP	TET
-	-	-	-	2-8	0,5-2	1-4	0,5-4	8/152-32/608	0,125-1	-	8-32

CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)											
MIC (mg/l)											
AMP	AMS										
> 32	8/4-32/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NCTC 13846 <i>Escherichia coli</i> (mcr-1 pozytywny)											
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

NCTC – National Collection of Type Cultures

Ochrona zdrowia:

Odczynniki 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 guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, <http://www.eucast.org>


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


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


WYTWÓRCA: Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 BRNO, REPUBLIKA CZESKA


Przedstawicielstwo w Polsce: ERBA POLSKA Sp. z o.o., WDC ul. Szyszkowa 35/37, 02-285 Warszawa, tel.: +48 510 251 115, +48 228 783 150, fax: +48 228 783 150, e-mail: erbapolska@erbamannheim.com


UŻYTE SYMBOLE


 Numer Katalogowy


 Urządzenie Diagnostyczne in Vitro

 Producent

 Patrz: Instrukcja Użycia

 Numer Partii

 Temperatury Graniczne

 Termin Ważności

10020295

Kat. č.: MLT00044

Pre mikrobiológiu

Súprava je určená na stanovenie citlivosti k antibiotikám baktérií čeľadi *Enterobacteriaceae* 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. Na testovanie citlivosti na antibiotiká určených na liečbu závažných infekcií hlavne u hospitalizovaných pacientov doporučujeme použiť súpravu MIC G-I a súpravu MIC G-II.

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
- Denzitometer (napr. DENSILAMETER II kat. č. INS00062)
- Inkubátor 35±2 °C
- Bežné laboratórne vybavenie (kľučky, popisovače, kahan, atď.)

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 (G-I). 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.

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. polovice doštičky jemným krúžením v jamkách. Znova namočte inokulátor v Petriho miske s bakteriálnou suspenziou a opakujte inokuláciu 2. polovice 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

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 (G-I). Zaznamenajte číslo vyšetrovanej kultúry na príslušnú doštičku. Rozplňte suspenzné médium MIC s inokulum po 100 µl do každej jamky doštičky.

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

Inkubácia:

Nainokulovanú doštičku vložte do priloženého PE sáčku, ktorého okraje zahnete pod doštičku tak, aby nedochádzalo k vysychaniu inokula.

Doštičku vložte do termostatu 35±2 °C na 16–20 hod.

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. U Kolistínu môže dochádzať aj k veľmi slabému rastu, ktorý sa považuje za pozitívny výsledok. V prípade pochybností o prítomnosti nárastu v jamkách použite pre odočet ErbaScan. Odlište zrnenie od prípadných bublín! Výsledky zaznamenajte.

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

	1 AMP	2 AMS	3 CFZ	4 CXM	5 AZT	6 GEN	7 AMK	8 COL	9 T/S	10 CIP	11 CMP	12 TET
A	128	128/64	16	64	16	32	64	16	4/76	8	32	32
B	64	64/32	8	32	8	16	32	8	2/38	4	16	16
C	32	32/16	4	16	4	8	16	4	1/19	2	8	8
D	16	16/8	2	8	2	4	8	2	0,5/9,5	1	4	4
E	8	8/4	1	4	1	2	4	1	0,25/4,75	0,5	2	2
F	4	4/2	0,5	2	0,5	1	2	0,5	0,12/2,38	0,25	1	1
G	2	2/1	0,25	1	0,25	0,5	1	0,25	0,06/1,19	0,12	0,5	0,5
H	1	1/0,5	0,12	0,5	0,12	0,25	0,5	0,12	0,03/0,6	0,06	0,25	K

Tab 2: Klinické breakpointy MIC (mg/l) pre Enterobacteriaceae

Antibiotikum	Skratka	EUCAST			CLSI		
		Citlivý S	Inter-mediárny I	Rezistentný R	Citlivý S	Inter-mediárny I	Rezistentný R
Ampicilin	AMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Ampicilin / sulbaktam	AMS	≤8/4		≥16/4	≤8/4	16/8	≥32/16
Cefazolin (infekcie močových ciest) <i>E. coli</i> a <i>Klebsiella</i> spp. (s výnimkou <i>K. aerogenes</i>)	CFZ	≤0.001	0.002-4	≥8	≤2	4	≥8
Cefuroxim iv <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (s výnimkou <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. a <i>P. mirabilis</i> Cefuroxim perorálne (iba nekomplikované IMC) <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (s výnimkou <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. a <i>P. mirabilis</i>	CXM	≤0.001	0.002-8	≥16	≤8	16	≥32
Aztreonam	AZT	≤1	2-4	≥8	≤4	8	≥16
Gentamicin (systémové infekcie)	GEN	(≤2)		(≥4)	≤4	8	≥16
Gentamicin (infekcie močových ciest)		≤2		≥4			
Amikacin (systémové infekcie)	AMK	(≤8)		(≥16)	≤16	32	≥64
Amikacin (infekcie močových ciest)		≤8		≥16			
Kolistin	COL	≤2	≤2	≥4			≥4
Trimetoprim / sulfametoxazol	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Ciprofloxacín	CIP	≤0.25	0.5*	≤1	≤0.25	0.5	≥1
Ciprofloxacín, <i>Salmonella</i> spp.		≤0.06		≥0.12	≤0.06	0.12-0.5	≥1
Chloramfenikol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracyklín	TET	-	-	-	≤4	8	≥16

* ATU (Areas of Technical Uncertainty) – pred interpretáciou výsledkov vykonajte jeden z variantov:

- Opakovanie testu
- Použitie alternatívneho testu
- Zníženie kategórie citlivosti
- Uvedenie ATU v reporte

Viac na www.eucast.org

Poznámky k interpretáciám:

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).

1) Rezistencia na CXM, CFZ, AZT upozorňuje na možnosť tvorby ESBL. Konfirmačné testy sa vykonávajú podľa doporučení EUCAST (3) alebo podľa CLSI dokumentu M100 (2).

2) Je nutné vo výsledku opraviť citlivosť niektorých kmeňov (predovšetkým *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp.) ku betalaktamovým antibiotikám na rezistentné podľa ich prirodzenej rezistencie. Ide o nedostatočnú produkciu betalaktamázy *in vitro*.

3) Kmene *Proteus* spp., *Morganella morganii* a *Providencia* spp. sú rezistentné na kolistin.

4) Aminoglykozidy (EUCAST) – u systémových infekcií musí byť aminoglykozidy používané v kombinácii s inou aktívnou terapiou. Za týchto okolností je možno breakpoint v zátvorkách použiť na odlíšenie organizmov so získanými mechanizmami rezistencie a bez nich. U izolátov bez mechanizmov rezistencie uveďte v správe komentár: „Aminoglykozidy sa často podávajú v kombinácii s inými látkami, a to buď na podporu aktivity aminoglykozidov, alebo na rozšírenie spektra liečby. Pri systémových infekciách musí byť aminoglykozid doplnený inou aktívnou terapiou.“

V závislosti od národných alebo laboratorných štandard je možné použiť ďalšie interpretačné kritériá napr. EUCAST (4) alebo CLSI dokumenty M100 (2) a M07 (5). Pri interpretácii výsledkov je potrebné zohľadniť druhovú identifikáciu kmeňa, pôvod zorky, anamnézu pacienta, prípadne výsledky dopĺňajúcich testov.

Kontrola kvality:

Na kontrolu kvality súpravy odporúčame používať všetky nižšie uvedené kontrolné kmene. Pri vyhodnotení výsledkov testovania kontrolnými kmeňmi sa riadte aktuálnym štandardom EUCAST alebo CLSI. Pre kontrolu je nutné používať čerstvé, nepasážované kmene.

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) MIC (mg/l)											
AMP 2-8	AMS 2/1-8/4	CFZ 1-4	CXM 2-8	AZT 0,06-0,25	GEN 0,25-1	AMK 0,5-4	COL 0,25-2	T/S ≤0,5/9,5	CIP 0,004-0,015	CMP 2-8	TET 0,5-2
CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) MIC (mg/l)											
AMP -	AMS -	CFZ -	CXM -	AZT 2-8	GEN 0,5-2	AMK 1-4	COL 0,5-4	T/S 8/152-32/608	CIP 0,125-1	CMP -	TET 8-32
CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) MIC (mg/l)											
AMP > 32	AMS 8/4-32/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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 guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, <http://www.eucast.org>

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

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

Dátum revízie: 5. 3. 2020

POUŽITÉ SYMBOLY



Katalógové číslo



In vitro diagnostikum



Výrobca



Čítajte návod k použitiu



Číslo šarže



Teplota skladovania



Dátum expirácie



Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, CZ
e-mail: diagnostics@erbalachema.com, www.erbalachema.com

M-MIC/PI/01/20/N/INT

Kat. č.: MLT00044

Pro mikrobiologii

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

Principem testu je rehydratace antibiotik v jamkách pomocí Mueller Hinton II bujonu a přidání bakteriální suspenze. Po 16–20 hodinové inkubaci jsou výsledky odečítány vizuálně nebo readrem. Pro testování citlivosti k antibiotikům určených pro léčbu závažných infekcí zejména u hospitalizovaných pacientů doporučujeme použít se soupravou MIC G-I i soupravu MIC G-II.

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 fólie 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 (G-I) 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 seřete několik kolonií a připravte ve fyziologickém roztoku bakteriální suspenzi o denzitě 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 seřete několik kolonií a připravte ve fyziologickém roztoku bakteriální suspenzi o denzitě 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 (G-I) 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 přiloženého PE sáčku, jehož okraje zahnete pod desku tak, aby nedocházelo k vysychání inokula.

Destičku vložte do termostatu 35±2°C na 16–20 hod.

Vyhodnocení:

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

- 1) Odečítejte proti šedému pozadí nebo oproti 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. U Kolistinu může docházet i k velmi slabému růstu, který se považuje za pozitivní výsledek. V případě pochybností o přítomnosti nárůstu v jamkách použijte pro odečet ErbaScan. Odlišťe změnění od případných bublin! Výsledky zaznamenejte.

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

	1 AMP	2 AMS	3 CFZ	4 CXM	5 AZT	6 GEN	7 AMK	8 COL	9 T/S	10 CIP	11 CMP	12 TET
A	128	128/64	16	64	16	32	64	16	4/76	8	32	32
B	64	64/32	8	32	8	16	32	8	2/38	4	16	16
C	32	32/16	4	16	4	8	16	4	1/19	2	8	8
D	16	16/8	2	8	2	4	8	2	0,5/9,5	1	4	4
E	8	8/4	1	4	1	2	4	1	0,25/4,75	0,5	2	2
F	4	4/2	0,5	2	0,5	1	2	0,5	0,12/2,38	0,25	1	1
G	2	2/1	0,25	1	0,25	0,5	1	0,25	0,06/1,19	0,12	0,5	0,5
H	1	1/0,5	0,12	0,5	0,12	0,25	0,5	0,12	0,03/0,6	0,06	0,25	K

Tab 2: Klinické breakpointy MIC (mg/l) pro Enterobacteriaceae

Antibiotikum	Zkratka	EUCAST			CLSI		
		Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R
Ampicilin	AMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Ampicilin / sulbaktam	AMS	≤8/4		≥16/4	≤8/4	16/8	≥32/16
Cefazolin (infekce močových cest) <i>E. coli</i> a <i>Klebsiella</i> spp. (s výjimkou <i>K. aerogenes</i>)	CFZ	≤0.001	0.002-4	≥8	≤2	4	≥8
Cefuroxim iv <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (s výjimkou <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. a <i>P. mirabilis</i> Cefuroxim perorální (pouze nekomplikované IMC) <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (s výjimkou <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. a <i>P. mirabilis</i>	CXM	≤0.001	0.002-8	≥16	≤8	16	≥32
		≤8		≥16	≤4	8-16	≥32
Aztreonam	AZT	≤1	2-4	≥8	≤4	8	≥16
Gentamicin (systémové infekce)	GEN	(≤2)		(≥4)	≤4	8	≥16
Gentamicin (infekce močových cest)		≤2		≥4			
Amikacin (systémové infekce)	AMK	(≤8)		(≥16)	≤16	32	≥64
Amikacin (infekce močových cest)		≤8		≥16			
Kolistin	COL	≤2	≤2	≥4			≥4
Trimetoprim / sulfametoxazol	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Ciprofloxacín	CIP	≤0.25	0.5*	≤1	≤0.25	0.5	≥1
Ciprofloxacín, <i>Salmonella</i> spp.		≤0.06		≥0.12	≤0.06	0.12-0.5	≥1
Chloramfenikol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracyklin	TET	-	-	-	≤4	8	≥16

*ATU (Areas of Technical Uncertainty) - před interpretací výsledků proveďte jednu z variant:

- Opakování testu
- Použití alternativního testu
- Snížení kategorie citlivosti
- Uvedení ATU v reportu

Více na www.eucast.org

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 dle CLSI dokumentu M100 (2).

1) Rezistence k CXM, CFZ, AZT upozorňuje na možnost tvorby ESBL. Konfirmační testy se provádí dle doporučení EUCAST (3) nebo CLSI dokumentu M100 (2).

2) Je nutno ve výsledku opravit citlivost některých kmenů (především *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp.) k betalaktamovým antibiotikům na rezistentní dle jejich přirozené rezistence. Jde o nedostatečnou produkci betalaktamázy *in vitro*.

3) Kmeny *Proteus* spp., *Morganella morganii* a *Providencia* spp. jsou přirozeně rezistentní ke kolistinu.

4) Aminoglykosidy (EUCAST) – u systémových infekcí musí být aminoglykosidy používány v kombinaci s jinou aktivní terapií. Za těchto okolností lze breakpointy v závorkách použít k odlišení organismů se získanými mechanismy rezistence a bez nich. U izolátů bez mechanismů rezistence uveďte ve zprávě komentář: „Aminoglykosidy se často podávají v kombinaci s jinými látkami, a to buď na podporu aktivity aminoglykosidů, nebo na rozšíření spektra léčby. U systémových infekcí musí být aminoglykosid doplněn jinou aktivní terapií.“

V závislosti na národních nebo laboratorních standardech je nutné použít další interpretační kritéria, např. EUCAST Expert rules (4) nebo CLSI dokument M100 (2) a M07 (5). Při interpretaci výsledků je třeba zohlednit druhovou identifikaci kmene, původ vzorku, anamnézu pacienta, případně výsledky doplňujících testů.

Kontrola kvality:

Pro kontrolu kvality doporučujeme používat všechny níže uvedené kontrolní kmeny. Při vyhodnocení výsledků testování kontrolními kmeny se řiďte aktuálním standardem EUCAST nebo CLSI. Pro kontrolu je nutné používat čerstvé, nepasážované kmeny.

CCM 3954 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)												
MIC (mg/l)												
AMP 2-8	AMS 2/1-8/4	CFZ 1-4	CXM 2-8	AZT 0,06-0,25	GEN 0,25-1	AMK 0,5-4	COL 0,25-2	T/S ≤0,5/9,5	CIP 0,004-0,015	CMP 2-8	TET 0,5-2	
CCM 3955 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)												
MIC (mg/l)												
AMP -	AMS -	CFZ -	CXM -	AZT 2-8	GEN 0,5-2	AMK 1-4	COL 0,5-4	T/S 8/152-32/608	CIP 0,125-1	CMP -	TET 8-32	
CCM 4225 <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)												
MIC (mg/l)												
AMP > 32	AMS 8/4-32/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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

NCTC – National Collection of Type Cultures

Ochrana zdraví:

Komponenty soupravy neobsahují nebezpečné látky.

Likvidace použitého materiálu:

Po použití vložte destičku do nádoby pro infekční materiál a likvidujte dle vlastních interních předpisů, autoklávujte nebo zničte spaláním.

Prázdné vapirové 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.

(3) EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, <http://www.eucast.org>

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

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

POUŽITÉ SYMBOLY

REF Katalogové číslo

IVD In vitro diagnostikum

Výrobce

Čtěte návod k použití

LOT Číslo šarže

Teplota skladování

Datum expirace

Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, CZ
e-mail: diagnostics@erbamannheim.com, www.erbalachema.com

Datum revize: 5. 3. 2020

M-MIC/PI/01/20/N/INT