

사용방법

가. 검체 준비 및 저장방법

1. 검체준비

사람 유래의 검체로부터 순수하게 분리된 집락을 사용한다. 적합한 절차에 따라 검체를 채취하고 처리한다. Thermo Fisher Scientific Sensititre Broth 를 Sensititre Susceptibility Plates 와 함께 사용한다.

2. 저장방법

플레이트는 원래 포장용기 안에서 실온(15 ~ 25°C)에 두어야 하며, 사용 전까지 직접적인 햇빛이나 열은 피해야 한다. 각 플레이트는 건조제와 함께 싸서 포장해야 한다.

나. 검사 전 준비사항

1. 사용 장비의 준비과정

Sensititre Vizion (세균감수성시험장치, 수신 18-789 호), Sensititre OptiRead (세균감수성시험장치, 수신 18-783 호), Sensititre ARIS 2X (세균감수성시험장치, 수신 18-788 호), Sensititre ARIS HiQ (세균감수성시험장치, 수신 19-2353 호)의 장비매뉴얼을 참고한다.

2. 시약 및 기구

Sensititre Demineralised Water (T3339, 별도판매구성품, 수신 18-778 호), Sensititre Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth with TES (CAMHBT) (T3462, 미생물염색및배양시약, 수신 18-773 호)

3. 패널의 준비

1) 사용할 패널을 파우치에서 꺼낸다.

2) 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

모든 Broth 는 접종 전 실온상태가 되도록 해야 한다.

■ 일반적 접종

순수하게 분리된 1차 한천 플레이트에서 Non-Fastidious 분리주 중 3~5개의 집락을 긁어, 멸균된 물에 유화시킨 뒤 McFarland 표의 0.5로 맞춘다. 잘 섞는다. 10 μ l의 McFarland Suspension 을 11 ml의 Cation Adjusted Muller Hinton Broth with TES Buffer 로 옮긴다.

■ 증가된 양의 접종 방법

검사하고자 하는 균주에 따라 30 μ l 정도로 접종액을 증가하면 저항균을 감지하는 데 더 도움이 될 수 있다. 그람양성균 또는 그람음성균을 접종하는 경우 11ml의 Sensititre Mueller-Hinton Broth Tube 에 30 μ l의 균주를 접종해 균주가 5.0x10⁴ cfu/ml ~ 5.0x10⁵ cfu/ml의 농도가 되도록 한다.

- 1) 다음의 두 방법 모두 현탁액 50 μ l를 준비한 후 30분 이내에 플레이트에 접종한다.
 - Sensititre AIM(자동분주기(V3020, 별도판매구성품, 수신 18-789 호)): 튜브의 Cap 을 일회용 Dosehead 로 바꾸고 Sensititre AIM 기기의 사용설명서에 따라 플레이트에 접종한다. 플레이트에 분주한 뒤 30초 이내에 Test Tube/Dosehead를 Sensititre AIM 으로부터 제거한다.
 - Manual Pipette: 배지를 살균된 Seed 에 붓고 적당한 피펫을 이용하여 플레이트에 접종한다.
- 2) 플레이트에 모든 최종 접종 후, 순도 체크를 진행한다.
- 3) 주기적으로 집락의 수를 확인한다. (집락 수 확인방법 참조) 분리주는 1x10⁵ cfu/ml로 접종한다. (Range: 5.0x10⁴ cfu/ml ~ 5.0x10⁵ cfu/ml). (Proteae 균주는 1x10⁴ cfu/ml로 예외적이다.)
- 4) 제공된 Adhesive Seal로 각 플레이트의 모든 well 을 덮는다. 구겨짐은 Skip 을 유도할 수 있으므로 피한다.
- 5) 플레이트는 파우치로부터 꺼낸 후 5시간 이내에 접종해야 한다.

2. 배양

- 1) 모든 Non-Fastidious 호기성 균주는 34 °C ~ 36 °C에서 Sensititre ARIS 2X, Sensititre ARIS HiQ 또는 Non-CO₂ Incubator 에서 (18 ~ 24)시간 동안 배양해야 한다. *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia cepacia* 및 *Stenotrophomonas maltophilia*는 (20 ~ 24)시간 동안 배양해야 한다.
- 2) 밀봉한 플레이트는 Sensititre ARIS 2X, Sensititre ARIS HiQ 에서 배양하지 않으면, 배양기간 동안 3 층 높이까지 쌓아둘 수 있다.

<표. 배양 조건 요약>

미생물군	McFarland 현탁용매	최종 접종농도* (cfu/ml)	접종량 (μ l)	배지	Plate 볼륨 (μ l)	배양조건	배양시간 (Hours)
Non-Fastidious Gram(-)	물	1 x 10 ⁵	10	MHB	50	35 °C, O ₂	18 ~ 24
Non-Fastidious Gram(+)	물	1 x 10 ⁵	10	MHB	50	35 °C, O ₂	18 ~ 24
접종량 추가 균주**	물	3 x 10 ⁵	30	MHB	50	35 °C, O ₂	18 ~ 24
Tribe Proteae	물	1 x 10 ⁴	1	MHB	50	35 °C, O ₂	18 ~ 24

* 집락 수 확인 방법에서 접종 범위를 확인한다.

** 테스트하는 균주에 따라 저항 메커니즘을 감지하기 위해 30 μ l까지 접종량을 늘릴 수 있다.

3. 집락 수 확인 방법

아래 두 가지 방법 모두 유효한 개수를 결정하는데 사용할 수 있다.

1) Direct Method

- ① 플레이트에 접종한 직후, 1 μ l Loop 를 사용하여 양성 대조군 Well 로부터 샘플을 따서 혈액 한천 배지에 접종한다.
- ② 다른 Loop 를 이용해(1 μ l) 같은 Growth Well 에서 검체를 채취하여 50 μ l 멸균 탈이온수에 넣어 잘

섞어준다. 셀수 있는 집락을 얻기 위해서 혈액한천배지에 이 희석액 1 μ l을 접종한다.

- ③ 두 Plate 를 (34 ~ 36°C) 에서 적절한 조건하에 Overnight 하여 배양한다.
- ④ 다음과 같이 판독한다.

<표. 집락의 수>

요구 접종액 농도	Colony Count	0.001 Plate	1/50 희석액의 0.001
1×10^4	$5 \times 10^3 - 5 \times 10^4$	5 - 50	0
1×10^5	$5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$	50 - 500	1 - 10
5×10^5	$2.5 \times 10^5 - 2.5 \times 10^6$	250 - 2500	5 - 50

2) In-Direct Method

- ① A. 1×10^5 cfu/ml 농도로 접종: 멸균 피펫 팁을 이용하여, 100 μ l의 배양액을 10 ml의 배지가 담긴 Tube 에 옮긴다. 이를 A라고 명칭한다.
B. 5×10^5 cfu/ml 농도로 접종: 멸균 피펫 팁을 이용하여, 10 μ l의 배양액을 10 ml의 배지가 담긴 Tube 에 옮긴다. 이를 A라고 명칭한다.
- ② 멸균 피펫 팁을 이용하여 A Tube 에서 100 μ l의 용액을 혈액한천 배지에 분주한 후 날짜와 라벨을 기입한다.
- ③ 멸균된 접종 Loop 를 이용하여 전체 플레이트 표면에 100 μ l의 용액을 도말한다.
- ④ 34 °C ~ 36 °C에서 (18 ~ 24)시간 동안 배양한다.
- ⑤ 플레이트의 집락수를 세고, 초기 용액의 유효수를 확인하기 위해 $10^3(1 \times 10^5$ cfu/ml) 또는 $10^4(5 \times 10^5$ cfu/ml)을 곱한다.

1×10^5 cfu/ml 접종	5×10^5 cfu/ml 접종
Viable Count Range = $(5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5)$ cfu/ml	Viable Count Range = $(2.5 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^6)$ cfu/ml

라. 결과 판정

순도 검사 플레이트를 확인한다. 만약 혼합된 배지가 발견되면 결과는 무효하다.

1. 자동화

플레이트는 SWIN HELP 파일을 사용하거나 사용자의 사용설명서에서 지시한 사항에 따라 Sensititre OptiRead, Sensititre ARIS 2X 혹은 Sensititre ARIS HiQ 장치를 사용하여 읽을 수 있다. Manual, SensiTouch (별도허가품목, 세균감수성시험장치) 또는 Sensititre Vizion 장치에만 사용할 수 있는 Sensititre Plate 는 Sensititre OptiRead, Sensititre ARIS 2X 혹은 Sensititre ARIS HiQ 장치에서 판독할 수 없다.

2. 수동화

배양 후, 결과는 Sensititre Manual Viewer 또는 Sensititre Vizion 을 이용하여 읽을 수 있다.

사용설명서를 참고한다. 부착된 Seal 을 제거할 필요는 없다. 성장은 혼탁도나 바닥에 Cell 이 붙은 것을 관찰함으로써 확인할 수 있다. MIC 는 성장의 저해를 확인할 수 있는 가장 낮은 항생제 농도를 의미한다. Sensititre Vizion 에서 희미한 성장은 빛을 조절함으로써 확인할 수 있다. 양성 대조 Well 은 가장 처음 읽어야 한다. 양성대조 Well 에서의 성장이 없으면 결과값은 무효하다.

아래의 Point 는 반드시 확인되어야 한다.

1) Fading End Points

대부분의 미생물/항생제 결합은 명확한 End-point 를 제시한다. 일부 결합은 (2 ~ 3)개 Well 에서 점진적인 성장이 나타날 수 있다. 이 경우, End-point 를 성장이 저해된 첫 번째 Well 로 고려한다.

2) 오염

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

3) 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 접종 등의 다양한 해석이 가능하다. 1개의 Skip 은 무시할 수 있다. 그러나 효과적인 항생제 치료를 위한 검사일 경우에는 Skip Well 을 MIC 로 절대 읽어서는 안되며, 항상 성장이 없는 가장 낮은 농도보다 위의 값을 판독하여야 한다.

4) 혼합배양

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 순도확인을 하고, Mixed Culture 로 확인이 되면, 검사결과는 무효화 한다.

3. 추가정보

1) MIC Results For ESBL Confirmation

ESBL에 Clavulanic Acid 만 단독으로 사용했을 때 보다, 다른 항생제와 결합하여 사용했을 때, ≥ 3 단위 이상의 2 Fold MIC가 감소하는 것을 확인했다.

예시 : Ceftazidime MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$, Ceftazidime / Clavulanic Acid MIC = 1 $\mu\text{g/ml}$.

자세한 사항은 CLSI M7을 확인한다.

마. 결과 해석

결과 해석을 위해 CLSI, EUCAST 또는 국가별 기준 가이드라인에서 제공하는 MIC 해석 기준을 참고한다. 플레이트에 포함된 항생제 중 모든 미생물에 대해 치료 효과가 없는 항생제가 있을 수 있다. *In Vitro* 및 *In Vivo* 임상실험에서 미생물 그룹에 효과적인 항생제 판단 여부는 FDA 에서 제공하는 Pharmaceutical Antimicrobial Agent 에 관한 사용설명서에 따라 해석하고 결과를 보고한다.

ESBL 확인 테스트 항생제 결과를 보고할 때, CLSI M100: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* 및 *Escherichia coli*의 ESBL에 대한 CLSI M100 선별 및 확인 테스트를 참고한다.

1) Breakpoint Results

Breakpoint 검사는 정성감수성 검사를 위한 배지 희석 방법이다. Sensititre Breakpoint 시스템은 감수성 테스트에 대한 간단한 기준 방법을 제공하기 위해 Breakpoint 농도 개념에 기초하여 개발되었다. Breakpoint 는 감수성이 있고 저항성이 없는 균주의 성장을 저해하는 항생제 농도를 의미한다. 대부분의

항생제에서 두 개의 농도가 사용된다.

- 낮은 농도: Susceptible Category 의 상한선으로 표시
- 높은 농도: Intermediate Category 의 상한선으로 표시

<표. 항생제의 Breakpoint 해석 방법>

결과	1 Well 해석	2 Well 해석
No Growth	Susceptible	-
Growth	Resistant	-
No Growth in Both Wells	-	Susceptible
Growth in Lower Concentration Only	-	Intermediate
Growth in Both Wells	-	Resistant
Growth in Higher Concentration Only	-	Invalid-Repeat

바. 정도관리

1. 정도관리 검사의 주기는 각 실험실 가이드라인에 따라 진행한다.
2. 정도관리 균주는 순도 확인을 위해 적절한 배지에서 배양해야 한다. 혼합배양으로 확인되면 검사 결과는 무효화한다.
3. 모든 Sensititre Plate 에는 양성대조 Well 이 포함되어 있다. 만약 모든 양성대조 Well 에서 뚜렷한 성장 반응이 보이지 않는다면 모든 검사결과는 무효화한다. 일부 플레이트는 음성대조 Well 을 포함한다. 이 Well 은 Sensititre OptiRead에서 대조균으로 사용될 수 있으며 수동으로 읽을 필요가 없다.
4. (16 - 24)시간 배양한 멸균된 한천 배지로부터의 (3 ~ 5)개의 집락, McFarland 표준, 비탁법, 온도, 배지와 같이 정확한 MIC 값에 영향을 미치는 다양한 요소가 있다. 실제로, 반복적인 MIC 는 대부분의 결과값이 Modal Value 인 한 희석농도 내에 떨어지며 정상분포를 형성한다.
5. 감수성 검사 절차를 모니터링하고 항생제의 효과를 확인 시, 정도관리 테이블에 기재된 기준 균주를 사용할 것을 권장한다. 만약 정도관리 균주의 MIC 값이 범위 안에 들어오면 시험과정은 적합하다고 생각할 수 있으나, 그렇지 않을 경우, 결과값은 보고해서는 안된다.

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.
- 균주를 취급하기 위한 적절한 생물학적 안전 가이드라인에 따라야 한다.

다. 시약 사용상의 주의사항

- 검사 결과를 적절하게 해석하기 위해 훈련된 임상실험 수행자가 필요하다.
- 항생제 감수성 테스트의 모든 다른 방법과 마찬가지로, Sensititre Susceptibility Plate 를 이용해 얻은 결과도 In Vitro Result 로 본다.
- Fastidious 균주 테스트는 특별한 절차가 필요하며 다른 방법으로 검사해야 한다. *Haemophilus influenzae* 균주는 해당 Sensititre MIC Plate를 사용한다.
- 플레이트는 직사광선과 직접 열을 피하고 실온(15-25°C)에서 보관하여야 한다.
- 각 플레이트는 건조제와 함께 호일에 쌓여 있으며, 유효기간이 넘어서 사용해서는 안된다. 만약 파우치가 손상되어 있거나 지시제의 색깔이 오렌지 색이 아니면, 사용하지 않는다.
- 파우치에서 꺼낸 뒤, 5시간 이내에 접종해야 하고 배지에서 플레이트로 접종할 때에는 30분 이내에 수행해야 한다.
- 접종물의 준비와 플레이트의 접종은 적절한 규정에 따라 생물학적 안전장치 내에서 수행해야 한다.
- 다른 로트의 시약과 혼합하여 사용하지 않는다.
- Sensititre 전용 장치만을 이용해 판독해야 한다.
- 제시된 균주 외의 미생물에 대해서는 본 제품을 사용하여 실험하지 않는다.

1. Gram Negative Limitations

- 1) *Proteus* spp. 종에 대한 Piperacillin/Tazobactam, Cefepime에 대한 평가는 수행되지 않았기 때문에 해당 균주-항생제에 대한 결과는 보고하지 않는다.
- 2) *Klebsiella* spp, Non-Fermenting 균주에 대한 Piperacillin/Tazobactam에 대한 판독은 반드시 육안으로 해야 한다. OptiRead 시스템의 성능 데이터가 없기 때문이다.
- 3) 다음의 항생제/균주 조합에 대한 결과는 시험당시 저항 균주가 부족하였으므로 보고하지 않는다.

균주	항생제
<i>Citrobacter</i> Species	Piperacillin / Tazobactam
<i>Serratia</i> Species	Piperacillin / Tazobactam
<i>Proteus</i> Species	Lomefloxacin
Non- <i>Enterobacteriaceae</i>	Levofloxacin

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.

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.