

ИНСТРУКЦИЯ на планшеты SENSITITRE®
для определения чувствительности к антибиотикам
для быстрорастущих микобактерий, медленно растущих
нетуберкулезных микобактерий, нокардий и других
аэробных актиномицетов

Определение чувствительности быстрорастущих микобактерий, включая

Mycobacterium fortuitum (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* третий биовариантный комплекс), *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. mucogenicum* и *M. smegmatis* (*M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*).

Nocardia spp и другие аэробные актиномицеты.

Медленнорастущие нетуберкулезные микобактерии, например, *Mycobacterium avium* комплекс, *Mycobacterium kansasii* и *Mycobacterium marinum*.

Принципы использования

Каждый планшет содержит лунки с антибиотиками в лиофилизированном виде в необходимых концентрациях. Результаты можно считывать вручную, визуально фиксируя рост на планшете.

Предосторожности

Только обученный персонал допускается к выполнению такого типа процедур. В лаборатории должны быть инструкции по технике безопасности при работе с микобактериями.

Хранение и сроки годности

Планшеты необходимо хранить при комнатной температуре (15-25°C) вдали от прямых солнечных лучей и источников тепла. Каждый планшет индивидуально упакован и содержит силикагель. Если гель изменил цвет или повреждена упаковка, то планшет нельзя использовать. Планшеты необходимо использовать до даты, указанной на упаковке. Не используйте планшеты, если срок годности истек или заметны нарушения упаковки. Произведите посев на планшет в течение 5 часов после его распаковки.

Процедура

Состав упаковки:

- Планшеты (10 шт. в индивидуальных упаковках – кат.номера SLOMYCOI или RAPMYCOI)
- Клейкая запаивающая пленка

Необходимые расходные материалы, не входящие в набор с планшетами:

- Деминерализованная стерильная вода [кат. номер 3339]
- Катионный питательный бульон Мюллера-Хинтона с TES буфером (CAMHBT) [кат.номер T3462]
- Катионный питательный бульон Мюллера-Хинтона с OADC [кат. номер T8005]

- Дозирующие насадки Sensititre для использования с автоматическим автоинокулятором [кат.номер E3010]
- Автоматический автоинокулятор Sensititre [кат.номер V3010]
- Модуль Sensititre Vizion [кат.номер V2020]
- Модуль для определения плотности Sensititre Nephelometer [V3011]
- Камера для визуального считывания результатов [кат.номер V4007]
- Стандарт оптической плотности 0,5 по МакФарланду [кат.номер E1041]
- Дозаторы на 50 и 100 мкл и одноразовые наконечники для дозаторов
- Контрольные штаммы для постановки контроля
- Чашки с агаризированной средой
- Термостат 30-35⁰С, без содержания СО₂ в атмосфере
- Вортекс
- Деминерализованная вода со стеклянными бусинами

Сбор и подготовка образцов

Образцы должны собираться, транспортироваться, храниться и высеваться на среду для получения изолированных колоний в соответствие со стандартными процедурами [1,8].

Выбор питательного бульона на чувствительность

Бульон для быстрорастущих микобактерий - T3462 Среда Мюллера-Хинтона с TES, 100 пробирок по 11 мл

Бульон для медленно растущих микобактерий - T8006 Среда Мюллера-Хинтона с OADC (10 пробирок по 10 мл)

Производитель рекомендует использовать с планшетами Sensititre только питательные бульоны Sensititre, разработанные с учетом всех методик.

Посев и инкубация

Быстрорастущие микобактерии, *Nocardia spp* и другие аэробные Актиномицеты

1. Отберите сливающиеся в росте колонии с агаризированной среды при помощи тампона. Приготовьте суспензию в стерильной воде и доведите ее до стандарта оптической плотности 0,5 по МакФарланду визуально или используя нефелометр. Если частицы видимы, то перемешивайте тщательнее. Актиномицеты обычно образуют твердые сухие колонии. Для таких случаев рекомендуется использовать перемешивание со стеклянными бусинами, чтобы получить гомогенную суспензию.

Если после перемешивания остался осадок, то рекомендуется отобрать супернатант и использовать его для посева.

Увлажнение тампона стерильной водой может способствовать получению более гомогенизированной суспензии.

Предупреждение: использование стерильной воды с TWEEN может повлиять на МИК (минимальную ингибирующую концентрацию).

2. Перенесите **50 мкл** полученной суспензии в пробирку с катионным питательным бульоном Мюллера-Хинтона с TES буфером (Т3462) для получения суспензии в концентрации 5×10^5 КОЕ/мл (от 1×10^5 до 1×10^6 КОЕ/мл). Хорошо перемешайте.

Шаги 1 и 2 должны быть выполнены в течение 30 минут.

3. Лунки планшетов, содержащие концентрации ≥ 32 мкг/мл доксициклина или миноциклина, могут показать осадок после инкубации. Это явление можно предотвратить добавлением 5 мкл стерильной воды в данные ячейки до добавления питательного бульона с культурой.
4. Перенесите в лунки планшета **100 мкл** конечной суспензии одним из способов:

а. **Автоинкулятор.** Поместите пробирку с одноразовой дозирующей насадкой в держатель и произведите посев на планшет согласно инструкции к автоинкулятору.

б. **Ручной дозатор.** Перелейте суспензию в стерильную емкость типа ванночки и посеьте на планшет с помощью дозатора.

Рекомендуется периодически осуществлять поверку и калибровку дозаторов.

Выполните посев на планшеты в течение 30 минут.

5. Периодически проводите подсчет колоний из контрольных лунок с положительным ростом. Образцы для подсчета культур должны быть посеяны в концентрации 5×10^5 КОЕ/мл (диапазон от 1×10^5 КОЕ/мл до 1×10^6 КОЕ/мл).
6. Аккуратно заклейте планшет пленкой. Плотнo прижмите пленку к лункам, чтобы убедиться в том, что все они закрыты. Избегайте складок, это может привести к утечке.
7. Инкубируйте быстрорастущие микобактерии аэробно при температуре 30°C в инкубаторе без CO₂ в течение 72 часов. Проверяйте рост в лунках. Если рост слабый, то продлите инкубацию еще на 48 часов. *Nocardia* spp и другие аэробные актиномицеты инкубируйте при 35°C в термостате без CO₂ в течении 2-3 дней.

Рекомендуется ставить планшеты в стойки по 3 штуки.

Инкубация до 4-5 дней может потребоваться для культур *M. chelonae* и *M. abscessus*.

Медленнорастущие нетуберкулезные микобактерии

Соблюдайте рекомендации, описанные выше, за исключением переноса 50 мкл суспензии микроорганизмов в 10 мл питательного бульона Мюллера-Хинтона с 5% OADC ростовой добавкой (T8006). Встряхните пробирку 8-10 раз.

Инкубируйте планшеты при 35°C в термостате без CO₂ и считывайте по истечении 7 дней. Если наблюдается хороший рост в положительной контрольной пробирке, то можно считывать результаты. В противном случае продлите инкубацию до **14 дней**. Для продления инкубации необходимо принять меры, чтобы содержимое лунок не высыхало, что может привести к гибели микроорганизмов. Поместите планшеты в пластиковый контейнер с приоткрытой крышкой, способствуя газообмену.

Считывание результатов

Результаты могут быть прочитаны при помощи модуля Sensititre Vizion или камеры для ручного считывания.

Для считывания не нужно снимать запаивающую пленку. Поместите планшет со штрих-кодом лицевой стороной к пользователю. Рост проявляется как помутнение или как осадок клеток на дне ячейки. МИК - это самая низкая концентрация антибиотика, которая ингибирует (подавляет) видимый рост. Чтобы улучшить просмотр результатов в камере необходимо считывать планшет на темном фоне под ярким непрямым светом.

Лунки с положительным контролем должны просматриваться в первую очередь. Если в какой-то из лунок не наблюдается роста, то результаты неверны.

Полученные результаты (МИКи) может быть сложно интерпретировать. CLSI (NCCLS) стандарт M 24-A предоставляет указания для считывания результатов и примеры иллюстраций роста.

Так называемые негативные лунки (отсутствие роста) могут содержать осадок инокулята (раскапываемой суспензии). Чтение результатов контрольных штаммов с известными МИК должно использоваться для тренировки.

Рост может наблюдаться в диапазоне от нескольких колоний без помутнения до значительного роста сопоставимого с ростом в контрольных лунках (положительный контроль).

МИК – это минимальные концентрации, которые полностью ингибируют рост, исключение составляют сульфонамиды (сульфаниламиды), у которых МИК считается наименьшей концентрацией, которая ингибирует 80% роста по сравнению с положительным контролем.

На что нужно обращать внимание!:

а. Контаминация.

Контаминация возможна в случае фиксации роста в лунке, граничащей с лунками без роста. Такая единичная контаминация может не приниматься во внимание, но если обнаружена множественная контаминация в лунках, то исследование необходимо повторить заново.

б. Пропуск.

«Пропуск» хорошо виден при отсутствии роста в лунках, где рост должен быть (лунка без роста). Могут быть различные объяснения данного явления, включая контаминацию, мутацию, складка на пленке или неправильная дозировка. Единичные пропуски роста могут не приниматься во внимание. Однако, чтобы быть уверенным в эффективности антимикробной терапии НИКОГДА не читайте пропуски роста так же, как МИК.

с. Смешанные культуры.

Исключать, как говорилось ранее в пункте а, если два конечных результата видимы как небольшое число «округлых» клеток из разных пробирок с клетками другой формы (или совсем небольшие округлые клетки), это может быть смешанная бактериальная культура. Чистота может быть проверена субкультивированием на подходящей агаризованной среде. Результаты теста неверны, если обнаружены смешанные культуры.

За исключением упомянутого в пункте а. замечания, если в двух конечных лунках замечен рост (осадок клеток круглой формы в виде «кнопки») и эти лунки сопровождаются несколькими лунками с разбросанным ростом (не «кнопка»), то это может означать наличие смешанной культуры. Чистота культуры должна быть проверена с помощью субкультивирования на среду. Результаты исследования неверны, если обнаружена смешанная культура.

Контроль качества

Частота выполнения контроля качества должна быть установлена в каждой лаборатории согласно внешним и внутренним стандартам. Инокулят (подготовленная суспензия) рекомендуется высевать на среду для проверки чистоты культуры. Исследование проведено неверно, если обнаруживается смешанная культура.

Все планшеты Sensititre содержат лунки с положительным контролем. Исследование проведено неверно, если нет хорошо фиксируемого роста в контрольных лунках.

Ряд факторов влияет на МИК, например состояние микроорганизмов, плотность суспензии, температура и питательный бульон.

Исследование выполнено верно, если МИК контрольных штаммов лежит в пределах диапазона, указанного в стандарте. Не рекомендуется выдавать результаты исследований, если результаты контроля качества выходят за рамки диапазонов, указанных в стандарте.

В Таблица №1 представлены диапазоны контроля качества (испытания производителя) с использованием штаммов микобактерий ATCC .

До того, как будут получены иные данные, рекомендуется пользоваться следующими диапазонами для *S.aureus* ATCC 29213 и других нетуберкулезных микобактерий (CLSI (NCCLS) документ M100 (2)) для контроля качества.

По стандарту CLSI (NCCLS) M100 для контрольных штаммов следует использовать те же рекомендации по посеву быстрорастущих микобактерий, за исключением небольших изменений. Нужно добавить 50 мкл суспензии к питательному бульону Мюллера-Хинтона с TES буфером. Не рекомендуется использовать питательный бульон с добавкой OADC. Планшеты следует считывать по истечении 18-24 часов инкубации при температуре 35°C.

Таблица 1: Контрольные диапазоны для штамма *S.aureus* ATCC 29213 (испытания ТРЕК).

Антибиотик	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>M.peregrinum</i> ATCC 700686	<i>M.smegmatis</i> ATCC 19420	<i>M.avium</i> ATCC 700898
Амикацин	1-4*	≤ 1-4*	0.12-0.5	2-16
Капреомицин	-	1,25-10	1.25-5	5-40
Цефокситин	1-4*	4-32*	-	-
Ципрофлоксацин	0,12-0,5*	≤ 0,12-0,5*	0.25-1**	-
Кларитромицин	0,12-0,5*	≤ 0,06-0,5*	-	-
Клофазимин	-	0,25-1	0.12-0.5	-
Доксициклин	0,12-0,5*	0,12-0,5*	-	-
Этамбутол	-	2-16	-	2-16
Этионамид	-	> 20	20-80***	1.25-10
Гатифлоксацин	0,03-0,12	≤ 0.12**	≤ 0.12**	-
Имипенем	0,015-0,06*	2-16*	-	-
Изониазид	-	-	1-4	>4

Канамицин	1-4	1.25-10	≤ 0.06	1.25-10
Левифлоксацин	0,06-0,5	0.12-0.5	0.12-0.5***	-
Линезолид	1-4*	1-8	-	-
Меропенем	0,03-0,12*	2-16	-	-
Моксифлоксацин	-	-	-	0.5-4
Офлоксацин	0,12-1	$\leq 0.25-0.5$	0.25-1	-
Рифабутин (анзамицин)	-	1-8	1-4	-
Рифампицин	0,004-0,016	8-64	>16	2-16 (инкубация $\leq$ 10 дней) 4-32 (инкубация >10 дней)
Стрептомицин	-	16-64	0.5-2	4-32
Сульфаметоксазол	32-128* ²	$\leq 1-4^*$	-	-
Тетрациклин	0,12-1	-	-	-
Тобрамицин	0,12-1*	2-8*	-	-
Триметоприм/ сульфаметоксазол	$\leq 0,5/9,5^*$	-	-	0,25/4,8-2/38

Примечания: ¹ Диапазоны, основанные на исследованиях компании ТРЕК

² МИК диапазон только для комбинации сульфизоксазол / *S.aureus*

* CLSI (NCCLS) M24-A QC диапазон

** Диапазон, основанный на данных [3].

*** Диапазон, основанный на данных [4].

**** Диапазон, зависимый от времени инкубации - только для 72 часов инкубации

Свяжитесь с дистрибьютором для поддержки в случае неверных результатов контроля качества.

Планшеты были разработаны с учетом совместимости с CLSI (NCCLS) референсным методом микроразведений CLSI (NCCLS). Сходимости результатов были получены независимо [5-7]. Для более полной информации свяжитесь с компанией TREK или с вашим локальным дистрибьютором.

Ограничения

1. Результаты по имипенему для *M.chelonae* и *M.abscessus* официально не докладывались [1].
2. Тобрамицин – это аминогликозид, выбранный для *M.chelonae* и результаты были получены только по этому организму [1].

Дополнение 1: Процедура для подсчета колоний.

1. Непосредственно при посеве на планшеты, используя стерильную петлю на 1 мкл, возьмите образец из лунки с положительным контролем и посейте на подходящую среду.
2. Другой петлей (1 мкл) возьмите образец из той же лунки и перемешайте с 50 мкл стерильной деионизированной воды. Посейте 1 мкл этой суспензии на чашку с подходящей средой для получения колоний.
3. Инкубируйте чашки с посевами при 30 или 35°C (в зависимости от вида микроорганизма) одну ночь.
4. Считывайте результаты как описано ниже:

Подсчет колоний	0,001 чашка	0,001 от 1/50 разведение
$< 5 \times 10^4 =$	< 50	0
$5 \times 10^4 =$	50 – 100	0 – 2
$1 \times 10^5 - 5 \times 10^5 =$	>100	≤ 10
$>5 \times 10^5 =$	>100	>10

Литература.

1. NCCLS M24-A. Susceptibility Testing of Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard- Second Edition (2003). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
2. NCCLS M100-S13 (M7). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. (2003). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA
3. Brown-Elliott, B; Wallace, R; Crist, C; Mann, L; and Wilson, R. (2002). Comparison of In Vitro Activities of Gatifloxacin and Ciprofloxacin against Four Taxa of Rapidly Growing Mycobacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 3283-3285
4. Wallace, R; Brown-Elliott, B; Crist, C; Mann, L; and Wilson, R. (2002). Comparison of In Vitro Activities of Gatifloxacin and Ciprofloxacin against Four Taxa of Rapidly Growing Mycobacteria. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Abstract E-541
5. Woods, G; et.al. (2003). Multisite Reproducibility of Results Obtained by Two Broth Dilution Methods for Susceptibility Testing of Mycobacterium avium Complex. Journal of Clinical Microbiology 41: 627-631
6. Woods, G; et.al (1999). Multisite Reproducibility of results Obtained by Two Broth Dilution Methods for Susceptibility Testing of Mycobacterium abscessus, M. chelonae and Mycobacterium fortuitum. Journal of Clinical Microbiology 37: 1676-1682
7. Brown, B; Wallace, R; and Onyi, G. (1996). Activities of the Glycylcyclines N,N-Dimethylglycylamido-Minocycline and N,N-Dimethylglycylamido-6-Deomethyl-6-Deoxytetracycline against Nocardia spp. And Tetracycline- Resistant Isolates of Rapidly Growing Mycobacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40: 874-878
8. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd Edition. 2004. Editor H.D. Isenberg. ASM Press.

DISCLAIMER

Read the instructions for use and references before using the product.

Any change or modification of the instructions may affect results. TREK Diagnostic Systems will not be liable for any damages resulting from any changes in storage, precautions, handling or testing procedures of the current version of instructions.

The information provided in this technical insert is current at the time of printing and may change without notice. Contact the local TREK distributor for latest information

Manufacturer: TREK Diagnostic Systems Limited
Imberhorne Lane, East Grinstead,
West Sussex RH19 1QX UK
Tel: +44 1342 318777

Distributed in USA by:
TREK Diagnostic Systems,
982 Keynote Circle, Suite 6,
Cleveland, Ohio, 44131
Sensititre® and SensiTouch® are registered trademarks of TREK Diagnostic Systems.