

사용방법

1. 검체 준비 및 저장방법

사람유래의 검체로부터 순수하게 분리된 집락을 사용한다. 적합한 절차에 따라 검체를 채취하고 운반하여 일차 분지 배지에 놓아야 한다.

Rapidly growing mycobacteria를 채집하기 위한 배지는 Sensititre CAMHBT를 이용하도록 한다.

2. 검사 전 준비사항

<사용 장비의 준비과정>

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

<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.

3. 검사과정

<접종 및 배양>

모든 Broth는 사용 전 실온상태가 되도록 해야 한다.

- 1) 면봉을 이용해 한천플레이트에서 자란 집락을 긁어 탈이온수에 유화시키고 0.5 McFarland Standard의 혼탁도와 동일하게 맞춘다. 이때 육안으로 맞추거나 Sensititre Nephelometer를 이용할 수 있다. 만약 입자가 육안으로 확인이 되면 vortex를 잘 해준다. 균일한 현탁액을 만들기 위해서 glass bead를 이용할 수도 있다. Vortexing후에도 큰 입자들이 계속 남아 있다면, 그대로 방치하여 아래로 가라앉게 한 뒤 상층액을 접종에 이용하도록 한다.
면봉을 탈이온수로 적신 뒤 이용하면 더 균일한 액체를 만들 수 있다.
Tween이 첨가된 물은 MIC에 영향을 끼칠 수 있다.

- 2) 위 현탁액 50 μ l를 따서 cation adjusted Mueller-Hinton broth with TES 완충액이 담긴 tube에 넣어주어 접종액의 농도가 5x10⁵ cfu/ml (1x10⁵ -1x10⁶ cfu/ml)이 되게 한다. 그리고 잘 섞어준다.
위의 1)~2) 과정은 30분 내에 완료해야 한다.
- 3) Doxycycline이나 minocycline이 32 μ g/ml이상이 포함된 well에서 배양 후 침전물이 나타날 수도 있다. 이런 현상은 broth를 첨가하기 전 멸균증류수 5 μ l를 넣어 수화시켜 예방할 수 있다.
- 4) 각 well 당 100 μ l씩 접종한다. 접종시에는 Sensititre AutoInoculator나 AIM을 이용해 자동적으로 진행하거나, 수동으로 pipette을 이용해 접종할 수 있다.
Broth에서 plate로 접종을 할 때에는 30분 내에 수행해야 한다.
- 5) 주기적으로 positive control well로부터 얻은 집락의 개수를 이용해 접종액의 밀도를 확인해야 한다.(집락수 확인방법 참조) 5x10⁵cfu/ml(1x10⁵~ 1x10⁶cfu/ml)의 접종액이 포함되어야 한다.
- 6) Well을 모두 덮을 수 있도록 seal을 이용해 덮어준다. 모든 well을 덮었는지 확인한다. 주름이 생기지 않도록 주의해야 한다. 주름이 있을 경우 결과 판독시 'skip'이 될 수 있다.

7) 플레이트는 호기적으로 배양이 되어야 하는데, non-CO₂ 배양기에서 30°C로 유지하여 72시간 동안 배양한다. Positive control에서 배양이 잘 이루어졌으면 결과를 판독하고, 그렇지 않으면 48시간을 추가적으로 배양한다. *Nocardia*와 다른 호기성 Actinomycetes는 non-CO₂ 배양기에서 35°C로 유지하여 2~3일 동안 배양한다. *M.chelonae*와 *M.abscessus*의 분리균의 경우는 4~5일의 배양시간이 필요하다.

* CLSI는 색소가 없는 rapidly growing Mycobacteria는 macrodile에 내성임을 확인하기 위해서 14일까지 배양할 것을 권장하고 있다.

* Plate는 3개까지 쌓아서 배양할 수 있다.

<집락 수 확인 방법>

- 1) 1 μ l loop를 이용해 positive growth control well에서 검체를 채취해서 각각에 맞는 배지에 접종한다.
- 2) 다른 loop를 이용해 같은 growth well에서 검체를 채취하여 50 μ l 멸균탈이온수에 넣어 잘 섞어준다. 이 희석액에서 1 μ l를 따서 집락균에 적합한 적절한 배지 플레이트에 접종한다.
- 3) 35°C에서 하루(overnight) 배양한 뒤, 결과를 판독했을 때, 아래의 기준에 맞아야 한다.

집락의 수

Colony Conut	0.001 plate	1/50 희석액의 0.001
< 5 x 10 ⁴	50 미만	0
5 x 10 ⁴ ~ 1 x 10 ⁵	50~100	0~2
1 x 10 ⁵ ~ 5 x 10 ⁵	100~500	10 이하
> 5 x 10 ⁵	500 초과	10 초과

4. 결과 판정

결과는 Sensititre manual viewer나 VIZION을 통해 판독할 수 있다. Seal을 뜯어낼 필요는 없다. 플레이트를 Sensititre barcode label이 사용자쪽으로 오게 하여 놓는다. 성장은 well의 혼탁여부나 바닥에 cell이 모여있는 것을 확인함으로써 확인할 수 있다. MIC는 육안으로 성장이 관찰되지 않는 최소의 항생제 저해농도를 의미한다.

CLSI M24의 가이드라인을 참고하도록 한다.

양성대조 well을 반드시 처음으로 읽어야 한다. 만약 양성대조 well에서 성장이 없으면 결과값은 무효하다.

Mycobacteria의 end point는 판독하기 어려울 수 있다. CLSI M24는 다양한 성장패턴을 통한 판독 가이드라인을 제공한다. 이미 MIC가 알려진 QC strain을 판독하여 트레이닝 하도록 한다.

아래의 point는 반드시 확인되어야 한다.

a. contamination

Contamination은 옆의 경계 well들에서는 성장이 관찰되지 않았는데, 한곳의 well에서 성장이 관찰될 때 결과값으로 나타날 수 있다. 1개의 well만 contamination이 되었다면 무시할 수 있지만, 여러 well에서 나타난다면 해당 검사는 다시 시험해야 한다.

b. Skips

종종 "Skip"이 나타나는 경우가 있다. 옆의 경계 well에서는 성장이 관찰되었는데, 해당 well에서는 성장이 관찰되지 않았을 때이다. 이는 오염, 변이, seal이 접혔거나 하는 등의 다양한 해석이 가능하다. 1개의 skip은 무시할 수 있다. 그러나 효과적인 항생제치료를 위한 검사일 경우에는 skip well은 절대 읽어서는 안되며, 항상 가장 낮은 농도보다 성장이 없는 그 위의 농도값을 판독하여야 한다.

c. Mixed cultures

위의 a.항을 제외하고 만약 2개의 end point가 나타난다면 다양한 미생물이 자란 것일 수 있다. 적당한 agar plate에 계대배양을 해서 순도확인을 하고, mixed culture로 확인이 되면, 검사결과는 무효화해야 한다.

<Indications for Use>

항생제종류	RGM	NOC	SGM ¹	SGM ²	MAC
Amikacin	X	X	XX	X	
Amoxicillin/Clavulanic Acid	XX	X			
Capreomycin					
Cefepime		XX			
Cefoxitin	X				
Cefotaxime		XX			
Ceftriaxone		X			
Ciprofloxacin	X	X	XX	X	
Clarithromycin	X	X	XX	X	X
Clofazimine	X			X	X
Doxycycline	X	XX			
Ethambutol			XX	X	
Ethionamide					
Gentamicin		XX			
Imipenem	X	X			
Isoniazid			XX	XX	
Kanamycin					
Levofloxacin	X				
Linezolid	X	X	XX	X	
Meropenem	XX	XX			
Minocycline	X	X	XX	X	
Moxifloxacin	X	X	XX	X	
Ofloxacin					
Rifabutin			XX	X	
Rifampin			X	X	

Streptomycin			XX	XX	
Sulfamethoxazole	X	X	XX	XX	
Tigecycline	X				
Tobramycin	X	X			
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	X	X	XX	X	

RGM : Rapid growing mycobacteria

NOC : *Nocardia* spp.

SGM : Slow growing mycobacteria

MAC : *M.avium* complex

X : first line

XX : second line

1 : *M.kansasii*

2 : MAC나 *M.kansasii*가 아닌 slow growing mycobacteria

5. 정도관리

정도관리 균주는 순도확인을 위해 적당한 배지에서 배양해야만 한다.

1. Mixed culture로 확인되면 검사결과는 무효화한다.
2. 모든 Sensititre Plate에는 양성대조 well이 포함되어 있다. 만약 양성대조 well에서 뚜렷한 성장반응이 보이지 않는다면 모든 검사결과는 무효화한다.
3. 만약 정도관리 균주의 MIC값이 범위안에 들어오면 시험과정은 적합하다고 생각할 수 있으나, 그렇지 않을 경우에 결과값은 보고해서는 안된다.

Table 1은 mycobacteria strain을 이용한 QC range이다. *S.aureus*와 다른 non-mycobacterial QC strains, 그리고 CLSI M100의 범위를 panel QC에 이용할 수 있다. (Table 2)

CLSI M100 QC strain은 사용방법과 동일하게 사용하되 첨가제 OADC를 넣지 않도록 해야 한다. 35°C 에서 18-24시간 배양 후 결과 판독하도록 한다.

M.avium 700898 QC strain은 35°C, non-CO2 배양기에서 7일간 배양 후 결과 판독하도록 한다. 양성 대조균이 잘 성장하였으면 결과를 읽어주고, 그렇지 않으면 10일까지 배양한다.

Table 1. CLSI M100 QC range와 *S.aureus* ATCC 29213을 이용한 QC range

항생제	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>M.peregrinum</i> ATCC 700686	<i>M.smegmatis</i> ATCC 19420	<i>M.avium</i> ATCC 700898
Amikacin		≤1-4*	0.12-0.5	2-16
Amoxicillin/clavulanate 2:1	0.12/0.06-0.5/0.25			
Capreomycin	-	1.25-10	1.25-5	5-40
Cefotaxime	1-4			
Cefepime	1-4			
Cefoxitin	1-4*	4-32*		
Ceftriaxone	1-8			

Ciprofloxacin	0.12-0.5 [*]	≤0.12-0.5 [*]	0.25-1 ^{**}	2-16 ³
Clarithromycin	0.12-0.5 [*]	≤0.06-0.5 [*]		0.25-4 ³
Clofazimine		0.25-1	0.12-0.5	-
Doxycycline	0.12-0.5 [*]	0.12-0.5 [*]		≥2 ³
Ethambutol	-	2-16		2-16
Ethionamide	-	>20	20-80 ^{****}	0.6-5(7일 배양시) 1.25-10(10-11일 배양시)
Gatifloxacin	0.03-0.12	≤0.12 ^{**}	≤0.12 ^{**}	
Imipenem	0.015-0.06 [*]	2-16 [*]		
Isoniazid	-		1-4	≥1 ³
Kanamycin	1-4	1.25-10	≤0.06	1.25-10
Levofloxacin	0.06-0.5	0.12-0.5 ^{***}	0.12-0.5 ^{***}	
Linezolid	1-4 [*]	1-8 [*]		8-32 ³
Meropenem	0.03-0.12 [*]	2-16 [*]		
Minocycline	0.06-0.5 ⁴	0.12-0.5 [*]		
Moxifloxacin	0.015-0.12	≤0.06-0.25 [*]		0.25-4 ³
Ofloxacin	0.12-1	≤0.25-0.5	0.25-1	
Rifabutin	-	1-8	1-4	≤0.25-1 ³
Rifampicin	0.004-0.015	8-64	>16	≥1 ³
Streptomycin	-	16-64	0.5-2	4-32
Sulphamethoxazole	32-128 ⁺²	≤1-4 [*]		
Tetracycline	0.12-1			
Tigecycline	0.03-0.25			
Tobramycin	0.12-1 [*]	2-8 [*]		
Trimethoprim/ Sulphamethoxazole	≤0.5/9.5 [*]	≤0.25/4.8-2/38 [*]		0.25/4.8-2/38

Notes, ¹ CLSI M100 QC range

² *S.aureus*에 대한 sulfizoxazole에 대한 MIC range

³ Sensititre를 이용한 내부결과임. M.avium 700898을 이용한 MIC는 colony 형태에 영향을 받음

* CLSI M24 QC Range

** Reference 3 결과를 기초로 한 range

*** Reference 4 결과를 기초로 한 range

**** 배양시간에 의존적임. 72시간 배양시에만 근거하는 범위임.

Table 2. 추가적인 QC range¹

항생제	<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E.coli</i> ATCC 35218
Amikacin		0.5-4	1-4	

Amoxicillin/clavulanate 2:1	0.25/0.12-1/0.5	2/1-8/4		4/2- 16/8
Cefotaxime		0.03-0.12	8-32	
Cefepime		0.015-0.12	0.5-4	
Cefoxitin		2-8		
Ceftriaxone		0.03-0.12	8-64	
Ciprofloxacin	0.25-2	0.004-0.015	0.25-1	
Doxycycline	2-8	0.5-2		
Gatifloxacin	0.12-1	0.008-0.03	0.5-2	
Imipenem	0.5-2	0.06-0.25	1-4	
Kanamycin	16-64	1-4		
Levofloxacin	0.25-2	0.008-0.06	0.5-4	
Linezolid	1-4			
Meropenem	2-8	0.008-0.06	0.25-1	
Minocycline	1-4	0.25-1		
Moxifloxacin	0.06-0.5	0.008-0.06	1-8	
Ofloxacin	1-4	0.015-0.12	1-8	
Rifabutin		4-16 ²		
Rifampicin	0.5-4	4-16	16-64	
Streptomycin		4-16 ²		
Tetracycline	8-32	0.5-2	8-32	
Tigecycline	0.03-0.12	0.03-0.25		
Tobramycin	8-32	0.25-1	0.25-1	
Trimethoprim/ Sulphamethoxazole	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	8/152-32/608	

¹ CLSI M100 QC range² Sensititre를 이용한 내부결과임.

사용시 주의사항

1. 일반적 주의사항

- 본 제품은 체외진단용으로만 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.

2. 실험실 주의사항

- 본 제품을 이용하는 사람은 이 제품의 사용과 실험적 수행에 훈련된 사람이어야 한다.
- 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.
- Mycobacteria를 취급하기 위한 적절한 생물학적 안전 가이드라인에 따라야 한다.

3. 시약 사용상의 주의사항

- 본 제품을 이용하는 사람은 이 제품의 사용과 실험수행에 있어 훈련된 사람이어야 한다.
- Tween이 포함된 물을 사용할 경우 MIC에 영향을 끼칠 수 있다.
- 파우치에서 꺼낸 뒤, 5시간 이내에 접종해야 하고 Broth에서 plate로 접종할 때에는 30분 이내에 수행해야 한다.
- *M.chelonae*와 *M. abscessus*의 Imipenem에 대한 결과는 보고하지 않는다.
- Tobramycin은 *M.chelonae*를 위한 aminoglycoside계 항생제로 해당 미생물에 대해서만 보고해야 한다.
- 시약 내 포함되어 있는 지시제의 색깔이 파란색이 아니거나, 오렌지색이거나 파우치가 손상되었으면, 사용하지 않는다.
- 검사에 사용되는 검체를 포함한 모든 물품은 잠재적인 감염원으로 간주하고 처리하여야 한다.
- 다른 로트의 시약과 혼합하여 사용하지 않는다.
- Sensititre에서 제공하는 장비만을 이용해 판독해야 한다.

4. 검체 취급 및 보관상의 주의사항

- 모든 검체는 잠정적인 감염원으로 인지하여 취급해야 한다.
- 검체는 표준방법에 따라 채집, 운반, 보관해야 하고 colony를 분리해 내어 일차 분리배지에 옮기도록 해야 한다.

5. 기타 주의사항

- 본 시약으로 얻은 검사 결과를 통해 최종진단을 내리기 전에 항상 임상 결과/환자의 병력 등 다른 사항을 고려하여 최종 진단하여야 한다.
- 모든 plate는 폐기하기 전 고압멸균하여 폐기하도록 한다.
- 일반적인 실험실 주의사항을 준수한다.