

Kat. č.: 10020300

Pro mikrobiologii

Souprava je určena pro stanovení citlivosti enterokoků a streptokoků (sk. A, B, C, G a *S. pneumoniae*) 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 MIC G+ media a přidání bakteriální suspenze. Po 16 – 20 hodinové inkubaci jsou výsledky odečítány vizuálně nebo pomocí readeru.

Souprava obsahuje:

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

Skladování a expirace soupravy:

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

Potřeby pro práci se soupravou, které nejsou součástí soupravy:

- Suspenzní médium MIC G+ (kat. č. 10020338)
- Sterilní nepufrovaný fyziologický roztok
- Etanol
- Sterilní zkumavky
- Inokulátor (Erba Lachema kat. č. 50004456)
- Sterilní Petriho misky
- Sterilní vaničky 60 ml (Erba Lachema kat. č. 50004457)
- Křokovací pipeta na 100 µl nebo multikanálová pipeta 100 µl
- Pipeta na 60-100 µl
- Densitometr (např. DENSILAMETER II, Erba Lachema kat.č. 50001529)
- 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+) 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 G+ ke snížení povrchového napětí inokula.
- 3) Z 18 – 24 hodinové kultury na krevním agaru setřete několik kolonií a připravte ve fyziologickém roztoku bakteriální suspenzi o 0,5 McFarland pro enterokoky a bakteriální suspenzi o 1,0 McFarland pro streptokoky.
- 4) Tuto suspenzi vlijte do sterilní Petriho misky.
- 5) Inokulujte rozplněnou destičku pomocí sterilního inokulátoru: inokulátor smočte v Petriho misce s etanolem a ožehněte nad plamenem. Vychladlý inokulátor smočte v Petriho misce s bakteriální suspenzí. Přeneste inokulum do 1. poloviny destičky jemným kroužením v jamkách. Opět smočte inokulátor v Petriho misce s bakteriální suspenzí a opakujte inokulaci 2. poloviny destičky.

B) Inokulace pipetou

- 1) Připravte zkumavku s 2 ml fyziologického roztoku.
- 2) Z 18 – 24 hodinové kultury na krevním agaru setřete několik kolonií a připravte ve fyziologickém roztoku bakteriální suspenzi o denzitě 0,5 McFarland.
- 3) Přeneste 60 µl z bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku do zkumavky s 13 ml suspenzního média MIC G+ a dobře homogenizujte.
- 4) Vyjměte destičku ze sáčku a sejměte fólii. Označte destičku typem soupravy (G+) a zaznamenejte číslo vyšetřované kultury. Rozplňte suspenzní médium MIC G+ s inokulem po 100 µl do každé jamky.

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. Po 24 hodinách inkubace je odečítán vankomycin u enterokoků.

Vyhodnocení:

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

- 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 systému Mikrola (fotometry Lisascan EM nebo Multiskan EX ve spojení s softwarem MIKROB AUTOMAT)

Prosím věnujte pozornost:

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

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

	1 PEN	2 AMP	3 ERY	4 CLI	5 LIZ	6 CMP	7 TET	8 T/S	9 GEN	10 VAN	11 TEC	12 NFT
A	8	16	8	16	16	32	32	4/76	128	16	16	128
B	4	8	4	8	8	16	16	2/38	16	8	8	64
C	2	4	2	4	4	8	8	1/19	8	4	4	32
D	1	2	1	2	2	4	4	0,5/9,5	4	2	2	16
E	0,5	1	0,5	1	1	2	2	0,25/4,75	2	1	1	8
F	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	1	1	0,12/2,38	1	0,5	0,5	4
G	0,12	0,25	0,12	0,25	0,25	0,5	0,5	0,06/1,19	0,5	0,25	0,25	2
H	0,06	0,12	0,06	0,12	0,12	0,25	0,25	0,03/0,6	0,25	0,12	0,12	K

Tab 2: Klinické breakpointy MIC (mg/l) pro streptokoky a enterokoky dle interpretačních tabulek EUCAST (1)

Antibiotikum	Zkratka	enterokoky			streptokoky		
		Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R
Penicilin	PEN	-	-	-	≤0,25 sk. A,B,C,G		≥0,5 sk. A,B,C,G
					≤0,06 S. pneumoniae	0,12-2 S. pneumoniae	≥4 S. pneumoniae
					≤0,05 S. pneumoniae (meningitida)		≥0,12 S. pneumoniae (meningitida)
Ampicilin	AMP	≤4	8	≥16	≤0,5 S. pneumoniae		≥4 S. pneumoniae
Erytromycin	ERY	-	-	-	≤0,25	0,5	≥1
Klindamycin	CLI	-	-	-	≤0,5		≥1
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤2	4	≥8
Chloramfenikol	CMP	-	-	-	≤8		≥16
Tetracyklin	TET	-	-	-	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfametoxazol	T/S	≤0,03/0,6	0,06/1,19-1/19	≥2/38	≤1/19	2/38	≥4/76
Gentamicin	GEN	≤128		≥256	-	-	-
Vankomycin	VAN	≤4		≥8	≤2		≥4
Teikoplanin	TEC	≤2		≥4	≤2		≥4
Nitrofurantoin	NFT	≤64 E. faecalis		≥128 E. faecalis	≤64 S. agalactiae		≥128 S. agalactiae

Tab 3: Klinické breakpointy MIC (mg/l) pro streptokoky a enterokoky dle dokumentu CLSI (2)

Antibiotikum	Zkratka	enterokoky			streptokoky		
		Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R	Citlivý S	Intermediární I	Rezistentní R
Penicilin	PEN	≤8		≥16	≤0,12 sk. A,B,C,G		- sk. A,B,C,G
					≤2 S. pneumoniae	4 S. pneumoniae	≥8 S. pneumoniae
						- S. pneumoniae (meningitida)	≥0,12 S. pneumoniae (meningitida)
Ampicilin	AMP	≤8		≥16			
Erytromycin	ERY	≤0,5	1-4	≥8	≤0,25	0,5	≥1
Klindamycin	CLI				≤0,25	0,5	≥1
Linezolid	LIZ	≤2	4	≥8	≤2		-
Chloramfenikol	CMP	≤8	16	≥32	≤4		≥8
Tetracyklin	TET	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfametoxazol	T/S				≤0,5/9,5 S. pneumoniae	1/19-2/38 S. pneumoniae	≥4/76 S. pneumoniae
Gentamicin	GEN	≤500		>500			
Vankomycin	VAN	≤4	8-16	≥32	≤1		-
Teikoplanin	TEC	≤8	16	≥32			
Nitrofurantoin	NFT	≤32	64	≥128			

Poznámky k interpretacím: Dle stanovené MIC se testovaný kmen řadí do kategorie citlivý – intermediární – rezistentní k danému antibiotiku na základě interpretačních tabulek EUCAST (1) nebo CLSI dokumentu M100-S24 (2).

Enterokoky: Ampicilin: Výsledky mohou být také použity pro amoxicilin, amoxicilin/klavulanát, ampicilin/subaktam, piperacilin, piperacilin/tazobaktam.

Streptokoky: Penicilin: U streptokoků A, B, C, G je citlivost k beta-laktámům (včetně ampicilinu) odvozena od citlivosti k penicilinu. Kmeny rezistentní k penicilinu nebyly popsány nebo jsou vzácné – tyto kmeny by měly být zaslány k potvrzení do referenční laboratoře. Beta hemolytické streptokoky neprodukují beta-laktamázu, kombinace s inhibitory proto neposkytuje žádný benefit. Breakpointy penicilinu jiných než je benzylpenicilin neplatí pro izoláty *S. pneumoniae* z meningitid. Erytromycin: Výsledek může být interpretován pro azitromycin, klaritromycin a roxitromycin. 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 citlivý s komentářem dle doporučení EUCAST (1) nebo jako rezistentní s komentářem dle doporučení CLSI (2). Teikoplanin: Rezistentní kmeny jsou vzácné, proto ověřte dalšími testy a v případě potvrzení rezistence zašlete do referenční laboratoře.

V závislosti na národních nebo laboratorních standardech je nutné použít další interpretační kritéria, např. EUCAST Expert rules (3) nebo CLSI dokument M100-S24 (2) a M07-A9 (4). Při interpretaci výsledků je třeba zohlednit druhovou identifikaci kmene, původ vzorku, anamnézu pacienta, případně výsledky doplňujících testů.

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

CCM 4224 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)											
MIC (mg/l)											
PEN 1-4	AMP 0,5-2	ERY 1-4	CLI 4-16	LIZ 1-4	CMP 4-16	TET 8-32	T/S ≤0,5/9,5	GEN 4-16	VAN 1-4	TEC 0,25-1	NFT 4-16

CCM 4501 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)											
MIC (mg/l)											
PEN 0,25-1	AMP 0,06-0,25	ERY 0,03-0,12	CLI 0,03-0,12	LIZ 0,25-2	CMP 2-8	TET 0,06-0,5	T/S 0,12/2,4-1/19	GEN -	VAN 0,12-0,5	TEC -	NFT 4-16

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 neobsahují nebezpečné látky.

Likvidace použitého materiálu: Po použití vložte destičku do nádoby pro infekční materiál a likvidujte dle vlastních interních předpisů, autoklavujte 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, version 4.0, 2014, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI dokument M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, Version 2.0 available from 29 Oct, 2011; <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI dokument M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012

Datum poslední revize: 16.12. 2015

Cat. N.: 10020300

For microbiology

The kit is designed to test antimicrobial susceptibility of enterococci and streptococci (gr. A, B, C, G and *S. pneumoniae*) 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 suspension medium and addition of bacterial suspension. The results are read visually or by reader after 16 - 20 hours of incubation.

The kit contains:

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

Storage and expiration of the kit:

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

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

- Suspension medium MIC G+ (cat. N. 10020338)
- Sterile physiological solution (unbuffered)
- Ethanol
- Sterile tubes
- Inoculator (Erba Lachema Cat. N. 50004456)
- Sterile Petri dishes
- Sterile basins 60 ml (Erba Lachema 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, Erba Lachema Cat. N. 50001529)
- 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+) to avoid mistake in reading results after incubation. Record number of examined strain on the plate. Fill 100 µl of suspension medium MIC G+ into each well.
- 2) Prepare a tube with 12 ml of physiological solution. When inoculating with an inoculator, add 100 µl of suspension medium MIC G+ 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 for enterococci and 1.0 on McFarland scale for streptococci 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+) 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.

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. The plate with enterococci 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 system Mikrola (photometers Lisascan EM or Multiskan EX in connection with software MIKROB AUTOMAT)

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/sulfamethoxazol, a well with ≥ 80% growth inhibition compared to the growth control is considered as MIC. Beware to differentiate grains of growth from media bubbles. Record the results.

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

	1 PEN	2 AMP	3 ERY	4 CLI	5 LIZ	6 CMP	7 TET	8 T/S	9 GEN	10 VAN	11 TEC	12 NFT
A	8	16	8	16	16	32	32	4/76	128	16	16	128
B	4	8	4	8	8	16	16	2/38	16	8	8	64
C	2	4	2	4	4	8	8	1/19	8	4	4	32
D	1	2	1	2	2	4	4	0.5/9.5	4	2	2	16
E	0.5	1	0.5	1	1	2	2	0.25/4.75	2	1	1	8
F	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	1	1	0.12/2.38	1	0.5	0.5	4
G	0.12	0.25	0.12	0.25	0.25	0.5	0.5	0.06/1.19	0.5	0.25	0.25	2
H	0.06	0.12	0.06	0.12	0.12	0.25	0.25	0.03/0.6	0.25	0.12	0.12	K

Tab 2: Clinical MIC breakpoints (in mg/l) for enterococci and streptococci according to EUCAST (1)

Antibiotics	Abbr.	enterococci			streptococci		
		Sensitive S	Intermediate I	Resistant R	Sensitive S	Intermediate I	Resistant R
Penicillin	PEN	-	-	-	≤0.25 gr. A,B,C,G		≥0.5 gr. A,B,C,G
					≤0.06 S. pneumoniae	0.12-2 S. pneumoniae	≥4 S. pneumoniae
					≤0.05 S. pneumoniae (meningitida)		≥0.12 S. pneumoniae (meningitida)
Ampicillin	AMP	≤4	8	≥16	≤0.5 S. pneumoniae		≥4 S. pneumoniae
Erythromycin	ERY	-	-	-	≤0.25	0.5	≥1
Clindamycin	CLI	-	-	-	≤0.5		≥1
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤2	4	≥8
Chloramphenicol	CMP	-	-	-	≤8		≥16
Tetracycline	TET	-	-	-	≤1	2	≥4
Trimethoprim / sulfamethoxazole	T/S	≤0.03/0.6	0.06/1.19-1/19	≥2/38	≤1/19	2/38	≥4/76
Gentamicin	GEN	≤128		≥256	-	-	-
Vancomycin	VAN	≤4		≥8	≤2		≥4
Teicoplanin	TEC	≤2		≥4	≤2		≥4
Nitrofurantoin	NFT	≤64 E. faecalis		≥128 E. faecalis	≤64 S. agalactiae		≥128 S. agalactiae

Tab 3: Clinical MIC breakpoints (in mg/l) for enterococci and streptococci according to CLSI (2)

Antibiotics	Abbr.	enterococci			streptococci		
		Sensitive S	Intermediate I	Resistant R	Sensitive S	Intermediate I	Resistant R
Penicillin	PEN	≤8		≥16	≤0.12 gr. A,B,C,G		- gr. A,B,C,G
					≤2 S. pneumoniae	4 S. pneumoniae	≥8 S. pneumoniae
						- S. pneumoniae (meningitida)	≥0.12 S. pneumoniae (meningitida)
Ampicillin	AMP	≤8		≥16			
Erythromycin	ERY	≤0.5	1-4	≥8	≤0.25	0.5	≥1
Clindamycin	CLI				≤0.25	0.5	≥1
Linezolid	LIZ	≤2	4	≥8	≤2		-
Chloramphenicol	CMP	≤8	16	≥32	≤4		≥8
Tetracycline	TET	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4
Trimethoprim / sulfamethoxazole	T/S				≤0.5/9.5 S. pneumoniae	1/19-2/38 S. pneumoniae	≥4/76 S. pneumoniae
Gentamicin	GEN	≤500		>500			
Vancomycin	VAN	≤4	8-16	≥32	≤1		-
Teicoplanin	TEC	≤8	16	≥32			
Nitrofurantoin	NFT	≤32	64	≥128			

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-S24 (2).

Enterococci: **Ampicillin:** Results can be also used for amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, ampicillin/sulbactam, piperacillin, piperacillin/tazobactam.

Streptococci: **Penicillin:** Susceptibility of streptococci gr. A, B, C, G to beta-lactams (including ampicillin) is inferred from the penicillin susceptibility. Strains resistant to penicillin are rare or not described – such strains should be referred to a reference laboratory. Beta hemolytic streptococci do not produce beta-lactamase, therefore their combination with inhibitors does not add any benefit. Breakpoints for penicillins other than benzylpenicillin relate only to non-meningitis isolates.

Erythromycin: Results can be interpreted for pro azithromycin, clarithromycin a roxithromycin.

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

Teicoplanin: If resistant confirm by another test and refer to a reference laboratory. Resistant strains are rare.

Other interpretative criteria have to be used depending on national and laboratory standards. EUCAST Expert rules 3 or CLSI documents M100-S24 (2) and M07-A9 (4). It is necessary to take into consideration following parameters when interpreting results: species identification, sample origin, patient case history, or results of additional tests.

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

CCM 4224 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)											
MIC (mg/l)											
PEN 1-4	AMP 0.5-2	ERY 1-4	CLI 4-16	LIZ 1-4	CMP 4-16	TET 8-32	T/S ≤0.5/9.5	GEN 4-16	VAN 1-4	TEC 0.25-1	NFT 4-16

CCM 4501 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)											
MIC (mg/l)											
PEN 0.25-1	AMP 0.06-0.25	ERY 0.03-0.12	CLI 0.03-0.12	LIZ 0.25-2	CMP 2-8	TET 0.06-0.5	T/S 0.12/2.4-1/19	GEN -	VAN 0.12-0.5	TEC -	NFT 4-16

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 do not contain any dangerous substances.

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, version 4.0, 2014, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI dokument M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, Version 2.0 available from 29 Oct. 2011; <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI dokument M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012

Date of last revision: 16.12. 2015

Nr kat.: 10020300

Do celów mikrobiologicznych

Zestaw przeznaczony jest do oznaczenia wrażliwości na antybiotyki bakterii z rodzajów *Enterococcus* i *Streptococcus* (gr. A, B, C, G, S. *pneumoniae*) 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 nośnika MIC G+ i dodaniu zawiesiny bakterii. Po 16-20 godzinach inkubacji wyniki odczytywane są wizualnie lub za pomocą czytnika.

Zestaw zawiera:

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

Przechowywanie i data ważności zestawu:

Zestaw zaleca się przechowywać w temperaturze +2 do +25 °C. Termin ważności podany jest na każdym opakowaniu. Po wyjęciu z lodówki należy płytki pozostawić na przez 2 godziny, żeby doprowadzić ich do temp. pokojowej celem ograniczenia skraplania wody. Po otwarciu aluminiowego opakowania i zdjęciu folii nie należy pozostawiać raz otwartą płytkę bez ochrony. Wilgoć w powietrzu zagraża funkcyjności antybiotyków !!!

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

- Roztwór sterylnej soli fizjologicznej (niebuforowanej)
- Nośnik zawiesiny MIC G+ (Erba Lachema nr kat. 10020338)
- Etanol
- Probówki sterylne
- Inokulator (Erba Lachema nr kat. 50004456)
- Sterylne płytki Petriego
- Sterylne wianki 60 ml (Erba Lachema nr kat. 50004457)
- Pipeta (dozator) na 100 µl lub wielokanałowa pipeta 100 µl
- Pipeta na 60-100 µl
- Densytmeter (np. DENSILAMETER II ERBA Lachema nr kat. 50001529)
- 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+), opisać numery badanych kultur. Pipetować do wszystkich studzienek po 100 µl nośnika zawiesiny MIC G+.
- 2) Przygotować próbkę z 12 ml sterylnej roztworu soli fizjologicznej (niebuforowanej). Podczas inokulacji dodać 100 µl nośnika zawiesiny MIC G+, 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 dla *Enterococcus spp.* i 1,0 McFarland dla *Streptococcus spp.*
- 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 wyzarzyć nad płomieniem. Ostygły inokulator nawilżyć w płycie Petriego z zawiesiną bakteryjną. Przenieść inokulum do pierwszej połowy płytki delikatnym krążeniem inokulatora w studzienkach. Ponownie nawilżyć inokulator w płycie Petriego i powtórzyć inokulację drugiej połowy płytki.

B) Inokulacja za pośrednictwem pipety

- 1) Przygotować próbkę z 2 ml sterylnej roztworu soli fizjologicznej.
- 2) Z 18 – 24 godzinnej kultury na agarze krwawym pobrać kilka kolonii i przygotować w roztworze soli fizjologicznej zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 McFarland.
- 3) Przenieść 60 µl z zawiesiny bakteryjnej w roztworze soli fizjologicznej (niebuforowanej) do próbki z 13ml nośnika zawiesiny MIC G+ 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+), opisać numery badanych kultur. Pipetować do wszystkich studzienek po 100 µl nośnika zawiesiny MIC G+ z inokulum.

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. Wankomycynę w przypadku rodzaju *Enterococcus* należy odczytywać po 24 godzinach inkubacji.

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

- 1/ odczytać za pomocą automatycznego systemu MIKROLA (fotometrów Lisascan EM, Multiskan EX w połączeniu z programem MIKROB AUTOMAT)
- 2/ odczytać wizualnie na szarym tle lub na tle tabelki płytki w instrukcji obsługi
- 3/ odczytać wizualnie na tle naturalnego lub sztucznego rozproszonego źródła światła
- 4/ użycie lupy nie zaleca się

Prosimy o zwrócenie uwagi:

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

Jako MIC ocenia się studzienkę z najniższym stężeniem antybiotyku, która zahamuje okiem widoczny wzrost bakterii. Tylko w przypadku Trimetoprimu/sulfamethoxazolu powinna być MIC odczytywana przy najniższym stężeniu, które hamuje wzrost ok. o ≥ 80% w porównaniu ze studzienką dla kontroli wzrostu. Należy odróżnić ziarnistość od ewentualnych pęcherzyków powietrza ! Wyniki wpisać do formularza.

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

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

	1 PEN	2 AMP	3 ERY	4 CLI	5 LIZ	6 CMP	7 TET	8 T/S	9 GEN	10 VAN	11 TEC	12 NFT
A	8	16	8	16	16	32	32	4/76	128	16	16	128
B	4	8	4	8	8	16	16	2/38	16	8	8	64
C	2	4	2	4	4	8	8	1/19	8	4	4	32
D	1	2	1	2	2	4	4	0,5/9,5	4	2	2	16
E	0,5	1	0,5	1	1	2	2	0,25/4,75	2	1	1	8
F	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	1	1	0,12/2,38	1	0,5	0,5	4
G	0,12	0,25	0,12	0,25	0,25	0,5	0,5	0,06/1,19	0,5	0,25	0,25	2
H	0,06	0,12	0,06	0,12	0,12	0,25	0,25	0,03/0,6	0,25	0,12	0,12	K

Tab 2: Breakpointy kliniczne MIC (mg/l) dla rodzajów *Streptococcus* i *Enterococcus* na podstawie EUCAST (1)

Antybiotyk	Skrót	enterokoky			streptokoky		
		Wrażli. S	Średniowrażliw. I	Oporny R	Wrażliwy S	Średniowrażliwy I	Oporny R
Penicylina	PEN	-	-	-	≤0,25 gr. A,B,C,G		≥0,5 gr. A,B,C,G
					≤0,06 S. pneumoniae	0,12-2 S. pneumoniae	≥4 S. pneumoniae
					≤0,05 S. pneumoniae (meningitida)		≥0,12 S. pneumoniae (meningitida)
Ampicylina	AMP	≤4	8	≥16	≤0,5 S. pneumoniae		≥4 S. pneumoniae
Erytromycyna	ERY	-	-	-	≤0,25	0,5	≥1
Klindamycyna	CLI	-	-	-	≤0,5		≥1
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤2	4	≥8
Chloramfenikol	CMP	-	-	-	≤8		≥16
Tetracyklina	TET	-	-	-	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfamethoxazol	T/S	≤0,03/0,6	0,06/1,19-1/19	≥2/38	≤1/19	2/38	≥4/76
Gentamycyna	GEN	≤128		≥256	-	-	-
Wankomycyna	VAN	≤4		≥8	≤2		≥4
Teicoplanina	TEC	≤2		≥4	≤2		≥4
Nitrofurantoina	NFT	≤64 E. faecalis		≥128 E. faecalis	≤64 S. agalactiae		≥128 S. agalactiae

Tab 3: Breakpointy kliniczne MIC (mg/l) dla rodzajów *Streptococcus* i *Enterococcus* na podstawie CLSI (2)

Antybiotyk	Skrót	enterokoky			streptokoky		
		Wrażli. S	Średniowrażliw. I	Oporny R	Wrażliwy S	Średniowrażliwy I	Oporny R
Penicylina	PEN	≤8		≥16	≤0,12 gr. A,B,C,G		- gr. A,B,C,G
					≤2 S. pneumoniae	4 S. pneumoniae	≥8 S. pneumoniae
						- S. pneumoniae (meningitida)	≥0,12 S. pneumoniae (meningitida)
Ampicylina	AMP	≤8		≥16			
Erytromycyna	ERY	≤0,5	1-4	≥8	≤0,25	0,5	≥1
Klindamycyna	CLI				≤0,25	0,5	≥1
Linezolid	LIZ	≤2	4	≥8	≤2		-
Chloramfenikol	CMP	≤8	16	≥32	≤4		≥8
Tetracyklina	TET	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfamethoxazol	T/S				≤0,5/9,5 S. pneumoniae	1/19-2/38 S. pneumoniae	≥4/76 S. pneumoniae
Gentamycyna	GEN	≤500		>500			
Wankomycyna	VAN	≤4	8-16	≥32	≤1		-
Teicoplanina	TEC	≤8	16	≥32			
Nitrofurantoina	NFT	≤32	64	≥128			

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-S24 (2).

Enterococcus: Ampicylina: Wyniki można użyć także dla amoksyliny, amoksyliny/kwasu klawulanowego, ampicyliny/sulbaktamu, piperacyliny, piperacyliny/tazobaktamu.

Streptokoky:

Penicylina: Wrażliwość na beta-laktamy (łącznie z ampicyliną) wywodzi się z wrażliwości na penicylinę dla streptokoky A, B, C, G. Szczepy odporne na penicylinę nie zostały opisane lub są rzadkie – szczepy te powinno się wysłać do potwierdzenia do laboratorium referencyjnego. Beta hemolityczne paciorkowce nie wytwarzają beta-laktamazy, kombinacja z inhibitorami dlatego nie oferują żadnej korzyści. Breakpointy kliniczne dla penicyliny innych niż benzylpenicyliny odnoszą się tylko do izolatów które nie pochodzą z zapalenia opon mózgowych.

Erytromycyna: Wynik może być interpretowany dla azitromycyny, klaritromycyny i roksytromycyny.

Klindamycyna: W przypadku jednoczesnej oporności na erytromycynę i wrażliwości na klindamycynę (lub klindamycyna średniowrażliwa) należy określić indukcję 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 klindamycynowrażliwy z komentarzem zgodnie z zaleceniem EUCAST (1) lub jako oporny z komentarzem zgodnie z zaleceniami CLSI (2).

Teicoplanina: Oporne szczepy są rzadkie, dlatego należy weryfikować kolejnym testem i w przypadku potwierdzenia odesłać do laboratorium referencyjnego.

W zależności od krajowych lub laboratoryjnych standardów można użyć kolejne kryteria interpretacyjne. np. EUCAST Expert rules (3), dokument CLSI M100-S24 (2) ai M07-A9 (4). 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 szczepy kontrolne. Podczas oceny wyników testowania szczepami kontrolnymi należy kierować się standardem EUCAST lub CLSI.

CCM 4224 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)												
MIC (mg/l)												
PEN	AMP	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	T/S	GEN	VAN	TEC	NFT	
1-4	0,5-2	1-4	4-16	1-4	4-16	8-32	≤0,5/9,5	4-16	1-4	0,25-1	4-16	

CCM 4501 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)												
MIC (mg/l)												
PEN	AMP	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	T/S	GEN	VAN	TEC	NFT	
0,25-1	0,06-0,25	0,03-0,12	0,03-0,12	0,25-2	2-8	0,06-0,5	0,12/2,4-1/19	-	0,12-0,5	-	4-16	

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: Składniki zestawu nie zawierają substancji niebezpiecznych.

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, version 4.0, 2014, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI dokument M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, Version 2.0 available from 29 Oct, 2011; <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI dokument M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012

Data ostatniej rewizji: 16.12.2015

Номер в каталоге №: 10020300

Для микробиологических исследований

Набор предназначен для определения чувствительности энтерококков и стрептококков (гр. А, В, С, G, *S. pneumoniae*) 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 суспензионной среды и внесении в лунки планшета бактериальной культуры. Результаты определения чувствительности можно учесть 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.

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:

- Суспензионная среда MIC G+ /МПК Г+/ (номер в каталоге № 10020338)
- Стерильный физиологический раствор (небуферизованный)
- Этанол
- Стерильные пробирки
- Инокулятор
- Стерильные чашки Петри
- Стерильные ёмкости
- Степпер или многоканальная пипетка до 100 мкл
- Пипетка с диапазоном дозирования 60 – 100 мкл
- Денситометр (напр.: ДЕНСИЛАМЕТЕР II, Erba Lachema номер в каталоге № 50001529)
- 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):

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.: G+) 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 G+ для уменьшения поверхностного натяжения.
- 3) Приготовьте бактериальную суспензию с мутностью 0,5 по МакФарланду для энтерококков и с мутностью 1,0 по МакФарланду для стрептококков 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 инокулом 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 60 мкл бактериальной суспензии в пробирку с 13 мл суспензионной среды MIC G+, тщательно перемешайте.
- 4) Достаньте планшет из индивидуальной алюминиевой упаковки и удалите алюминиевое покрытие с поверхности. Нанесите маркировку о типе планшета (напр.: G+) 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 G+.

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. Для учёта результатов определения чувствительности к ванкомицину инкубируйте не менее 24 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 (фотометры LisaScan EM или Multiskan EX в комплекте с программным обеспечением МИКРОБ АВТОМАТ)

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

Таблица 2: Клинические критерии оценки МПК (мг/л) для энтерококков и стрептококков на критериях EUCAST (1)

Антибиотики	Аббр.	Энтерококки			Стрептококки		
		Чувствительный S	Умеренно-резистентный I	Резистентный R	Чувствительный S	Умеренно-резистентный I	Резистентный R
Penicillin	PEN	-	-	-	≤0,25 гр. A,B,C,G	0,12-2 S. pneumoniae	≥0,5 гр. A,B,C,G
					≤0,06 S. pneumoniae		≥4 S. pneumoniae
					≤0,05 S. pneumoniae (менингит)		≥0,12 S. pneumoniae (менингит)
Ampicillin	AMP	≤4	8	≥16	≤0,5 S. pneumoniae	≥4 S. pneumoniae	
Erythromycin	ERY	-	-	-	≤0,25	0,5	≥1
Clindamycin	CLI	-	-	-	≤0,5		≥1
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤2	4	≥8
Chloramphenicol	CMP	-	-	-	≤8		≥16
Tetracycline	TET	-	-	-	≤1	2	≥4
Trimethoprim / sulfamethoxazole	T/S	≤0,03/0,6	0,06/1,19-1/19	≥2/38	≤1/19	2/38	≥4/76
Gentamicin	GEN	≤128		≥256	-	-	-
Vancomycin	VAN	≤4		≥8	≤2		≥4
Teicoplanin	TEC	≤2		≥4	≤2		≥4
Nitrofurantoin	NFT	≤64 E. faecalis		≥128 E. faecalis	≤64 S. agalactiae		≥128 S. agalactiae

Таблица 3: Клинические критерии оценки МПК (мг/л) для энтерококков и стрептококков на критериях CLSI (2)

Антибиотики	Аббр.	Энтерококки			Стрептококки		
		Чувствительный S	Умеренно-резистентный I	Резистентный R	Чувствительный S	Умеренно-резистентный I	Резистентный R
Penicillin	PEN	≤8		≥16	≤0,12 гр. A,B,C,G	4 S. pneumoniae	- гр. A,B,C,G
					≤2 S. pneumoniae		≥8 S. pneumoniae
					- S. pneumoniae (менингит)		≥0,12 S. pneumoniae (менингит)
Ampicillin	AMP	≤8		≥16			
Erythromycin	ERY	≤0,5	1-4	≥8	≤0,25	0,5	≥1
Clindamycin	CLI				≤0,25	0,5	≥1
Linezolid	LIZ	≤2	4	≥8	≤2		-
Chloramphenicol	CMP	≤8	16	≥32	≤4		≥8
Tetracycline	TET	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4
Trimethoprim / sulfamethoxazole	T/S				≤0,5/9,5 S. pneumoniae	1/19-2/38 S. pneumoniae	≥4/76 S. pneumoniae
Gentamicin	GEN	≤500		>500			
Vancomycin	VAN	≤4	8-16	≥32	≤1		-
Teicoplanin	TEC	≤8	16	≥32			
Nitrofurantoin	NFT	≤32	64	≥128			

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-S24 (2).

Энтерококки:

Ампициллин: результаты тестирования ампициллина соответствуют данным о чувствительности бактериальной культуры к амоксициллину, амоксициллину/клавуланату, ампициллину, сульбактаму, пиперациллину, пиперациллину/тазобактаму.

Стрептококки групп A, B, C, G:

Пенициллин: чувствительность к бета-лактамам (включая ампициллин) для стрептококки групп A, B, C, G определяется по наличию чувствительности к пенициллину. Штаммы, резистентные к пенициллину встречаются чрезвычайно редко, а для некоторых видов даже не описаны. При выявлении такого штамма в Вашей лаборатории следует отправить его в референсную лабораторию. Бета-гемолитические стрептококки не продуцируют бета-лактамазы, поэтому использование бета-лактамов в комбинации с ингибиторами бета-лактамаз влияет на эффективность лечения.

Эритромицин: результаты тестирования эритромицина соответствуют данным о чувствительности бактериальной культуры к азитромицину, кларитромицину и рокситромицину.

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-S24 (2).

Тейкопанин: если выявлена резистентность, подтвердите с использованием других методов и отправьте в референсную лабораторию. Штаммы стрептококков, резистентные к тейкопанину встречаются чрезвычайно редко.

Другие критерии интерпретации должны быть основаны на национальных лабораторных стандартах, например: EUCAST Expert rules (3), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing CLSI M100-S24 (2) и M07-A9 (4). При необходимости следует принять во внимание при интерпретации результатов следующие параметры: вид бактерий, тип биоматериала, особенности анамнеза пациента, а также результаты дополнительных исследований.

Контроль качества:

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

CCM 4224 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) МПК (мг/л)												
PEN	AMP	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	T/S	GEN	VAN	TEC	NFT	
1-4	0,5-2	1-4	4-16	1-4	4-16	8-32	≤0,5/9,5	4-16	1-4	0,25-1	4-16	

CCM 4501 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619) МПК (мг/л)												
PEN	AMP	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	T/S	GEN	VAN	TEC	NFT	
0,25-1	0,06-0,25	0,03-0,12	0,03-0,12	0,25-2	2-8	0,06-0,5	0,12/2,4-1/19	-	0,12-0,5	-	4-16	

ATCC – American Type Culture Collection / Американская Коллекция Типовых Культур

CCM – Чешская коллекция микроорганизмов

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

Охрана здоровья: В содержимом упаковки нет опасных веществ.

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, version 4.0, 2014, <http://www.eucast.org>
- (2) CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- (3) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, Version 2.0 available from 29 Oct, 2011; <http://www.eucast.org>
- (4) CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012

Дата последнего обновления: 16.12.2015

Kat. č.: 10020300

Pre mikrobiológiu

Súprava je určená na stanovenie citlivosti enterokokov a streptokokov (sk. A, B, C, G, *S. pneumoniae*) k antibiotikám na základe determinácie MIC (minimálnej inhibičnej koncentrácie), tzn. najnižšej koncentrácie, ktorá zabráni viditeľnému rastu baktérií. Obsahuje 10 stanovení.

Princípom testu je rehydratácia antibiotík v jamkách pomocou MIC G+ média a prídania bakteriálnej suspenzie. Po 16 – 20 hodinovej inkubácii sú výsledky odčítané vizuálne.

Súprava obsahuje:

- 10 vyšetrovacích doštičiek
- 1 viečko (nesterilné)
- 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
- Suspenzné médium MIC G+ (Erba Lachema, kat. č. 10020337)
- Etanol
- Sterilné skúmavky
- Inokulátor (Erba Lachema, kat. č. 50004456)
- Sterilné Petriho misky
- Sterilné vaničky 60 ml (Erba Lachema, kat. č. 50004457)
- Krokovacia pipeta na 100 µl alebo multikanólová pipeta 100 µl
- Pipeta na 60-100 µl
- Denzitometer (napr. DENSILAMETER II, Erba Lachema kat. č. 50001529)
- Inkubátor 35±2 °C
- Bežné laboratórne vybavenie (kľučky, popisovače, kahan, atd.)

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

Pracovný postup

Príprava bakteriálnej suspenzie a inokulácia:

A) Inokulácia inokulátorom:

- 1) Vyberte doštičku z alumíniového sáčku a odstráňte fóliu. Označte doštičku typom súpravy (G+). Zaznamenajte číslo vyšetrovanej kultúry na príslušnú doštičku. Rozpipetujte do všetkých jamiek doštičky po 100 µl suspenzného média MIC G+.
- 2) Pripravte skúmavku s 12 ml fyziologického roztoku. Prídajte 100 µl suspenzného média MIC G+, 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 pre enterokokov a 1,0 McFarland pre streptokokov.
- 4) Túto suspenziu vlejte do sterilnej Petriho misky.
- 5) Inokulujte rozplnenú doštičku pomocou sterilného inokulátora: inokulátor namočte v Petriho miske s etanolom a opáľte nad plameňom. Vychladnutý inokulátor namočte v Petriho miske s bakteriálnou suspenziou. Preneste inokulum do 1. polovičky doštičky jemným krúžením v jamkách. Znova namočte inokulátor v Petriho miske s bakteriálnou suspenziou a opakujte inokuláciu 2. polovičky doštičky.

B) Inokulácia pipetou:

- 1) Pripravte skúmavku s 2 ml fyziologického roztoku.
- 2) Z 18 – 24 hodinovej kultúry na krvnom agare zoberte niekoľko kolónií a pripravte vo fyziologickom roztoku bakteriálnu suspenziu s hustotou 0,5 McFarland.
- 3) Z bakteriálnej suspenzie vo fyziologickom roztoku preneste 60 µl do skúmavky s 13 ml suspenzného média MIC G+ a dobre homogenizujte.
- 4) Vyberte doštičku z alumíniového sáčku a odstráňte fóliu. Označte doštičku typom súpravy (G+). Zaznamenajte číslo vyšetrovanej kultúry na príslušnú doštičku. Rozplňte suspenzné médium MIC G+ s inokulum po 100 µl do každej jamky doštičky.

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. Po 24 hodinách inkubácie je odčítaný vankomycin u enterokokov.

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 systému Mikrola (fotometre Lisascan EM alebo Multiskan EX v spojení so softwermom MIKROB AUTOMAT)

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. Odlište zrnenie od prípadných bublín! Výsledky zaznamenajte.

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

	1 PEN	2 AMP	3 ERY	4 CLI	5 LIZ	6 CMP	7 TET	8 T/S	9 GEN	10 VAN	11 TEC	12 NFT
A	8	16	8	16	16	32	32	4/76	128	16	16	128
B	4	8	4	8	8	16	16	2/38	16	8	8	64
C	2	4	2	4	4	8	8	1/19	8	4	4	32
D	1	2	1	2	2	4	4	0,5/9,5	4	2	2	16
E	0,5	1	0,5	1	1	2	2	0,25/4,75	2	1	1	8
F	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	1	1	0,12/2,38	1	0,5	0,5	4
G	0,12	0,25	0,12	0,25	0,25	0,5	0,5	0,06/1,19	0,5	0,25	0,25	2
H	0,06	0,12	0,06	0,12	0,12	0,25	0,25	0,03/0,6	0,25	0,12	0,12	K

Tab 2: Číselné vyjadrenie MIC v mg/l pre steptokoky a enterokoky podľa EUCAST (1)

Antibiotikum	Skratka	enterokoky			streptokoky		
		Citlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R	Citlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R
Penicilín	PEN	-	-	-	≤0,25 sk. A,B,C,G		≥0,5 sk. A,B,C,G
					≤0,06 S. pneumoniae	0,12-2 S. pneumoniae	≥4 S. pneumoniae
					≤0,05 S. pneumoniae (meningitída)		≥0,12 S. pneumoniae (meningitída)
Ampicilín	AMP	≤4	8	≥16	≤0,5 S. pneumoniae		≥4 S. pneumoniae
Erytromycín	ERY	-	-	-	≤0,25	0,5	≥1
Klindamycín	CLI	-	-	-	≤0,5		≥1
Linezolid	LIZ	≤4		≥8	≤2	4	≥8
Chloramfenikol	CMP	-	-	-	≤8		≥16
Tetracyklín	TET	-	-	-	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfametoxazol	T/S	≤0,03/0,6	0,06/1,19-1/19	≥2/38	≤1/19	2/38	≥4/76
Gentamicín	GEN	≤128		≥256	-	-	-
Vankomycín	VAN	≤4		≥8	≤2		≥4
Teikoplanín	TEC	≤2		≥4	≤2		≥4
Nitrofurantoin	NFT	≤64 E. faecalis		≥128 E. faecalis	≤64 S. agalactiae		≥128 S. agalactiae

Tab 3: Číselné vyjadrenie MIC v mg/l pre steptokoky a enterokoky podľa CLSI (2)

Antibiotikum	Skratka	enterokoky			streptokoky		
		Citlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R	Citlivý S	Intermediárny I	Rezistentný R
Penicilín	PEN	≤8		≥16	≤0,12 sk. A,B,C,G		- sk. A,B,C,G
					≤2 S. pneumoniae	4 S. pneumoniae	≥8 S. pneumoniae
						- S. pneumoniae (meningitída)	≥0,12 S. pneumoniae (meningitída)
Ampicilín	AMP	≤8		≥16			
Erytromycín	ERY	≤0,5	1-4	≥8	≤0,25	0,5	≥1
Klindamycín	CLI				≤0,25	0,5	≥1
Linezolid	LIZ	≤2	4	≥8	≤2		-
Chloramfenikol	CMP	≤8	16	≥32	≤4		≥8
Tetracyklín	TET	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4
Trimetoprim / sulfametoxazol	T/S				≤0,5/9,5 S. pneumoniae	1/19-2/38 S. pneumoniae	≥4/76 S. pneumoniae
Gentamicín	GEN	≤500		>500			
Vankomycín	VAN	≤4	8-16	≥32	≤1		-
Teikoplanín	TEC	≤8	16	≥32			
Nitrofurantoin	NFT	≤32	64	≥128			

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-S24 (2).
Enterokoky: Ampicilín: Výsledky môžu byť taktiež pre amoxicilín, amoxicilín/klavulanát, ampicilín/sulbaktam, piperacilín, piperacilín/tazobaktam.

Streptokoky:

Penicilín: Citlivosť k beta-laktámom (vrátane ampicilínu) pre sk. A, B, C, G je odvodená od citlivosti k penicilínu. Kmene rezistentné k penicilínu neboli popísané alebo sú vzácne – tieto kmene by mali byť zaslané na potvrdenie do referenčného laboratória. Beta hemolytické streptokoky neprodukujú beta-laktamázu, kombinácia s inhibítormi preto neposkytuje žiadny benefit.

Erytromycín: Výsledok môže byť interpretovaný pre azitromycín, klaritromycín a roxitromycín.

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 citlivý s komentárom podľa doporučenia EUCAST (1) alebo ako rezistentný s komentárom podľa doporučenia CLSI (2).

Teikoplanín: Rezistentné kmene sú vzácne, preto overte ďalším testom a v prípade potvrdenia rezistencie zašlite do referenčného laboratória.

V závislosti od národných alebo laboratorných štandardov je možné použiť ďalšie interpretačné kritériá, napr. EUCAST Expert rules (3), alebo CLSI dokumenty M100-S24 (2) a M07-A9 (4). Pri interpretácii výsledkov je potrebné zohľadniť druhovú identifikáciu kmeňa, pôvod vzorky, anamnézu pacienta, prípadne výsledky doplnujúcich testov.

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

CCM 4224 <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)											
MIC (mg/l)											
PEN	AMP	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	T/S	GEN	VAN	TEC	NFT
1-4	0,5-2	1-4	4-16	1-4	4-16	8-32	≤0,5/9,5	4-16	1-4	0,25-1	4-16

CCM 4501 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)											
MIC (mg/l)											
PEN	AMP	ERY	CLI	LIZ	CMP	TET	T/S	GEN	VAN	TEC	NFT
0,25-1	0,06-0,25	0,03-0,12	0,03-0,12	0,25-2	2-8	0,06-0,5	0,12/2,4-1/19	-	0,12-0,5	-	4-16

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 neobsahujú nebezpečné látky.

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

Prázdne papierové obaly sa odovzdávajú do zberu na recykláciu.

Literatúra:

- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters, version 4.0, 2014. <http://www.eucast.org>
- CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI dokument M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, Version 2.0 available from 29 Oct, 2011; <http://www.eucast.org>
- CLSI: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI dokument M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012

Dátum poslednej revízie: 16.12.2015