

Testy lekowrażliwości mikroorganizmów

IVD

ZASTOSOWANIE

Paski Etest służą do ilościowego oznaczania lekowrażliwości Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii tlenowych gatunków, takich jak *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* oraz *Enterococcus* i bakterii wybrednych, takich jak bakterie beztlenowe, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, paciorkowce i gatunki *Haemophilus*. W systemie zastosowano wstępnie określony gradient stężeń antybiotyku, którego używa się w toku inkubacji całonocnej na podłożu agarowym, do ustalenia minimalnego stężenia hamującego (MIC, ang. Minimum Inhibitory Concentration; podawane w µg/ml) różnych leków przeciwbakteryjnych.

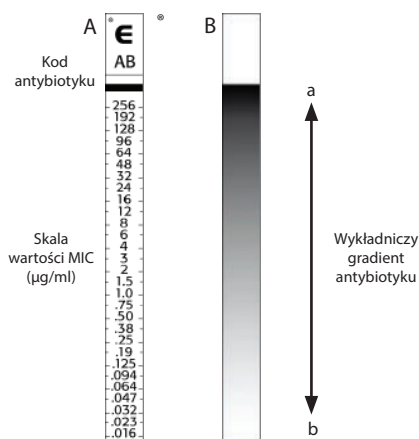
STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIA

Bieżące metody badania lekowrażliwości AST (ang. Antimicrobial Susceptibility Testing) są oparte na technice rozcieńczeń ilościowych lub jakościowych procedurach dyfuzji. Metody rozcieńczania są oparte na serii dwukrotnych rozcieńczeń antybiotyków w pożywce bulionowej lub agarowej. Dzięki tym metodom można ustalić wartość MIC danego antybiotyku, czyli minimalne stężenie hamujące (w µg/ml), które będzie hamować rozwój konkretnych bakterii przy zdefiniowanych warunkach eksperymentu.

ZASADA

Technologia gradientu stężeń pasków Etest została opracowana na podstawie połączenia koncepcji rozcieńczeń i dyfuzji w testach wrażliwości. System Etest, podobnie jak inne metody rozcieńczeń, pozwala bezpośrednio określić wrażliwość drobnoustrojów na leki, gdzie uzyskany wynik ma postać konkretnych wartości MIC. Jednakże wartości MIC uzyskane dzięki systemowi Etest w warunkach wstępnie zdefiniowanego, stabilnego i ciągłego gradientu stężeń antybiotyków mogą być dokładniejsze i cechować się większą powtarzalnością w porównaniu do wyników uzyskanych podczas konwencjonalnych procedur opartych na serii dwukrotnych rozcieńczeń nieciągłych.

System Etest to cienki, obojętny i nieporowaty plastikowy pasek. Na jednej stronie paska (A) naniesiono skalę wartości MIC w µg/ml, a uchwyt paska zawiera dwu- lub trzyliterowy kod identyfikacyjny zastosowanego antybiotyku. Z drugiej strony paska (B) znajduje się wstępnie zdefiniowany, wykładniczy gradient stężeń osuszonego i ustabilizowanego antybiotyku. Na przedstawionej ilustracji maksymalne stężenie oznaczono literą **a**, a stężenie minimalne — literą **b** (Rys. 1). Gradient obejmuje ciągły zakres stężeń w 15 dwukrotnych rozcieńczeniach konwencjonalnej metody wyznaczania MIC.



Rys. 1. Konfiguracja paska gradientowego Etest

Po przyłożeniu paska gradientowego Etest do powierzchni agarowej z posiewem następuje natychmiastowe, skuteczne przeniesienie przygotowanego gradientu stężeń antybiotyku z plastikowej powierzchni nośnikowej do macierzy agarowej. Bezpośrednio pod paskiem tworzy się stabilny, ciągły i wykładniczy gradient stężeń antybiotyku. Po zakończeniu inkubacji i uwidocznieniu wzrostu bakterii widać również symetryczną elipsę hamowania wzrostu wyśrodkowaną wzdłuż paska. Wartość MIC odczytuje się ze skali w µg/ml w miejscu, gdzie ostrołukowy koniec elipsy przecina pasek.

Aby zapewnić powtarzalność wartości MIC przy stosowaniu systemu gradientowego, konieczne jest utrzymywanie stabilności gradientu w krytycznym okresie, kiedy następuje ustalenie położenia krawędzi rozwoju/hamowania dla konkretnego połączenia drobnoustrojów/antybiotyków. Wykazano powtarzalność i równoważność wartości MIC w odniesieniu do referencyjnych procedur rozcieńczania CLSI®, która wynika ze stabilności i dokładności wstępnie ustalonego gradientu stężeń paska Etest.

ODCZYNNIKI

System Etest jest dostarczany w opakowaniu zawierającym 30 lub 100 pasków testowych (w zależności od formatu opakowania) z jednym środkiem przeciwbakteryjnym.

PRZECZYSZCZANIE

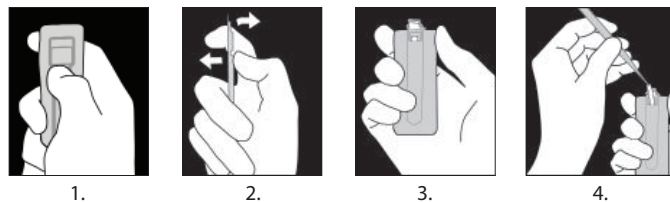
Paski Etest należy zawsze przechowywać w temperaturze podanej na opakowaniu do upływu terminu ważności. Produkty zawsze można przechowywać w temperaturze niższej od określonego maksimum.

Paski gradientowe Etest pozostałe w otwartym opakowaniu muszą być przechowywane w suchym miejscu. Otwarte opakowanie należy ponownie szczelnie zamknąć przy użyciu zacisku albo włożyć do hermetycznego pojemnika zawierającego aktywny środek osuszający i przechowywać w zakresie temperatur podanym na etykiecie. Przy prawidłowym przechowywaniu i obsłudze paski w pojemnikach można wykorzystać do upływu daty ważności. Pojemnik do przechowywania należy oznaczyć numerem serii i datą ważności. Paski Etest należy chronić przed wilgocią, ciepłem oraz bezpośrednim działaniem promieni słonecznych.

Nie wolno dopuścić do powstania, ani do dostania się wilgoci do wnętrza opakowania lub pojemnika do przechowywania. Należy utrzymywać suchy stan pasków Etest za pomocą aktywnego środka osuszającego.

OBŚŁUGA

- Przed wyjęciem z opakowania pasków gradientowych Etest należy wzrokowo sprawdzić zamknięte opakowanie pod kątem uszkodzeń. Jeśli opakowanie jest uszkodzone, nie wolno używać pasków gradientowych Etest.
- Po wyjęciu z chłodziarki/zamrażarki oryginalne opakowanie lub pojemnik do przechowywania należy odstawić do osiągnięcia temperatury pokojowej (przechowywanie w +4 °C — około 15 minut, -20 °C — około 30 minut). Przed otwarciem opakowania należy upewnić się, że odparowała cała wilgoć zgromadzona na jego powierzchni. Paski z opakowań przechowywanych w temperaturze pokojowej można wykorzystać od razu.
- Instrukcja otwierania:
 - Opakowanie pojedyncze (patrz ilustracja poniżej)
 1. Chwyc opakowanie pomiędzy kciuk i palec wskazujący, umieszczając opuszkę kciuka we wgłębieniu z tyłu opakowania.
 2. Naciśnij kciukiem do przodu i palcem wskazującym do tyłu, aby rozerwać warstwę aluminium z zachowaniem środka suszącego w górnej części opakowania.
 3. Wygnij górną część do tyłu, aby całkowicie otworzyć opakowanie.
 4. Wyjmij pasek Etest z opakowania używając pensety, lub innego narzędzia ręcznego.



- Blister
 - Otwórz jeden przedział blistra, odcinając nożyczkami opakowanie wzdłuż przerywanej linii.
- Pianka
 - Otwórz opakowanie, odcinając nożyczkami jeden koniec aluminiowej torebki.

- Dotykając palcami, paski Etest należy chwycić wyłącznie za uchwyt paska — obszar oznaczony literą E. **Nie wolno dotykać powierzchni paska zawierającej gradient stężeń antybiotyku, tj. powierzchni po stronie przeciwnej do strony ze skalą MIC (Rys. 1, B).** Paski można umieścić na tacy aplikatora, gdzie będą spoczywać do momentu przygotowania do użycia (Rys. 3). Do sprawnego podnoszenia pasków Etest można używać aplikatora ręcznego (np. Mini Grip-It, pensety lub podobnych narzędzi) albo chwytaka próżniowego Nema C88™ (bioMérieux SA) (Rys. 3 i 4). Zasobniki piankowe z paskami Etest należy wprowadzać bezpośrednio do automatycznego aplikatora Simplex C76™ (bioMérieux SA).

OSTRZEŻENIA I ZABEZPIECZENIA

- Paski Etest są przeznaczone wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.
- Chociaż paski Etest działają na prostej zasadzie, powinny być używane wyłącznie przez przeszkolonych pracowników.
- Przy kontakcie z próbkami bakteryjnymi należy przestrzegać procedur aseptyki oraz stosownych środków ostrożności dotyczących zagrożeń mikrobiologicznych.

PROCEDURY

Materiały dostarczone

- 30 lub 100 pasków Etest jednego antybiotyku.
- 1 ulotka + TABELA 1 zawarta w zestawie lub udostępniona do pobrania pod adresem www.biomerieux.com/techlib.

Materiały wymagane, ale nie dostarczone

- Płytki agarowe (o średnicy 90 mm lub 150 mm) z odpowiednim podłożem do badania wrażliwości.
- Nośnik zawieszenia inokulum.
- Wymazówki (jałowe, nietoksyczne i niezbyt mocno owinięte), probówki i nożyczki.
- Aplikator ręczny [np. Mini Grip-It (bioMérieux nr kat. 411200), penseta lub podobne narzędzie] albo narzędzia bioTools [Retro C80™ (bioMérieux nr kat. 559803), Nema C88™ (bioMérieux nr kat. 559804), Simplex C76™ (bioMérieux nr kat. 559802)].
- Wzorce zmętnienia o wartości 0,5 i 1 w skali McFarlanda (bioMérieux nr kat. 70 900) lub DENSIMAT (bioMérieux nr kat. 99 234).
- Inkubator ($35 \pm 2^\circ\text{C}$), słoć anaerobowy lub komora albo komora o atmosferze wzbogaconej w CO_2 .
- Mikroorganizmy do kontroli jakości (np. LyfoCults® Plus).
- Pojemniki do przechowywania zawierające kapsułki z aktywnym środkiem suszącym (bioMérieux nr kat. 501603, 559900, 559901 lub 559902) lub woreczki i/lub zaciski (bioMérieux nr kat. 559809).

Podłoże

Płytki agarowe musi mieć głębokość równą $4,0 \pm 0,5$ mm, pH $7,3 \pm 0,1$ i spełniać wymagania dotyczące jakości. Podłoże i substancje uzupełniające zależą od badanej grupy mikroorganizmów (Tabela 2).

Przygotowanie zawiesiny

W tabeli 2 przedstawiono wytyczne dotyczące inokulum. Kilka starannie wyizolowanych kolonii, pochodzących z całonocnej hodowli na płytce agarowej, zawiesić w odpowiednim nośniku, osiągając zadaną wartość zmętnienia inokulum porównując ze wzorcem zmętnienia w skali McFarlanda. W przypadku mikroorganizmów wybrednych, takich jak pneumokoki, streptokoki, gonokoki, bakterie beztlenowe i *Haemophilus* spp., zawiesinę przygotowaną na bazie bulionu należy wykorzystać w ciągu 15 minut.

Posiew

Zanurzyć jałową, nietoksyczną i niezbyt mocno owiniętą wymazówkę w zawieszynie inokulum. Nadmiar płynu odcisnąć o wewnętrzną ścianę probówki. Usunąć większą ilość płynu przy posiewie na płytce o średnicy 90 mm i mniejszą w przypadku płytki o średnicy 150 mm. Starannie trzykrotnie przetrzeć całą powierzchnię podłoża agarowego, za każdym razem obracając płytkę o ok. 60 stopni w celu zapewnienia równomiernego rozprowadzenia inokulum. Można również wykorzystać urządzenie Retro C80 (rota-plater, bioMérieux SA) w celu efektywnego posiewu zawiesiny na całej powierzchni agaru. Odczekać od 15 do 20 minut w celu całkowitego wchłonięcia nadmiaru wilgoci, tak **by powierzchnia była całkiem sucha przed nałożeniem paska gradientowego Etest.**

Uwagi:

- Optymalne przygotowanie inokulum i wykonanie posiewu pozwala otrzymać równomierny wzrost o charakterze zlewnym.
- Wzorce zmętnienia McFarlanda nie gwarantują uzyskania odpowiedniej liczby żywych komórek w zawieszynie. Należy regularnie zliczać kolonie, aby zweryfikować, czy stosowana procedura tworzenia inokulum pozwala na wytworzenie odpowiedniej liczby żywych komórek (w CFU/ml). Należy zapoznać się z zawartością części **KONTROLA JAKOŚCI**.
- Dodatkowe informacje techniczne zawarto w instrukcji stosowania pasków Etest (EAG, ang. Etest Application Guide) dostępnej pod adresem www.biomerieux.com/techlib.

Nakładanie

Przed nałożeniem pasków gradientowych Etest należy sprawdzić, czy posiana powierzchnia agaru jest zupełnie sucha.

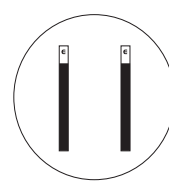
Opakowanie otworzyć, a paski Etest obsługiwać w sposób opisany w części **OBSŁUGA**.

Do optymalnego ustawienia pasków Etest w schemacie z równomiernym oddaleniem od siebie na płytce agarowej można wykorzystać wzorzec. Na jednej płytce agarowej o średnicy 150 mm (Rys. 2a) można umieścić od czterech do maksymalnie sześciu pasków Etest. W przypadku jednej wartości MIC można użyć jednego lub dwóch pasków na płytce agarowej o średnicy 90 mm (Rys. 2b). Rozmieszczenie pasków jest automatycznie optymalizowane przy korzystaniu z aplikatora Simplex C76 (Rys. 6). W przypadku organizmów o oczekiwanej wysokiej wrażliwości należy użyć mniejszej liczby pasków na płytce o średnicy 150 mm i tylko jednego paska na płytce o średnicy 90 mm.



Rys. 2a.

Wzorzec rozmieszczenia 6 pasków na płytce o średnicy 150 mm.



Rys. 2b.

Wzorzec rozmieszczenia 2 pasków na płytce o średnicy 90 mm.

Do nakładania pasków na powierzchnię agarową z posiewem można używać pensety, ręcznego aplikatora, narzędzia Nema C88 (Rys. 5) lub aplikatora Simplex C76 (Rys. 6). Paski gradientowe Etest należy układać w taki sposób, aby **skala MIC była skierowana ku górze** (w kierunku otwartej powierzchni płytki), a koniec z maksymalnym stężeniem znajdował się w pobliżu krawędzi płytki (Rys. 2a).



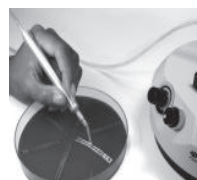
Rys. 3.

Podnoszenie paska Etest z tacy za pomocą narzędzia Mini Grip-It.



Rys. 4.

Przy używaniu narzędzia Nema C88 można używać pasków Etest bezpośrednio z zasobnika.



Rys. 5.

Nakładanie paska Etest na powierzchnię agarową za pomocą narzędzia Nema C88.



Rys. 6.

Automatyczny aplikator Simplex C76.

Należy dopilnować, aby pasek dokładnie przylegał do powierzchni agaru na całej długości. W przypadku odwrotnego umieszczenia paska nie utworzy się elipsa działania hamującego, ponieważ antybiotyk nie przenika przez nieporowaty plastikowy pasek. W razie konieczności należy usunąć pęcherzyki powietrza spod paska, delikatnie naciskając pasek (bez przesuwania) końcówką aplikatora lub pensetą, zawsze zaczynając od najniższego stężenia i przesuwając narzędzie w kierunku stężeń wyższych. Obecność małych pęcherzyków powietrza nie ma wpływu na wyniki. **Nałożonego paska nie można przesuwac z powodu natychmiastowego uwalniania antybiotyku do podłoża agarowego.**

Inkubacja

Płytki agarowe należy inkubować w pozycji odwróconej (z wieczkiem skierowanym do dołu) w stosach składających się z maksymalnie 5 warstw, w warunkach podanych w Tabeli 2 oraz Instrukcji stosowania pasków Etest dostępnej pod adresem www.biomerieux.com/techlib.

Tabela 2. Zalecane podłoże, inokulum i inkubacja¹⁾

| Grupa organizmów | Podłoże agarowe ³⁾ | Inokulum | | Inkubacja | | |
|---|--|--|---------------------------------------|---------------------|--|-------------------------------------|
| | | Zawiesina | Zmętnienie (skala McFarlanda) | Temperatura (±2 °C) | Skład atmosfery ⁸⁾ | Czas (godziny) ⁹⁾ |
| Tlenowe | Płytki agarowe Mueller Hinton ^{4) 5) 6)} | 0,85% NaCl (lub 0,45% roztwór soli fizjologicznej VITEK 2) ¹⁰⁾ | 0,5 (1 w przypadku kolonii śluzowych) | 35 °C | warunki standardowe | 16–20 |
| ORSA/ORSE | Płytki agarowe Mueller Hinton + 2% NaCl (wyłącznie pasek Etest z oksacyliną) | 0,85% NaCl (lub 0,45% roztwór soli fizjologicznej VITEK 2) ¹⁰⁾ | 0,5 | 35 °C | warunki standardowe | 24 ORSA 48 ORSE |
| Beztlenowe | Podłoże Brucella z krwią | Bulion Brucella lub Mueller Hinton (lub bulion Schaedlera + wit. K3) ¹⁰⁾ | 1 | 35 °C | 80–85% N ₂ / 5–10% CO ₂ / 10% H ₂ ⁷⁾ | 24–48–72 w zależności od gatunku |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | HTM (CLSI) MHF (EUCAST) | Bulion Mueller Hinton lub HTM (lub bulion z wyciągiem sercowo-mózgowym (BHI)) ¹⁰⁾ | 0,5 (1 w przypadku kolonii śluzowych) | 35 °C | 5% CO ₂ | 20–24 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> i streptokoki ²⁾ | Mueller Hinton + 5% krwi (CLSI) MHF (EUCAST) | Bulion Mueller Hinton (lub 0,45% roztwór soli fizjologicznej VITEK 2 albo bulion BHI) ¹⁰⁾ | 0,5 (1 w przypadku kolonii śluzowych) | 35 °C | 5% CO ₂ | 20–24 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Podłoże z agarem GC + określone substancje uzupełniające | Bulion Mueller Hinton (lub bulion BHI) ¹⁰⁾ | 0,5 | 35 °C | 5% CO ₂ | 20–24 |

Uwagi:

1. Dalsze informacje dotyczące konkretnych zastosowań opisano w dokumentach dotyczących pasków Etest, które są dostępne pod adresem www.biomerieux.com/techlib.
2. Obejmuje grupy A, B, C i G paciorkowców β-hemolitycznych oraz grupę paciorkowców zieleniejących *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis* i *S. bovis*.
3. Należy stosować podłoża o dobrej definicji i wysokiej jakości, które zapewniają odpowiedni rozwój kultur. Wybrana marka powinna cechować się dobrą powtarzalnością pomiędzy seriami, aby zapewnić uzyskiwanie dokładnych i pewnych wartości MIC.
4. W przypadku badania wrażliwości na trimetoprim i trimetoprim/sulfametoksazol należy upewnić się, że wybrana marka i seria podłoża agarowego cechuje się niską zawartością tyminy/tymidyny, aby zminimalizować antagonistyczne działanie trimetoprimu i sulfonamidów.
5. Zawartość wapnia w agarze Mueller Hinton może różnić się w zależności od marki produktu oraz między seriami w obrębie tej samej marki. Przy zmianie serii, zwłaszcza w przypadku testów wrażliwości na daptomycynę, należy przeprowadzić kontrolę jakości płytek agarowych w celu określenia ich przydatności do użycia.
6. Zawartość manganu w agarze Mueller Hinton może różnić się w zależności od marki produktu oraz między seriami w obrębie tej samej marki. Przy zmianie serii, zwłaszcza w przypadku testów wrażliwości na tigecyklinę, należy przeprowadzić kontrolę jakości płytek agarowych w celu określenia ich przydatności do użycia.
7. W przypadku testów wrażliwości na metronidazol należy dopilnować użycia wydajnego systemu anaerobowego, aby uzyskać szybką atmosferę beztlenową, co pozwoli uniknąć wyników fałszywie opornych.
8. W przypadku inkubacji mikroorganizmów wybrednych w atmosferze z 5% CO₂ powstałe obniżenie pH może wpływać na aktywność makrolidów, linkozamidów, streptogramin, aminoglikozydów, chinolonów, penicylin i tetracyklin. Należy pamiętać, że mogą występować różnice w wynikach badań wykonywanych w systemach inkubowanych w warunkach standardowych oraz w atmosferze wzbogaconej w CO₂.
9. Przed odczytem należy dopilnować inkubacji płytki agarowej przez zalecany okres. Ma to szczególne znaczenie przy opóźnionej ekspresji oporności oraz w przypadku mikroorganizmów wybrednych i cechujących się wolnym rozwojem.
10. Wykazano zgodność 0,45% roztworu soli fizjologicznej VITEK 2 (bioMérieux nr kat. V1204), bulionu Schaedlera + wit. K3 (bioMérieux nr kat. 42106) i wyciągu mózgowo-sercowego (BHI) (bioMérieux nr kat. 42081) z paskami Etest.

INTERPRETACJA WYNIKÓW**Odczyt wartości MIC**

Po wymaganym okresie inkubacji (Tabela 2) i tylko kiedy wyraźnie widać równomierny wzrost mikroorganizmów, należy odczytać wartość MIC na przedstawionej skali w miejscu, gdzie ostrołukowy koniec elipsy strefy hamowania wzrostu przecina pasek. Nie wolno odczytywać płytki, jeżeli hodowla wygląda na mieszaną lub jeżeli murawa jest nadmiernie zagęszczona albo rozrzedzona. W takiej sytuacji należy powtórzyć badanie.

Punkty końcowe MIC pasków Etest są na ogół wyraźnie odczytane chociaż mogą występować różne modele hamowania wzrostu. Należy zapoznać się z poniższymi wytycznymi oraz ilustracjami przedstawionymi w **INSTRUKCJI ODCZYTU PASKÓW ETEST** (Rys. od 7 do 26).

WAŻNE UWAGI DOT. ODCZYTU

- Zapoznać się z opisem działania każdego antybiotyku (bakteriobójcze lub bakteriostatyczne) zawartym w karcie informacyjnej dla użytkowników pasków Etest (CIS, ang. Customer Information Sheet; CIS 006).
- W przypadku leków o działaniu bakteriobójczym, przykładowo antybiotyków β-laktamowych, należy zawsze odczytywać wartość MIC w miejscu zupełnego zahamowania całego wzrostu, czyli bez zamgleń, mikrokolonii czy izolowanych kolonii. W celu dokładnego ustalenia punktów końcowych należy pochylić płytkę i/lub użyć lupy. Ma to szczególne znaczenie przy badaniu wrażliwości pneumokoków, streptokoków, enterokoków, wrzecionowców, *Acinetobacter* i *Stenotrophomonas* spp.
- W przypadku leków o działaniu bakteriostatycznym (przykładowo trimetoprimu/sulfametoksazolu) o utrudnionej ocenie punktów końcowych należy odczytać wartość MIC przy 80% zahamowania wzrostu, czyli w pierwszym miejscu istotnego zahamowania wzrostu widocznym okiem nieuzbrojonym.
- Niezlewna murawa, postrzępione krawędzie elipsy i nierówne skrzyżowania z paskiem mogą wynikać z nadmiaru wilgoci na płytkach przed posiewem, niewystarczającego wysuszenia przed nałożeniem pasków i/lub nierówno posianych powierzchni. Jeżeli nie można łatwo odczytać punktów końcowych wartości MIC, badanie należy powtórzyć.
- Jeżeli w przypadku badania wrażliwości na środki bakteriobójcze w obrębie elipsy widać makrokolonie, należy odczytać wszystkie makrokolonie w odległości 1–3 mm od paska (zobacz **INSTRUKCJA ODCZYTU PASKÓW ETEST**, Rys. 21).
- Kiedy wzdłuż całego paska widoczny jest rozwój bakterii, tzn. kiedy nie widać elipsy hamowania wzrostu, wartość MIC należy odczytać jako wartość ≥ najwyższej wartości na skali MIC. Kiedy elipsa hamowania wzrostu znajduje się pod paskiem, ale się z nim nie przecina, wartość MIC należy zgłosić jako wartość < najniższej wartości na skali MIC.
- Mikroorganizmy, takie jak gronkowce, *Acinetobacter* spp., anaeroby i gonokoki, mogą wykazywać wrażliwość na sulbaktam, tazobaktam lub kwas klawulanowy. W przypadku testów Etest PTC i TLC może to spowodować powstanie elipsy hamowania wzrostu z wydłużonym pasmem hamowania równoległym do paska. W celu uzyskania wartości MIC należy ekstrapolować górną eliptyczną krzywiznę w stronę paska (zobacz **INSTRUKCJA ODCZYTU PASKÓW ETEST**, Rys. 15).
- W przypadku załamania elipsy hamowania wzrostu w punkcie końcowym przy badaniu wrażliwości na klindamycynę, erytromycynę lub chloramfenikol należy ekstrapolować wartość MIC z początkowego załamania (czyli użyć wartości wyższej o 0,5–1 rozcieńczenie w stosunku do miejsca przecięcia).
- Jeżeli przy badaniu wrażliwości na fosfomycynę w elipsie hamowania wzrostu widoczne są liczne (>5) makrokolonie, wartość MIC należy odczytać w miejscu zupełnego zahamowania. Można zignorować nieliczne (<5) kolonie.
- W przypadku badania wrażliwości na chinupristinę/dalfopristinę i linezolid zmętnienie i śladowy wzrost gronkowców i enterokoków należy odczytywać przy 90% zahamowania wzrostu widocznego okiem nieuzbrojonym. Należy odczytać liczbę izolowanych makrokolonii w obrębie elipsy hamowania na poziomie pełnego zahamowania.
- Elipsa zahamowania wzrostu powiązana z wankomycyną może mieć małą średnicę. Należy odczytać wartość z rzeczywistego przecięcia wzrostu z paskiem, a nie wartość powiązaną z wzrostem przylegającym do boków paska.

Interpretacja

Do interpretacji wartości MIC pasków Etest można używać opublikowanych przez CLSI®, EUCAST i/lub krajowy zespół referencyjny stężeń granicznych (MIC breakpoint) związanych z określaniem kategorii wrażliwości.

Ponieważ paski Etest to w pełni ilościowa metoda ustalania wartości MIC, ich używanie pozwala odczytywać dokładną wartość MIC razem z kategorią wrażliwości. Paski Etest pozwalają odczytać wartość MIC na skali ciągłej. Ta cecha może spowodować uzyskanie wyników z zakresu pomiędzy konwencjonalnymi rozcieńczeniami dwukrotnymi, tj. rozcieńczenia połowkowe. Wartość MIC paska pomiędzy standardowymi rozcieńczeniami dwukrotnymi trzeba zaokrąglić w górę do najbliższej wartości rozcieńczenia dwukrotnego przed określeniem kategorii.

Przykład: Stężenia graniczne benzylopenicyliny (µg/ml) dla *Streptococcus pneumoniae*:

| S | I | R |
|--------|--------|-----|
| ≤ 0,06 | 0,12–1 | ≥ 2 |

Wartość MIC 1 µg/ml paska Etest jest zgłaszana jako „średniowrażliwe” (I), natomiast wartość 1,5 zostaje zaokrąglona w górę do wartości 2 µg/ml i wiąże się to z przydzieleniem kategorii „oporne” (R).

KONTROLA JAKOŚCI

W celu sprawdzenia działania odczynników pasków Etest, jakości podłoża, inokulum i zastosowanej procedury należy sprawdzić odpowiednie szczepty kontroli jakości w sposób opisany w części **PROCEDURA**. Odczynniki i procedura testu są uznawane za zadowalające, jeżeli uzyskane wartości MIC zawierają się w zakresach kontroli jakości podanych w **TABELI 1**.

Nie wolno przekazywać wyników pacjenta, jeśli wyniki kontroli jakości wykraczają poza podane zakresy QC. Częstotliwość testów kontroli jakości musi zostać ustalona indywidualnie w każdym laboratorium. Wytyczne przedstawiono w dokumentach Testy wrażliwości mikroorganizmów CLSI® dla serii M7, M11 i M100.

W niektórych przypadkach przedziały kontroli jakości pasków Etest mogą się różnić od specyfikacji CLSI. Przedziały QC pasków Etest opracowano na podstawie rozległych danych uzyskanych w toku kontroli jakości dużej liczby partii odczynników na przestrzeni wielu lat i obejmują również dane z badań wielośrodkowych. Specyfikacje kontroli jakości przedstawiono w **TABELI 1**.

Wyniki MIC szczepu kontroli jakości (QC) o połowę rozcieńczenia niższe od dolnej granicy QC należy zaokrąglić w górę do najbliższej wartości rozcieńczenia dwukrotnego przed określeniem wyniku kontroli jakości. W przypadku wyników MIC, które o pół rozcieńczenia przekraczają górną granicę, należy uznać niepowodzenie kontroli jakości.

Należy regularnie zliczać kolonie, aby zweryfikować, czy stosowana procedura pozwala na wytworzenie zawiesiny właściwej w odniesieniu do stężenia CFU/ml żywożywnych. Należy przykładowo rozcieńczyć zawiesinę inokulum w stosunku 1:1000 i nanieść 1 µl subkultury na zalecaną pożywkę agarową (zobacz Tabela 2). Dopuszczalne inokulum powinno skutkować uzyskaniem od 100 do 500 kolonii (czyli od 1 do 5 x 10⁵ CFU/ml).

Wzorce zmętnienia McFarlanda nie gwarantują uzyskania odpowiedniej liczby komórek zdolnych do przetrwania (wyrażonej w CFU/ml).

OCZEKIWANE WARTOŚCI

Z powodu gwałtownego rozwoju oporności nie można przewidzieć poziomów antybiotykowrażliwości różnych biologicznych populacji bakterii. W związku z tym każde laboratorium powinno używać oczekiwanych wartości MIC różnych antybiotyków przy szczepach kontroli jakości, aby zagwarantować zadowalające wykonywanie procedur testowych oraz rozsądną dokładność uzyskanych wyników klinicznych.

CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Używając ocen porównawczych, w zewnętrznych jednostkach klinicznych oraz w wewnętrznych testach ustalono charakterystykę działania pasków Etest w odniesieniu do różnych grup antybiotyków/mikroorganizmów. Przeprowadzone badania wykazały korelację wartości MIC pasków Etest z referencyjną metodą CLSI mikrorozcieńczeń bulionu i/lub rozcieńczeń agaru — w zależności od badanego mikroorganizmu. Paski Etest uważa się za zasadniczo równoważne metodom CLSI, kiedy wartości MIC obu procedur wykazują istotną zgodność (EA) na poziomie ≥ 90% w obrębie ±1 rozcieńczenia.

W **TABELI 1** podano specyfikacje produktu, charakterystykę działania, kryteria interpretacji i specyfikacje kontroli jakości.

Referencyjna baza danych pasków Etest składa się z ponad 3000 odniesień naukowych, gdzie wykazano znacznego stopnia równoważność pasków Etest i referencyjnych metod rozcieńczenia w badaniu szerokiego spektrum mikroorganizmów.

WAŻNE UWAGI

1. W **TABELI 1** przedstawiono wskazania (dane dotyczące działania) powiązane z różnymi grupami mikroorganizmów zgodnie z określonymi zaleceniami.
2. Czasami niektóre kombinacje antybiotyków/mikroorganizmów mogą skutkować niezwykłymi wynikami. W takiej sytuacji niedoświadczony pracownik może mieć problem z oceną punktu końcowego MIC. Rozwiązaniem jest przeszkolenie pracowników poprzez regularne wykorzystywanie szczepli kontroli jakości, czytanie instrukcji odczytu pasków Etest oraz konsultacje z doświadczonymi pracownikami w celu prawidłowej oceny punktów końcowych MIC.
3. Ponieważ paski Etest są stworzone na bazie agarowej, wykazują najlepszą korelację z referencyjnym rozcieńczeniem agarowym. Wykazano korelację z referencyjnym mikrorozcieńczeniem bulionu w sytuacji braku referencyjnego rozcieńczenia agarowego.
4. Podobnie jak w przypadku wszystkich wyników AST, wyniki pasków Etest to wartości wyłącznie *in vitro* i mogą one wskazywać potencjalną wrażliwość danego mikroorganizmu *in vivo*. Wykorzystanie wyników w terapii klinicznej może zostać podjęte wyłącznie przy użyciu i na wyłączną odpowiedzialność lekarza prowadzącego z wykorzystaniem oceny wywiadu medycznego oraz znajomości stanu pacjenta, farmakokinetyki/farmakodynamiki antybiotyku oraz doświadczeń klinicznych związanych z leczeniem infekcji wywołanych konkretnym patogenem bakteryjnym przy stosowaniu rozważanego antybiotyku, dawki i sposobu dawkowania.
5. Szczegółowe informacje dotyczące konkretnych ograniczeń w interpretacji i/lub ograniczeń w zastosowaniu klinicznym danego antybiotyku w różnych sytuacjach terapeutycznych zawierają tabele i przypisy norm interpretacyjnych MIC w najnowszych wersjach dokumentów CLSI AST dotyczących procedur rozcieńczania (seria M7, M11 i M100) lub zalecenia EUCAST.

UTYLIZACJA ODPADÓW

Niewykorzystane odczynniki można uznać za odpady niestanowiące zagrożenia i utylizować w odpowiedni sposób.

Zużyte odczynniki oraz wszelkie inne skażone materiały jednorazowe należy utylizować z wykorzystaniem procedur dotyczących produktów zakaźnych lub potencjalnie zakaźnych.

Każde laboratorium samodzielnie odpowiada za postępowanie z odpadami i ściekami zgodnie z ich naturą i poziomem zagrożenia. To wymaganie dotyczy również obróbki lub utylizacji (albo zlecenia obróbki lub utylizacji) odpadów i ścieków zgodnie ze stosownymi przepisami.

LITERATURA

1. Bolmström, A. *et al.* (1988). A Novel Technique for Direct Quantification of Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms. ICAAC, poster 1209.
2. Baker, C. N. *et al.* (1991). Comparison of the Etest to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*.
3. Brown, D. F. J. and Brown, L. (1991). Evaluation of the Etest, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
4. Jorgensen, J. H. *et al.* (1994). Detection of penicillin and extended spectrum cephalosporin resistance among *S. pneumoniae* clinical isolates using Etest. *Journal of Clinical Microbiology*.
5. Citron D. M. *et al.* (1991). Evaluation of Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*.
6. Sanchez M. *et al.* (1993). Etest, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiological application. *The Antimicrobial Newsletter*.
7. Schulz J. E. *et al.* (1993). Reliability of the Etest for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*.
8. Baker C. N. *et al.* (1994). Optimizing testing of methicillin resistant *Staphylococcus* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.
9. Tenover F. C. *et al.* (1996). Evaluation of commercial methods for determining antimicrobial susceptibility of *S. pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*.
10. Rosenblatt J. E. *et al.* (1995). Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.

Uwaga:

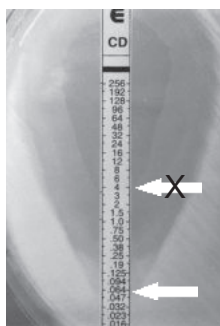
W bazie PubMed (Internet) można znaleźć dużą liczbę odwołań do pasków Etest na podstawie recenzowanego piśmiennictwa.

BIBLIOGRAFIA

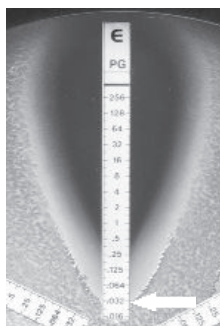
1. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems; Guidance for Industry and FDA. August 2009.
2. Lorian, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th Ed. 2005. Williams & Wilkins, USA.
3. Murray, P.R. *et al. Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. 2001. ASM Press.
4. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. Approved Standard, M7-A (latest edition).
5. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests of Anaerobic Bacteria*. Approved Standard, M11-A (latest edition).
6. CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S (latest edition).

INSTRUKCJA ODCZYTU PASKÓW ETEST

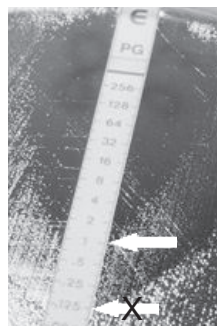
WYNIKI POWIĄZANE Z MIKROORGANIZMAMI



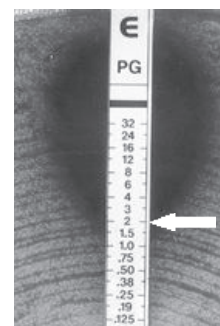
Rys. 7.
Zignorować migrację.
MIC 0,064 µg/ml.



Rys. 8.
Zignorować hemolizę;
odczytać zahamowanie
wzrostu.
MIC 0,032 µg/ml.

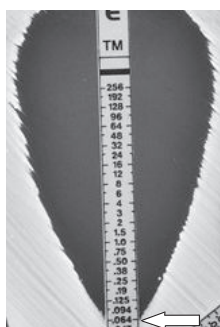


Rys. 9.
Pochylić płytkę lub
użyć lupy, aby dostrzec
punktowe kolonie
i zamglenia w przypadku
przykładowo
enterokoków,
pneumokoków,
wrzecionowców
i *Stenotrophomonas* spp.
MIC 1 µg/ml.

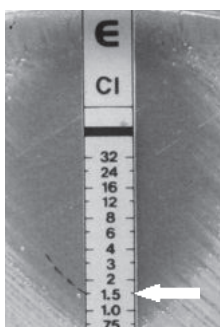


Rys. 10.
Szczegółowo
przeanalizować punkty
końcowe antybiotyków
β-laktamowych
w przypadku
pneumokoków
pod kątem zamglenia
i mikrokolonii.
MIC 2 µg/ml.

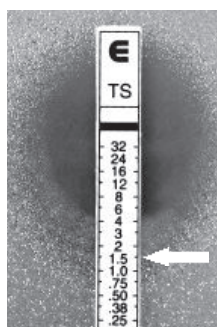
WYNIKI ZWIĄZANE Z LEKAMI



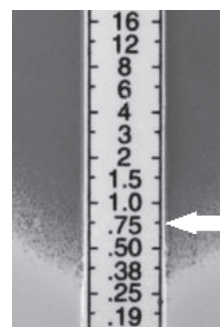
Rys. 11.
Leki bakteriobójcze
dają ostre punkty
końcowe MIC.
MIC 0,064 µg/ml.



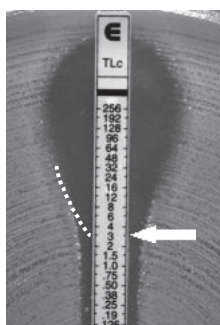
Rys. 12.
Leki bakteriobójcze;
odczytać przy
pełnym
zahamowaniu zamglenia
i mikrokolonii.
MIC 1,5 µg/ml.



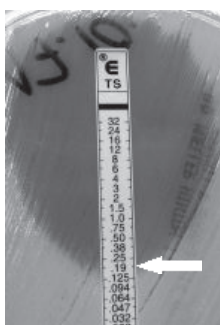
Rys. 13.
Leki bakteriostatyczne;
odczytać przy 80%
zahamowania.
MIC 1,5 µg/ml.



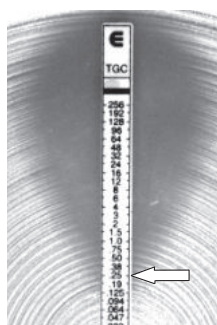
Rys. 14.
Linezolid; odczytać
przy 90% zahamowania
(zignorować
delikatniejsze zamglenia
i punktowe kolonie).
MIC 0,75 µg/ml.



Rys. 15.
Inhibitory β-laktamazy
np. tazobaktam;
ekstrapolować górną
krzywiznę do paska.
MIC 3 µg/ml.



Rys. 16.
Trim/sulfa; odczytać
przy 80% zahamowania
(zignorować murawę
zamglenia w obrębie
elipsy).
Stenotrophomonas spp.
MIC 0,19 µg/ml.

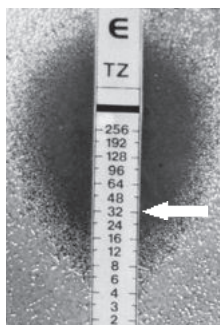


Rys. 17.
Tigecyklina; odczytać
przy 80% zahamowania
(zignorować
indywidualne
mikrokolonie lub
zamglenia).
MIC 0,25 µg/ml.

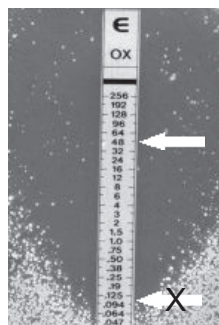


Rys. 18.
Polipeptydy; odczytać
na poziomie dolnej
części załamania, jeżeli
nie występują kolonie.
MIC 0,38 µg/ml.

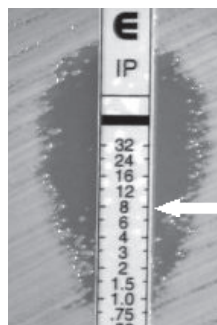
WYNIKI ZWIĄZANE Z MECHANIZMEM OPORNOŚCI



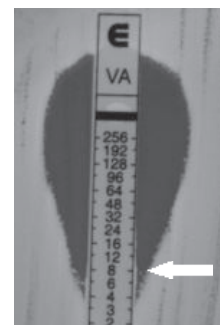
Rys. 19.
Warianty małych kolonii i leki bakteriobójcze; odczytać przy pełnym zahamowaniu wzrostu.
MIC 32 µg/ml.



Rys. 20.
Izolowane kolonie w przypadku oksacyliny mogą reprezentować heterooporne subpopulacje, np. ORSA.
MIC 48 µg/ml.

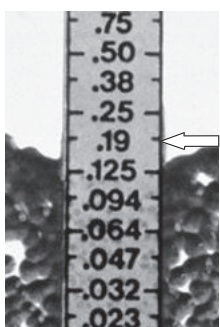


Rys. 21.
Izolowane kolonie w przypadku karbapenemów mogą reprezentować oporne subpopulacje np. KPC.
MIC 8 µg/ml.

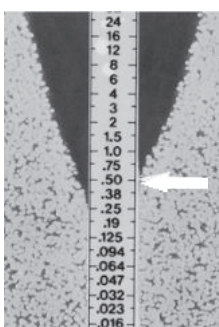


Rys. 22.
Migracja wzrostu (zamglenia, mikrokolonie, makrokolonie) reprezentują populację VISA/hVISA.
MIC 8 µg/ml.

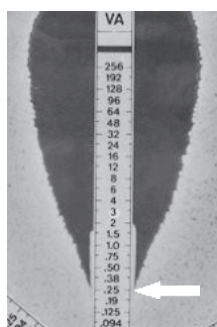
WYNIKI ZWIĄZANE Z TECHNIKĄ I OBSŁUGĄ



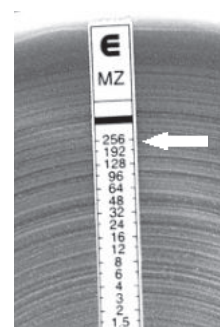
Rys. 23.
Przecięcie pomiędzy oznaczeniami podziałki, odczytać wyższą z wartości.
MIC 0,19 µg/ml.



Rys. 24.
Nierówne przecięcia; odczytać wyższą z wartości. Jeżeli >1 rozcieńczenie, powtórzyć test.
MIC 0,5 µg/ml.



Rys. 25.
Zignorować ciekłą linię wzrostu wzdłuż paska.
MIC 0,25 µg/ml.



Rys. 26.
Pełny wzrost wokół paska.
MIC ≥ 256 µg/ml.

INDEKS SYMBOLI

| Symbol | Znaczenie |
|--------|-----------------------------------|
| REF | Numer katalogowy |
| IVD | Wyrób do diagnostyki In Vitro |
| | Producent |
| | Przestrzegać zakresu temperatury |
| | Górna granica temperatury |
| | Użyć przed |
| LOT | Kod partii |
| | Sprawdź w instrukcji obsługi |
| | Wystarczy na wykonanie <n> testów |

BIOMERIEUX, logo BIOMERIEUX, ETEST, pasek gradientowy ETEST NEMA C88, SIMPLEX C76, RETRO C80, VITEK i LYFOCULTS są znakami towarowymi używanymi, w trakcie rejestracji i/lub zastrzeżonymi, należącymi do bioMérieux, jednego z jego podmiotów zależnych lub jednej z jego firm.

CLSI jest znakiem towarowym należącym do Clinical Laboratory and Standards Institute, Inc.

Wszelkie inne nazwy i znaki handlowe należą do odpowiednich właścicieli.

Zdjęcia: bioMérieux SA