

사용방법

가. 검체 준비 및 저장방법

1. 검체준비

사람유래의 검체로부터 순수하게 분리된 집락을 사용한다. 적합한 절차에 따라 검체를 채취하고 운반하여 일차 분리 배지에 놓아야 한다. 모든 Sensititre 배지는 항생제 감수성 검사에 사용하기 위해 성능 테스트를 거친다. 배지는 Sensititre Saline Tween With Glass Beads 와 Sensititre Middlebrook 7H9 Broth With OADC만 사용한다.

2. 저장방법

플레이트는 반드시 실온(15-25°C)에 두어야 하며, 직접적인 햇빛이나 열은 피해야 한다. 각 플레이트는 Silica Gel 건조제와 함께 싸서 포장해야 한다. 유효기간이 지난 플레이트 및 시약은 사용해서는 안되며 건조제 색이 오렌지색이 아니거나 파우치가 손상되었으면 사용하지 않는다.

파우치 제거 후 5시간 이내에 사용해야한다.

Middlebrook 7H9 w/OADC는 2-8°C에서 보관한다. 유효기간은 권고되는 방법으로 저장된 미개봉 튜브에 적용한다.

Glass Beads 가 포함된 Saline Tween은 15-25°C에서 보관한다. 유효기간은 권고되는 방법으로 저장된 미개봉 튜브에 적용한다.

나. 검사 전 준비사항

1. 사용 장비의 준비과정

Sensititre Vizion (세균감수성시험장치, 수신 18-789 호)의 장비매뉴얼을 참고한다.

2. 시약 및 기구

Middlebrook 7H9 with OADC (T3441, 미생물염색및배양시약, 수신 18-770 호), Sensititre Saline Tween with Glass beads (T3490)

3. 패널의 준비

1) 사용할 패널을 파우치에서 꺼낸다.

2) 다음과 같은 경우 패널을 사용하지 않는다.

- 유효기간이 지난 경우
- 건조제의 색이 변한 경우
- 파우치가 파손된 경우

3) 파우치에서 꺼낸 뒤, 5시간 내에 접종을 해야 한다.

다. 검사과정

1. 접종 및 배양

모든 Broth 는 사용 전 실온상태가 되도록 해야 한다.

1) 한천 플레이트에서 자란 집락을 긁어 0.2% Tween 과 Glass Beads 가 포함된 Saline 에 유화시킨다.

Note : 검사를 위한 배양은 5주 이상 지나서는 안된다.

2) 최소 30초 이상 Vortex 한다.

3) 육안 또는 Sensititre Nephelometer 를 이용하여 0.5 McFarland Standard 와 혼탁도를 동일하게 맞춘다. Sensititre Nephelometer 를 사용할 경우, 장비는 0.5 Polymer McFarland Standard 로 보정한다. 그

대로 15분간 방치하여 아래로 가라앉게 한다.

4) 위 현탁액 100 μ l를 따서 Sensititre Middlebrook 7H9 with OADC (T3441, 미생물염색및배양시약, 수신 18-770 호)가 든 튜브로 옮겨 1x10⁵ cfu/ml 농도로 접종하고(Range 5x10⁴ ~ 5x10⁵ cfu/ml) 30초간 Vortex 한다. 위의 1)~4) 과정은 30분 내에 완료해야 한다.

5) 알맞은 Multi-Channel Pipette 을 사용해 플레이트에 접종한다. 각 Well 당 100 μ l씩 접종한다. Sensititre 라벨이 사용자를 향하도록 패널을 놓고 투여한다. Pipette 은 보정을 위해 주기적으로 교정과 검정을 실시한다. Sensititre AIM 을 사용할 경우, 접종과정 동안 Dosehead 를 사용한다. Dosehead 와 결합된 실험 튜브는 Plate 에 투여 후 30초 안에 AIM 으로부터 꺼내고 렉에 뒤집어 보관하거나 버린다. **용액은 30분 내에 Sensititre Plate 에 접종한다.**

6) 주기적으로 Positive Control Well 로부터 얻은 집락의 개수를 이용해 접종액의 밀도를 확인해야 한다. (표. 집락의 수 참조) 1x10⁵ cfu/ml(Range 5x10⁴ ~ 5x10⁵)의 접종액 농도여야 한다.

7) 부착 Seal 을 이용해 모든 Well 을 덮어준다. 모든 Well 이 잘 덮였는지 확인하기 위해 눌러서 확인한다. 주름이 생기지 않도록 주의해야 한다. 주름이 있을 경우 결과 판독시 'Skip'이 될 수 있다. 배양기로 옮기기 전에 살균제로 밀폐된 Plate 를 닦는다. 권장하는 살균제는 AmphyI 과 같은 페놀화합물을 포함한다.

8) Plate 는 35-37°C로 유지하여 10일 동안 호기성으로 배양하고, 10일 차에 성장을 확인한다. 10일이 지난 후에도 성장이 잘 형성되지 않았으면 추가적으로 11일까지 재배양한다. Plate 는 배양동안 2층 높이까지 쌓을 수 있다.

2. 순도 확인

한 개의 균주만 자라는 것을 확인하기 위해 순도 확인이 필요하다.

Sensititre Middlebrook 7H9 with OADC 현탁액으로부터 50 μ l를 따서 Blood Agar(BAP) 와 Middlebrook 7H10 Plate 에 Streaking 한다. BAP 에 접종한 Plate 는 35-37°C에서 48-72시간 동안, 7H10 Plate 는 최대 8주까지 배양한다.

3. 집락 수 확인 방법

1) Plate 에 접종 직후, 1 μ l Loop 를 이용해 Positive Growth Control Well 에서 검체를 채취해서 Middlebrook 7H10 Agar Plate 에 접종한다.

2) 다른 Loop 를 이용해(1 μ l) 같은 Growth Well 에서 검체를 채취하여 50 μ l 멸균 탈이온수에 넣어 잘 섞어준다. 이 희석액에서 1 μ l를 따서 Middlebrook 7H10 Agar Plate 에 접종하여 수적 확인 가능한 집락을 얻는다.

3) 두 Plate를 35-37°C에서 최대 14일까지 적절한 조건하에 배양한다.

4) 다음과 같이 판독한다.

<표. 집락의 수>

Colony Count	0.001 Plate	1/50 희석액의 0.001
< 5 x 10 ⁴	50 미만	0
5 x 10 ⁴	50~100	0~2
1 x 10 ⁵ - 5 x 10 ⁵	100 초과	10 이하
> 5 x 10 ⁵	100 초과	10 초과

라. 결과 판정

결과는 Sensititre Manual Viewer 나 Vizion 을 통해 판독할 수 있다. Vizion 사용설명서를 참조한다. Seal 을 뜯어낼 필요는 없다. Plate 의 Label 이 사용자쪽으로 향하게 놓는다. 성장은 혼탁도나 Well 의 바닥에 Cell 이 모여있는 것으로서 확인할 수 있다. MIC 는 육안으로 성장이 관찰되지 않는 최소의 항생제 저해 농도로 기록한다. 어두운 환경에서 밝은 간접적인 빛을 사용할 경우 Vizion에서 희미한 성장을 읽을 수 있다. Positive Growth Control Well 을 반드시 처음으로 읽어야 한다. 만약 어떠한 성장도 볼 수 없다면, 결과값은 무효하다. *Mycobacteria* 의 End Point 는 판독하기 어려울 수 있다. 이미 알려진 MIC 을 가진 QC 균주를 판독하는 것으로 트레이닝 할 수 있다. *M.tuberculosis*의 다른 균주 뿐만 아니라 QC 균주와 PAS의 사용시 희미한 성장(Trailing)이 있을 수 있다.

아래의 Point 는 반드시 확인되어야 한다.

1) Contamination

Contamination 은 옆의 경계 Well 들에선 성장이 관찰되지 않고, 한곳의 Well 에서만 성장이 관찰될 때 결과값으로 나타날 수 있다. 1개의 Well 만 오염 되었다면 무시할 수 있지만, 여러 Well 에서 나타난다면 해당 검사는 다시 시험해야 한다.

2) Skips

종종 "Skip"이 나타나는 경우가 있다. 옆의 경계 Well 에서는 성장이 관찰되었는데, 해당 Well 에서는 성장이 관찰되지 않았을 때이다. 이는 오염, 변이, Seal 이 접혔거나 불균등한 투여 등의 다양한 해석이 가능하다. 1개의 Skip 은 무시할 수 있다. 그러나 효과적인 항생제 치료를 위한 검사일 경우에는 절대 Skip Well 을 MIC 로 읽어서는 안되며, 항상 일정하게 성장이 없는 well보다 위에 있는 가장 낮은 well 의 농도를 읽어야 한다.

3) Mixed Cultures

위의 1)항을 제외하고 만약 연속적인 Well 에서 "Button" 형태의 성장이 보이지 않는데 (또는 비교적 작은 "Button") 2개의 End-point 에서 뚜렷한 "Button" 형태가 나타난다면, 미생물 집단이 섞인 것일 수 있다. 적당한 Agar Plate 에 계대배양을 통해 순도 확인을 하고, Mixed Culture 로 확인이 되면, 검사결과는 무효화해야 한다.

마. 정도관리

정도관리 검사의 주기는 각 실험실 가이드라인에 따라 진행한다. 정도관리 균주는 순도 확인 및 집락의 형태학적 구성을 파악하기 위해 적당한 배지에서 배양해야 한다. Mixed Culture 로 확인되면 검사결과는 무효화한다.

모든 Sensititre Plate 에는 양성대조 Well 이 포함되어 있다. 만약 모든 양성대조 Well 에서 뚜렷한 성장 반응이 보이지 않는다면 모든 검사결과는 무효화 한다.

균주의 상태, 접종 농도, 온도, 배지 등 MIC 값에 영향을 미치는 다양한 요소가 있다. 실제로, 반복적인 MIC 는 대부분의 결과값이 Modal Value인 한 희석농도 내에 떨어지며 정상분포를 형성한다. 만약 정도관리 균주의 MIC 값이 범위 안에 들어오면 시험과정은 적합하다고 생각할 수 있으나, 그렇지 않을 경우, 결과값은 보고해서는 안된다.

Table 1은 *Mycobacterium tuberculosis* 균주들을 이용한 잠정적인 QC Range 이다. 이 균주들에 대한 접종과 결과판독 방법은 위에서 언급한 사용방법과 동일하다. CLSI M100 QC Strain을 사용하여 성능을 검사할 경우, 미생물 현탁액을 멸균수에서 준비하는 것만 제외하고는 사용방법이 동일하다. 50 μ l 현탁액을 10 ml의 Sensititre Mueller Hinton Broth 에 첨가한다. Plate 는 34°C-36°C에서 16-20시간 배양시킨 후에 판독한다.

<표. *M.tuberculosis* QC 균주들에 대한 정도관리범위 기대치¹>

Drug	<i>M.tuberculosis</i> ATCC 27294
Amikacin	0.25-2
Cycloserine	4.0-16.0
Ethionamide	0.6-5
Ethambutol	≤ 2
Isoniazid	≤ 0.5
Kanamycin	0.6-5
Moxifloxacin	≤ 0.5
Ofloxacin	0.5-2
PAS	≤ 0.5
Rifampin	≤ 0.5
Rifabutin (Ansamycin)	≤ 0.12
Streptomycin	0.5-2

주¹: Ranges based on in-house testing

사용시 주의사항

가. 일반적 주의사항

- 본 제품은 체외진단용(전문가용)으로만 사용해야 한다.
- 본 제품은 일회용으로 재사용하지 않는다.
- 본 제품을 분해하여 사용하거나 복용하는 등의 사용은 심각한 사고를 유발할 수 있으므로 절대 용도 이외의 사용을 하지 않는다.
- 라벨에 있는 유효기간을 확인하고 사용하도록 하며, 유효기간이 경과된 제품은 사용하지 않는다.

나. 실험실 주의사항

- 본 제품은 균주에 대한 실험과 적절한 방지에 대해 설계된 실험실에서 균주를 다루는 데에 숙련된 사람만이 사용할 수 있다.
- 검체와 시약을 다룰 때에는 보호 장갑/보호 안경/검사용 가운을 착용하도록 한다.
- 검체와 시약을 다룬 이후에는 반드시 손을 깨끗이 씻도록 한다.
- 시약과 환자의 검체를 다룰 때에는 일반적인 안전규정과 실험실 규정을 숙지해야 한다.
- 입으로 피펫을 사용하지 않는다.
- 검체 또는 시약을 취급하는 장소에서는 음식을 먹거나 흡연을 해서는 안 된다.
- 검사에 사용된 모든 자재는 생물학적 감염 폐기물로 폐기한다.
- *M.tuberculosis* 를 취급하기 위한 적절한 생물학적 안전 가이드라인에 따라야 한다.

다. 시약 사용상의 주의사항

- 검사 결과를 적절하게 해석하기 위해 훈련된 임상실험 수행자가 필요하다.
- Plate 는 직사광선과 직접 열을 피하고 실온(15-25°C)에서 보관하여야 한다.
- 플레이트 호일 내 포함되어 있는 지시제의 오렌지색이 아니거나 파우치가 손상되었으면, 사용하지 않는다.
- 파우치에서 꺼낸 뒤, 5시간 이내에 접종해야 하고 배지에서 플레이트로 접종할 때에는 30분 이내에 수행해야 한다.
- 접종물의 준비와 Plate 의 접종은 적절한 규정에 따라 생물학적 안전장치 내에서 수행해야 한다.
- 다른 로트의 시약과 혼합하여 사용하지 않는다.
- Sensititre 전용 장치만을 이용해 판독해야 한다.
- *M.tuberculosis* 외의 미생물에 대해서는 본 제품을 사용하여 실험하지 않는다.
- 7H9 배지에 OADC 가 첨가되지 않은 경우 결과는 무효하다.

라. 검체 취급 및 보관상의 주의사항

- 모든 검체는 잠정적인 감염원으로 인지하여 취급해야 한다.
- 검체는 표준방법에 따라 채집, 운반, 보관해야 하고 Colony 를 분리해 내어 일차 분리 배지에 옮기도록 해야 한다.
- 이 제품에 사용되는 미생물의 경우 사용자에게 감염성이 있으므로 적절한 사용방법과 처리방법을 따라야 한다.

마. 기타 주의사항

- 본 시약으로 얻은 검사 결과를 통해 최종진단을 내리기 전에 항상 임상 결과/환자의 병력 등 다른 사항을 고려하여 최종 진단하여야 한다.

- 모든 플레이트는 폐기하기 전 고압 멸균하여 폐기하도록 한다.
- 일반적인 실험실 주의사항을 준수한다.