



MIC STAPHY



Cat. N.: MLT00047

For microbiology

The kit is designed to test antimicrobial susceptibility of staphylococci on the basis of MIC determination (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.

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 for a minimum of 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 60–200 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 (STAPHY) 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 sterile 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 0.5–1,0 on McFarland scale in physiological solution.
- 4) Pour the bacterial suspension into a sterile Petri dish for inoculation.
- 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 120 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 (STAPHY) 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 °C for 16–20 hours. Staphylococci resistance to cefoxitin (MRS) may be better detected when incubated at 35 °C or below. The plate is incubated for 24 hours before vancomycin is read.

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. Exemption: With Trimethoprim/sulfamethoxazole, 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
	PEN	COX	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	CIP	T/S	GEN	VAN	NFT
A	4	16	8	4	16	32	8	8	4/76	16	16	128
B	2	8	4	2	8	16	4	4	2/38	8	8	64
C	1	4	2	1	4	8	2	2	1/19	4	4	32
D	0.5	2	1	0.5	2	4	1	1	0.5/9.5	2	2	16
E	0.25	1	0.5	0.25	1	2	0.5	0.5	0.25/4.75	1	1	8
F	0.12	0.5	0.25	0.12	0.5	1	0.25	0.25	0.12/2.38	0.5	0.5	4
G	0.06	0.25	0.12	0.06	0.25	0.5	0.12	0.12	0.06/1.19	0.25	0.25	2
H	0.03	0.12	0.06	0.03	0.12	0.25	0.06	0.06	0.03/0.6	0.12	0.12	K

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

Antibiotics	Abbr.	EUCAST			CLSI		
		Sensitive S	Intermediate I	Resistant R	Sensitive S	Intermediate I	Resistant R
Penicillin	PEN	≤0.12 SA, Slug		≥0.25 SA, Slug	≤0.12		≥0.25
Cefoxitin (screen)	COX	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug
Erythromycin	ERY	≤1	2	≥4	≤0.5	1-4	≥8
Clindamycin	CLI	≤0.25	0.5	≥1	≤0.5	1-2	≥4
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤4		≥8
Chloramphenicol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracycline	TET	≤1	2	≥4	≤4	8	≥16
Ciprofloxacin	CIP	≤0.001	0.002-1	≥2	≤1	2	≥4
Trimethoprim / sulfamethoxazole	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Gentamicin	GEN	(≤1) SA, Coa neg		(≥2) SA, Coa neg	≤4	8	≥16
Vankomycin	VAN	≤2 SA ≤4 Coa neg		≥4 SA ≥8 Coa neg	≤2 SA ≤4 Coa neg	4-8 SA 8-16 Coa neg	≥16 SA ≥32 Coa neg
Nitrofurantoin	NFT	≤64 Ssap		≥128 Ssap	≤32	64	≥128

SA– *Staphylococcus aureus*, Slug–*Staphylococcus lugdunensis*, Ssap–*Staphylococcus saprophyticus*

Coa neg–coagulase negative staphylococci

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

Penicillin: most staphylococci are beta-lactamase producers (with exception of *S. saprophyticus*). If ≤0.12 mg/l, verify susceptibility with a benzylpenicillin disc.

Cefoxitin: resistance indicates MRSA. Further confirmation tests are recommended according to EUCAST guidelines (3) or CLSI document M100 (2).

Clindamycin: if resistant to erythromycin and sensitive to clindamycin (or clindamycin intermediate) determine induction of resistance to clindamycin by testing antagonism of clindamycin activity by a macrolide agent. If not detected, then report as susceptible to clindamycin. If detected, then report as resistant with a comment according to the recommendation of EUCAST (1) or according to CLSI document M100 (2).

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."

Vancomycin: if resistant the strain should be referred to a reference laboratory. Follow the recommendations of EUCAST (3) or CLSI (2).

Other interpretative criteria can 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.

Staphylococcus aureus CCM 4223 (ATCC 29213)											
PEN 0.25-2	COX 1-4	ERY 0.25-1	CLI 0.06-0.25	LIZ 1-4	CMP 2-16	TET 0.12-1	CIP 0.12-0.5	T/S ≤0.5/9.5	GEN 0.12-1	VAN 0.5-2	NFT 8-32

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 document 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 document M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

USED SYMBOLS

Date of revision: 29. 4. 2021



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/06/21/J/INT



Номер в каталоге № MLT00047

Для микробиологических исследований

Набор предназначен для определения чувствительности стафилококков 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 температуре от 2–25 °С. Срок годности указан на индивидуальной алюминиевой упаковке каждого планшета. Необходимо достать планшет из холодильника не менее чем за 30 минут до использования (не вскрывать индивидуальную упаковку). После вскрытия индивидуальной алюминиевой упаковки планшет следует немедленно использовать. Не следует держать планшет открытым во избежание падения влаги – это может привести к разрушению антибиотиков и получению ложных результатов теста.

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 номер в каталоге № MLT00070)
- Этанол
- Стерильные пробирки
- Инокулятор ErbaDip номер в каталоге № 50004456
- Стерильные чашки Петри
- Стерильные ёмкости 60 ml номер в каталоге № 50004457
- Степпер или многоканальная пипетка до 100 мкл
- Пипетка с диапазоном дозирования 60–200 мкл
- Денситометр (напр.: Денси-Ла-Метр 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 (рекомендации по процедуре) и инокуляция:

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.: STAPHY) 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 0,5–1,0 по МакФарланду из нескольких колоний чистой 18-24 часовой культуры, выращенной на кровяном агаре.
- 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 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.
- 3) Поместите 120 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.: STAPHY) 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. Стафилококки, резистентные к цефокситину (MRS), необходимо культивировать при температуре = 35 °С или ниже. Для учета результатов определения чувствительности к ванкомицину инкубируйте не менее 24 часов.

Учет результатов:

- 1) Достаньте планшет из полиэтиленового пакетика. Для учёта результатов роста в микролунках выберите наиболее подходящий для Вас способ:
- 2) Учитывайте результат на темном фоне или используйте для этого макет планшета, напечатанный в инструкции.
- 3) Учитывайте результаты в проходящих лучах естественного или искусственного освещения.
- 4) Использование увеличительного стекла (лупы) не рекомендуется.
- 5) 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 сравнением 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
	PEN	COX	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	CIP	T/S	GEN	VAN	NFT
A	4	16	8	4	16	32	8	8	4/76	16	16	128
B	2	8	4	2	8	16	4	4	2/38	8	8	64
C	1	4	2	1	4	8	2	2	1/19	4	4	32
D	0,5	2	1	0,5	2	4	1	1	0,5/9,5	2	2	16
E	0,25	1	0,5	0,25	1	2	0,5	0,5	0,25/4,75	1	1	8
F	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	1	0,25	0,25	0,12/2,38	0,5	0,5	4
G	0,06	0,25	0,12	0,06	0,25	0,5	0,12	0,12	0,06/1,19	0,25	0,25	2
H	0,03	0,12	0,06	0,03	0,12	0,25	0,06	0,06	0,03/0,6	0,12	0,12	K

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

Антибиотики	Аббр.	EUCAST			CLSI		
		Чувствительный S	Умеренно-резистентный I	Резистентный R	Чувствительный S	Умеренно-резистентный I	Резистентный R
Penicillin	PEN	≤0,12 SA, Slug		≥0,25 SA, Slug	≤0,12		≥0,25
Cefoxitin (screen)	COX	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug
Erythromycin	ERY	≤1	2	≥4	≤0,5	1-4	≥8
Clindamycin	CLI	≤0,25	0,5	≥1	≤0,5	1-2	≥4
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤4		≥8
Chloramphenicol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracycline	TET	≤1	2	≥4	≤4	8	≥16
Ciprofloxacin	CIP	≤0.001	0.002-1	≥2	≤1	2	≥4
Trimethoprim / sulfamethoxazole	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Gentamicin	GEN	(≤1) SA, Coa neg		(≥2) SA, Coa neg	≤4	8	≥16
Vankomycin	VAN	≤2 SA ≤4 Coa neg		≥4 SA ≥8 Coa neg	≤2 SA ≤4 Coa neg	4-8 SA 8-16 Coa neg	≥16 SA ≥32 Coa neg
Nitrofurantoin	NFT	≤64 Ssap		≥128 Ssap	≤32	64	≥128

SA – *Staphylococcus aureus*, Slug - *Staphylococcus lugdunensis*, Ssap - *Staphylococcus saprophyticus*
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 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).
Пенициллин: большинство стафилококков являются продуцентами бета-лактамаз (за исключением *S. saprophyticus*). Если МПК пенициллина у тестируемого стафилококка ≤ 0,12 мг/л, проверьте результат диско-диффузионным методом с диском бензилпенициллина.
Цефокситин: по резистентности к цефокситину выявляют метициллин-резистентные стафилококки (MRS). Тесты для подтверждения рекомендуется выполнять согласно EUCAST-руководству по определению механизмов резистентности, их клинического и эпидемиологического значения (3) или CLSI документ M100 (2).
Клиндамицин: если бактериальная культура резистентна к эритромицину и чувствительна к клиндамицину (или умеренно-резистентна) определите наличие индуцибельной резистентности (MLSb – макролиды-линкозамиды-стрептограмин B) с использованием дисков эритромицина и клиндамицина (D-тест) и скорректируйте результат для клиндамицина согласно EUCAST (1) или CLSI M100 (2).
Ванкомицин: резистентный к ванкомицину штамм стафилококка следует направить в референсную лабораторию. Тесты для подтверждения рекомендуется выполнять согласно EUCAST-руководству (3) или CLSI документ M100 (2).
Аминогликозиды (EUCAST): При системных инфекциях аминогликозиды следует использовать в сочетании с другими активными препаратами. При этих обстоятельствах точки разрыва в скобках могут использоваться для различения организмов с и без приобретенных механизмов устойчивости. Для изолятов без механизмов устойчивости, комментарий в отчете: „Аминогликозиды часто вводят в сочетании с другими веществами, либо для поддержки 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: EUCAST Expert rules in antimicrobial susceptibility testing (4), или CLSI документы M100 (2) и M07 (5). При необходимости следует принять во внимание при интерпретации результатов следующие параметры: вид бактерий, тип биоматериала, особенности анамнеза заболевания 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. Свежие штаммы должны быть использованы для проверки

Staphylococcus aureus CCM 4223 (ATCC 29213)											
PEN 0,25-2	COX 1-4	ERY 0,25-1	CLI 0,06-0,25	LIZ 1-4	CMP 2-16	TET 0,12-1	CIP 0,12-0,5	T/S ≤0,5/9,5	GEN 0,12-1	VAN 0,5-2	NFT 8-32


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

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. 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
MLT00047	СЕНСИЛАТЕСТ СТАФИ (МПК)	ФСЗ 2011/09959	от 13.05.2019


ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СИМВОЛЫ Дата проведения контроля: 29. 4. 2021




Каталожный номер




Ин витро диагностика




Производитель




Перед использованием
внимательно изучайте инструкцию



Номер партии



Температура хранения



Срок годности



Nr kat. MLT00047

Zestaw przeznaczony jest do oznaczenia wrażliwości na antybiotyki gronkowców 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.

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, żeby doprowadzić ich do temp. pokojowej. 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 60–200 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 (STAPHY), 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 inokulumu
- 3) Z 18–24 godzinnej kultury na agarze krwawym pobrać kilka kolinii i przygotować w roztworze soli fizjologicznej zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5–1 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 kolinii i przygotować w roztworze soli fizjologicznej zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 McFarland.
- 3) Przenieść 120 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 (STAPHY), opisać numery badanych kultur. Pipetować do wszystkich studzienek po 100 µl nośnika zawiesiny MIC z inokulumem.

Uwaga: Przetwarzać 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 inokulumu. Płytkę włożyć do ciepłarki w temp. 35±2 °C na 16–20 godz. Oporność gronkowców na cefoksytynę (MRS) można lepiej wykryć podczas hodowli do 35 °C. Płytkę należy inkubować przez 24 godziny dla oceny wankomycyny.

Ocena:

Płytkę wyjąć z torebki PE. Dla odczytu wzrostu w studzienkach należy wybrać najbardziej optymalny dla siebie sposób:

- 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 ocenę studzienki kontroli wzrostu przeprowadza program MIKROB 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
	PEN	COX	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	CIP	T/S	GEN	VAN	NFT
A	4	16	8	4	16	32	8	8	4/76	16	16	128
B	2	8	4	2	8	16	4	4	2/38	8	8	64
C	1	4	2	1	4	8	2	2	1/19	4	4	32
D	0,5	2	1	0,5	2	4	1	1	0,5/9,5	2	2	16
E	0,25	1	0,5	0,25	1	2	0,5	0,5	0,25/4,75	1	1	8
F	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	1	0,25	0,25	0,12/2,38	0,5	0,5	4
G	0,06	0,25	0,12	0,06	0,25	0,5	0,12	0,12	0,06/1,19	0,25	0,25	2
H	0,03	0,12	0,06	0,03	0,12	0,25	0,06	0,06	0,03/0,6	0,12	0,12	kontrola wzrostu

Tab 2: Numeryczne wyrażenie MIC (mg/l) dla gronkowców

Antybiotyk	Skrót	EUCAST			CLSI		
		Wrażliwy S	Średnio- wrażliwy I	Oporny R	Wrażliwy S	Średnio- wrażliwy I	Oporny R
Penicylina	PEN	≤0,12 SA, Slug		≥0,25 SA, Slug	≤0,12		≥0,25
Cefoksytyna	COX	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug
Erytromycyna	ERY	≤1	2	≥4	≤0,5	1-4	≥8
Klindamycyna	CLI	≤0,25	0,5	≥1	≤0,5	1-2	≥4
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤4		≥8
Chloramfenikol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracyklina	TET	≤1	2	≥4	≤4	8	≥16
Ciprofloksacyna	CIP	≤0.001	0.002-1	≥2	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfamethoxazol	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Gentamycyna	GEN	(≤1) SA, Koa neg		(≥2) SA, Koa neg	≤4	8	≥16
Vankomycyna	VAN	≤2 SA ≤4 Koa neg		≥4 SA ≥8 Koa neg	≤2 SA ≤4 Koa neg	4-8 SA 8-16 Koa neg	≥16 SA ≥32 Koa neg
Nitrofurantoina	NFT	≤64 Ssap		≥128 Ssap	≤32	64	≥128

SA – *Staphylococcus aureus*, Slug – *Staphylococcus lugdunensis*, Ssap – *Staphylococcus saprophyticus*

Koa neg – koagulazo ujemne gronkowce

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 CLSI dokumenta M100 (2).

Penicylina: Większość gronkowców (z wyjątkiem *S. saprophyticus*) jest producentem β-laktamaz. W przypadku MIC ≤0,12 mg/l, wrażliwość należy sprawdzić za pomocą krążka z benzylpenicyliną.

Cefoksytyna: oporność wskazuje na możliwość MRSA. Kolejne testy potwierdzające przeprowadzać zgodnie z zaleceniami EUCAST (3) lub zgodnie z dokumentem CLSI nr M100 (2). Klindamycyna: w przypadku jednoczesnej oporności na erytromycynę i wrażliwości na klindamycynę (lub klindamycyna średniowrażliwa) należy określić indukację oporności na klindamycynę za pomocą testu antagonizmu pomiędzy klindamycyną i makrolidem. W przypadku braku potwierdzenia, szczep jest klindamycynowrażliwy. W przypadku potwierdzenia, należy szczep zgłaszać jako oporny z komentarzem zgodnie z zaleceniem EUCAST (1) lub z komentarzem zgodnie z zaleceniami CLSI (2).

Wankomycyna: w przypadku jeżeli szczep jest oporny, powinien zostać wysłany do laboratorium referencyjnego. W przypadku wykrycia oporności na wankomycynę postępować zgodnie z EUCAST (3) lub zgodnie z dokumentem CLSI nr M100 (2).

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) lub dokument CLSI M100 (2) i M07 (5).

Podczas interpretacji wyników należy wziąć pod uwagę identyfikację szczepu do gatunku, pochodzenie próbki i wywiad chorobowy pacjenta; ewentualnie wyniki testów uzupełniających.**Kontrola jakości:**

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

Staphylococcus aureus CCM 4223 (ATCC 29213)											
PEN 0,25-2	COX 1-4	ERY 0,25-1	CLI 0,06-0,25	LIZ 1-4	CMP 2-16	TET 0,12-1	CIP 0,12-0,5	T/S ≤0,5/9,5	GEN 0,12-1	VAN 0,5-2	NFT 8-32

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:**

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

Data rewizji: 29. 4. 2021

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

M-MIC/PI/06/21/J/INT

Kat. č.: MLT00047

Pro mikrobiologii

Súprava je určená na stanovenie citlivosti stafylokokov 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 bujónu 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 30 min., aby sa zamedzilo kondenzácii vody. Po otvorení hliníkového obalu a odstránení fólie nenechávajte už otvorené doštičky bez ochrany. Vzdušná vlhkosť ohrozuje funkčnosť antibiotík !!!

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

- Sterilný nepufrovaný fyziologický roztok
- Mueller Hinton bujón II adjustovaný na katióny (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 60–200 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 (STAPHY). 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 0,5–1 McFarland.
- 4) Túto suspenziu vlejte do sterilnej Petriho misky.
- 5) Inokulujte rozplnenú doštičku pomocou sterilného inokulátora: inokulátor namočte v Petriho miske s etanolom a opäť 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 prenesť 120 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 (STAPHY). 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. Rezistencia stafylokokov k cefoxitínu (MRS) môže byť lepšie detekovateľná pri kultivácii do 35 °C. Doštička je inkubovaná 24 hodín pre hodnotenie vankomycínu.

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. Odlišťe znenie 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
	PEN	COX	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	CIP	T/S	GEN	VAN	NFT
A	4	16	8	4	16	32	8	8	4/76	16	16	128
B	2	8	4	2	8	16	4	4	2/38	8	8	64
C	1	4	2	1	4	8	2	2	1/19	4	4	32
D	0,5	2	1	0,5	2	4	1	1	0,5/9,5	2	2	16
E	0,25	1	0,5	0,25	1	2	0,5	0,5	0,25/4,75	1	1	8
F	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	1	0,25	0,25	0,12/2,38	0,5	0,5	4
G	0,06	0,25	0,12	0,06	0,25	0,5	0,12	0,12	0,06/1,19	0,25	0,25	2
H	0,03	0,12	0,06	0,03	0,12	0,25	0,06	0,06	0,03/0,6	0,12	0,12	K

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

Antibiotikum	Zkratka	EUCAST			CLSI		
		Citlivý S	Inter-mediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Inter-mediární I	Rezistentní R
Penicilín	PEN	≤0,12 SA, Slug		≥0,25 SA, Slug	≤0,12		≥0,25
Cefoxitín (screen)	COX	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug
Erytromycín	ERY	≤1	2	≥4	≤0,5	1-4	≥8
Klindamycín	CLI	≤0,25	0,5	≥1	≤0,5	1-2	≥4
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤4		≥8
Chloramfenikol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracyklin	TET	≤1	2	≥4	≤4	8	≥16
Ciprofloxacín	CIP	≤0.001	0.002-1	≥2	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfametoxazol	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Gentamicín	GEN	(≤1) SA, Koa neg		(≥2) SA, Koa neg	≤4	8	≥16
Vankomycín	VAN	≤2 SA ≤4 Koa neg		≥4 SA ≥8 Koa neg	≤2 SA ≤4 Koa neg	4-8 SA 8-16 Koa neg	≥16 SA ≥32 Koa neg
Nitrofurantoin	NFT	≤64 Ssap		≥128 Ssap	≤32	64	≥128

SA – *Staphylococcus aureus*, Slug – *Staphylococcus lugdunensis*, Ssap – *Staphylococcus saprophyticus*

Koa neg – koaguláza negatívne stafylokoky

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 interpretácii:**

Podľa stanovenej MIC sa testovaný kmeň radí do kategórie citlivý – intermediárny – rezistentný k danému antibiotiku na základe interpretačných tabuliek EUCAST (1) alebo CLSI dokumentu M100 (2).

Penicilín: väčšina stafylokokov (s výnimkou *S. saprophyticus*) sú producenti beta-laktamázy. Pokiaľ je MIC ≤0,12 mg/l, overte citlivosť diskom s benzylpenicilínom.

Cefoxitín: rezistencia indikuje MRSA. Ďalšie konfirmačné testy sa vykonávajú podľa doporučení EUCAST (3) alebo CLSI dokumentu M100 (2)

Klindamycín: v prípade súčasnej rezistencie na erytromycín a citlivosti na klindamycín (alebo klindamycín intermediárny) je potrebné stanoviť indukciu rezistencie ku klindamycínu pomocou testu antagonizmu medzi klindamycínom a makrolidom. Ak nie je potvrdená, je kmeň ku klindamycínu citlivý. Pokiaľ je potvrdená, kmeň sa hlási ako rezistentný s komentárom podľa doporučení EUCAST (1) alebo s komentárom podľa doporučení CLSI (2).

Vankomycín: ak je kmeň rezistentný, mal by byť odoslaný do referenčného laboratória. Pri detekcii rezistencie k vankomycínu postupujte podľa doporučení EUCAST (3) alebo CLSI dokumentu M100 (2).

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 odlišenie 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 laboratórných štandard je možné použiť ďalšie interpretačné kritériá, napr. EUCAST Expert rules (4) alebo CLSI dokumentov M100 (2) a M07 (5). Pri interpretácii výsledkov je potrebné zohľadniť druhovú identifikáciu kmeňa, pôvod vzorky, anamnézu pacienta, prípadne výsledky doplňujúcich testov.

Kontrola kvality:

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

Staphylococcus aureus CCM 4223 (ATCC 29213)											
PEN 0,25-2	COX 1-4	ERY 0,25-1	CLI 0,06-0,25	LIZ 1-4	CMP 2-16	TET 0,12-1	CIP 0,12-0,5	T/S ≤0,5/9,5	GEN 0,12-1	VAN 0,5-2	NFT 8-32

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.

POUŽITÉ SYMBOLY

Katalógové číslo

In vitro diagnostikum

Výrobca

Čítajte návod k použitiu

Číslo šarže

Teplota skladovania

Dátum expirácie

Dátum revízie: 29. 4. 2021

Kat. č.: MLT00047

Pro mikrobiologii

Souprava je určena pro stanovení citlivosti stafylokoků 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 readrem.

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 nechte 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
- Křivkováč pipeta na 100 µl nebo multikanálová pipeta 100 µl
- Pipeta na 60–200 µl
- Densitometr (např. DENSILAMETER II kat. č. INS00062)
- Inkubátor 35±2 °C
- Běžné laboratorní vybavení (kličky, 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 (STAPHY) 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 0,5–1 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 120 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 (STAPHY) 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. Rezistence stafylokoků k cefoxitinu (MRS) může být lépe detekovatelná při kultivaci do 35 °C. Destička je inkubována 24 hodin pro hodnocení vancomycinu.

Vyhodnocení:

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

- 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/sulfametoxolu 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
	PEN	COX	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	CIP	T/S	GEN	VAN	NFT
A	4	16	8	4	16	32	8	8	4/76	16	16	128
B	2	8	4	2	8	16	4	4	2/38	8	8	64
C	1	4	2	1	4	8	2	2	1/19	4	4	32
D	0,5	2	1	0,5	2	4	1	1	0,5/9,5	2	2	16
E	0,25	1	0,5	0,25	1	2	0,5	0,5	0,25/4,75	1	1	8
F	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	1	0,25	0,25	0,12/2,38	0,5	0,5	4
G	0,06	0,25	0,12	0,06	0,25	0,5	0,12	0,12	0,06/1,19	0,25	0,25	2
H	0,03	0,12	0,06	0,03	0,12	0,25	0,06	0,06	0,03/0,6	0,12	0,12	K

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

Antibiotikum	Zkratka	EUCAST			CLSI		
		Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R
Penicilin	PEN	≤0,12 SA, Slug		≥0,25 SA, Slug	≤0,12		≥0,25
Cefoxitin (screen)	COX	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug	≤4 SA, Slug		≥8 SA, Slug
Erytromycin	ERY	≤1	2	≥4	≤0,5	1-4	≥8
Klindamycin	CLI	≤0,25	0,5	≥1	≤0,5	1-2	≥4
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤4		≥8
Chloramfenikol	CMP	≤8		≥16	≤8	16	≥32
Tetracyklin	TET	≤1	2	≥4	≤4	8	≥16
Ciprofloxacín	CIP	≤0.001	0.002-1	≥2	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfametoxazol	T/S	≤2/38	4/76	≥8/152	≤2/38		≥4/76
Gentamicin	GEN	(≤1) SA, Koa neg		(≥2) SA, Koa neg	≤4	8	≥16
Vankomycin	VAN	≤2 SA ≤4 Koa neg		≥4 SA ≥8 Koa neg	≤2 SA ≤4 Koa neg	4-8 SA 8-16 Koa neg	≥16 SA ≥32 Koa neg
Nitrofurantoin	NFT	≤64 Ssap		≥128 Ssap	≤32	64	≥128

SA – *Staphylococcus aureus*, Slug – *Staphylococcus lugdunensis*, Ssap – *Staphylococcus saprophyticus*

Koa neg – koaguláza negativní stafylokoky

ATU (Areas of Technical Uncertainty = Oblast interpretačních obtíží) - 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).

Penicilin: většina stafylokoků (s výjimkou *S. saprophyticus*) jsou producenti beta-laktamázy. Pokud je MIC ≤0,12 mg/l, ověřte citlivost diskem s benzylpenicilinem.

Cefoxitin: rezistence indikuje MRSA. Další konfirmační testy se provádí dle doporučení EUCAST (3) nebo CLSI dokumentu M100 (2).

Klindamycin: v případě současné rezistence na erytromycin a citlivosti na klindamycin (nebo klindamycin intermediární) je nutno stanovit indukci rezistence ke klindamycinu pomocí testu antagonismu mezi klindamycinem a makrolidem. Není-li potvrzena, je kmen ke klindamycinu citlivý. Pokud je potvrzena, kmen se hlásí jako rezistentní s komentářem dle doporučení EUCAST (1) nebo s komentářem dle doporučení CLSI (2).

Vankomycin: pokud je kmen rezistentní, měl by být odeslán do referenční laboratoře. Při detekci rezistence k vankomycinu postupujte dle doporučení EUCAST (3) nebo CLSI dokumentu M100 (2).

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

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, nepasážené kmeny.

Staphylococcus aureus CCM 4223 (ATCC 29213)											
PEN 0,25-2	COX 1-4	ERY 0,25-1	CLI 0,06-0,25	LIZ 1-4	CMP 2-16	TET 0,12-1	CIP 0,12-0,5	T/S ≤0,5/9,5	GEN 0,12-1	VAN 0,5-2	NFT 8-32

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.

(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

Čtete návod k použití

Datum revize: 29. 4. 2021

LOT Číslo šarže

Teplota skladování

Datum expirace