

MICRONAUT-S MRSA / GP



Nur zur *in vitro* Diagnostik

Deutsch

Revision A (Oktober 2018)

Mikrotitrationsplatten für die automatisierte oder manuelle Empfindlichkeitsprüfung von Gram-positiven Bakterien.

TESTPRINZIP

Die Empfindlichkeitsbestimmung mit den MICRONAUT-S MRSA / GP Testplatten beruht auf der Rehydratisierung von Antibiotika durch Zugabe einer standardisierten Bakteriensuspension. Das Ergebnis wird nach 18 - 24 Stunden Inkubation bei 35 - 37°C photometrisch gemessen und mit der MICRONAUT Software ausgewertet oder visuell abgelesen und interpretiert.

REAGENZIEN

Packungsinhalt

- Pro Mikrotitrationsplatte kann 1 Test durchgeführt werden.
- Eine Verpackungseinheit enthält 40 Testplatten.
- Abklebefolien (unperforiert)

Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Materialien

- Mueller Hinton Broth, cation adjusted (CAMHB)
- MICRONAUT-H Medium
- Lysiertes Pferdeblut für *Streptococcus pneumoniae* und andere anspruchsvolle Bakterien, Fa. Thermo Fisher Scientific (Fa. Oxoid) oder Fa. Fiebig-Nährstofftechnik
- NaCl 0,9%
- 1-Kanal-Reservoirs
- 8-Kanal-Pipette (100-1200 µl) inkl. Pipettenspitzen
- Photometer (validiert für MICRONAUT-Systeme)
- MICRONAUT Software

Die Artikelnummern der Reagenzien und Materialien sind über die lokalen Distributoren erhältlich.

Zusätzliche Labormaterialien

- Brutschrank
- McFarland Standard 0,5
- Blutagarplatten (ohne Zusatz)
- Impfösen
- Markierstift
- verstellbare Pipette (50-1000 µl)

ZUSAMMENSETZUNG DER MEDIEN

Medien	Bestandteile
NaCl 0,9%, 1l	Natriumchlorid
Mueller Hinton Broth (Kationen-adjustiert) 100 Röhrchen á 11,5 ml (± 0,5 ml) 20 Röhrchen á 11,5 ml (± 0,5 ml)	Fleischextrakt saures Casein-Hydrolysat Stärke
MICRONAUT-H Medium ¹ 100 Röhrchen á 11,5 ml (± 0,5 ml)	Glucose Haematin Neopepton Tween 80 Pyridoxal NAD Columbia Broth Base Hefeextrakt Agarose Type II A

¹Zusammensetzung vertraulich

Hinweis: Die Medienauswahl erfolgt in Abhängigkeit von der Testung nach internationalen Standards bzw. der Keimgruppe. Für aerobe, schnell wachsende Gram-positive Bakterien sollte Mueller Hinton Bouillon als Standardmedium verwendet werden. Bei besonderen Keimgruppen ist anzuraten der Bouillon Supplement zuzufügen.

Die Empfindlichkeitsprüfung mit **Daptomycin** erfordert die Verwendung von Kationen-adjustierter Mueller Hinton Bouillon.

HALTBARKEIT / LAGERUNG

MICRONAUT-S MRSA / GP Testplatten sind in der Originalverpackung bei 15-25 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Mueller Hinton Bouillon ist bei 15-25 °C, MICRONAUT-H Medium bei 2-8 °C zu lagern. Die Haltbarkeit der Medien ist der Produktkennzeichnung zu entnehmen. Für Reagenzien sind die auf den Produkten angegebenen Lagerbedingungen einzuhalten.

VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik verwenden.
- Die Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nur für die sachgemäße Verwendung bestimmt.
- Proben, Bakterienkulturen und die beimpften Testplatten müssen als potentiell infektiös und unter Beachtung entsprechender Vorsichtsmaßnahmen durch entsprechend qualifiziertes Fachpersonal sachgemäß behandelt werden. Während der gesamten Testdurchführung muss aseptisch gearbeitet werden. Informationen finden Sie in „BioSafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publikation No. (CDC) 99-8395, 4th Edition (April 1999)“, oder in den entsprechenden nationalen gesetzlichen Vorgaben.
- Den eingeschweißten Testplatten ist ein Indikatorbeutel mit Trockenmittel („Blaugel“) zugefügt. Das Trockenmittel enthält Kobaltchlorid. Bitte den Trockenbeutel nicht beschädigen. Ein Farbumschlag des Indikatorbeutels von blau nach rosa ist ein Anzeichen für Feuchtigkeitseintritt. Bitte diese Platte nicht verwenden.
- Nach Ablesung und Auswertung der Tests müssen alle Proben, beimpfte und kontaminierte Produkte (Pipettenspitzen, Reservoirs und Testplatten) autoklaviert, verbrannt oder mit einer bakteriziden Desinfektionslösung behandelt werden, bevor sie entsorgt werden.
- Die strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung ist unbedingt erforderlich, jede Abweichung kann die Qualität der Ergebnisse beeinflussen.
- Die Interpretation der Testergebnisse sollte durch geschultes, erfahrenes Personal auf dem Gebiet der Mikrobiologie erfolgen. Der klinische Hintergrund, Probenherkunft, Kolonie- und mikroskopische Morphologie und das Identifizierungsergebnis müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Probenvorbereitung

- Ein Röhrchen mit 1-5 ml NaCl 0,9%, pH 5,5 bis 6,5 bereitstellen.
- Ein Röhrchen des entsprechenden Mediums (Mueller Hinton Bouillon bzw. MICRONAUT-H Medium) bereitstellen.

Herstellung des Inokulums

- Mehrere einzeln liegende Kolonien einer Reinkultur, die nicht älter als 24 Stunden ist, vom Blutagar (ohne Zusatz) abnehmen.
- Die Kolonien in 1-5 ml NaCl 0,9% gut homogenisieren, bis die Trübung einem McFarland Standard von 0,5 entspricht.

Mueller Hinton Bouillon

- Gram-positive Bakterien:
100 µl der Bakteriensuspension in 11,5 ml Mueller Hinton Bouillon pipettieren und gut homogenisieren.
- Anspruchsvolle Bakterien (z. B. *Streptococcus pneumoniae* und andere anspruchsvolle Streptokokken):
200 µl der Bakteriensuspension in 11,5 ml Mueller Hinton Bouillon pipettieren. Für ausreichendes Wachstum von anspruchsvollen Bakterien ist der Mueller Hinton Bouillon lysiertes Pferdeblut zuzugeben. Die Endkonzentration des lysierten Pferdeblutes muss mind. 2,5% in dem Medium betragen (275 µl in 11,5 ml Mueller Hinton Bouillon). Das supplementierte Medium ist gut zu homogenisieren. Die Ablesung der MICRONAUT-S MRSA / GP Testplatte muss visuell erfolgen.
Hinweis: Eine photometrische Ablesung mit der MICRONAUT Software unter der **Testart „H“** ist möglich, wenn ausschließlich Pferdeblut der Firma Thermo Fisher Scientific (Fa. Oxoid) oder der Fa. Fiebig-Nährstofftechnik in der Endkonzentration von 2,5% verwendet wird.

MICRONAUT-H Medium

- MICRONAUT-H Medium für anspruchsvolle Bakterien (z. B. Corynebakterien, Listerien) und als alternatives Medium für Streptokokken:
200 µl der Bakteriensuspension in 11,5 ml MICRONAUT-H Medium pipettieren und gut homogenisieren.
Hinweis: MICRONAUT-H Medium als Testmedium für anspruchsvolle Bakterien (z.B. Streptokokken) darf nicht für die MHK-Bestimmung gegenüber Daptomycin eingesetzt werden. Die Empfindlichkeitsprüfung von Daptomycin erfordert die Verwendung von Kationen-adjustierter Mueller Hinton Bouillon.

Beimpfung

- MICRONAUT-S MRSA / GP Testplatte max. 30 Minuten vor Beimpfung aus der Einzelverpackung entnehmen und das Trockenmittel verwerfen.
- Die Testplatte beschriften.
- Die vorbereitete Suspension in ein 1-Kanal-Reservoir geben.
- Die Beimpfung der Mikrotitrationsplatte erfolgt manuell mit der 8-Kanal-Pipette mit 100 µl pro Kavität.

Versiegelung und Inkubation

Mueller Hinton Bouillon

- Nach dem Beimpfen die Testplatten mit einer unperforierten Abklebefolie verschließen oder mit einer unbenutzten Mikrotitrationsplatte abdecken (max. 5 Testplatten stapeln).
- Testplatten 18-24 Stunden bei 35-37 °C inkubieren.

MICRONAUT-H Medium

- Nach dem Beimpfen die Testplatten stapeln und die Oberste mit einer Mikrotitrationsplatte oder einem anderen Deckel abdecken. Nicht mit Folie verschließen (max. 5 Testplatten stapeln).
- Testplatten 22-24 Stunden bei 35-37 °C, wenn notwendig unter erhöhter CO₂-Spannung inkubieren.

Ablesung

- Abklebefolien entfernen.
- Testplatten von unten abwischen.
- Ablesung der Testplatten photometrisch oder visuell.

Auswertung

Die Wachstumskontrolle muss bewachen (trüb) sein, andernfalls muss der Test wiederholt werden.

Die Ergebnisse werden anhand einer photometrischen Messung bei einer definierten Wellenlänge ermittelt. Diese werden mit Hilfe der MICRONAUT Software ausgewertet, interpretiert und auf ihre Plausibilität überprüft (siehe Arbeitsanleitung MICRONAUT Software). Das Testergebnis wird am Bildschirm oder auf dem Befundausdruck dargestellt. Unter den Testergebnissen können Vermerke erscheinen, die z. B. Hinweise auf zu geringes Wachstum, den MRSA Phänotyp oder dokumentationspflichtige Keime etc. geben.

Bei der visuellen Ablesung sollten die Ergebnisse auf dem Layout-Ausdruck oder einem Auswertprotokoll protokolliert werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Breakpoint Interpretation: Antibiotika, die in zwei Konzentrationen getestet werden.

Visuelle Ablesung		Automatisierte Ablesung		Ergebnis	
1	2	1	2		
Kein Wachstum	Kein Wachstum	-	-	S	sensibel
Wachstum	Kein Wachstum	+	-	I	intermediär
Wachstum	Wachstum	+	+	R	resistent

1 = niedrige Breakpoint Konzentration

2 = hohe Breakpoint Konzentration

Erläuterungen

Zur Beurteilung der therapeutischen Erregerempfindlichkeit entnehmen Sie bitte die jeweiligen Grenzwertkonzentrationen der entsprechenden gültigen Norm (CLSI, EUCAST).

MHK-Wert

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, bei der kein bakterielles Wachstum festgestellt werden kann. Bakteriell Wachstum zeigt sich als Trübung des Mediums innerhalb bzw. als Zellablagerung (Knöpfchen-Bildung) am Boden der jeweiligen Kavitäten der Mikrotitrationsplatten. Voraussetzung für die Bestimmung von MHK-Werten ist eine positive (bewachsene) Wachstumskontrolle.

Springer

Vereinzelte kann es zum Auftreten von sogenannten „Springern“ innerhalb der Mikrotitrationsplatte kommen. Ein Springer äußert sich durch fehlendes Wachstum in einer oder mehreren Kavitäten innerhalb einer Antibiotikum-Konzentrationsreihe (übersprungene Kavität), während die Vertiefungen der nächst höheren / tieferen Konzentrationen Wachstum aufweisen. Die Gründe für das Auftreten von Springern können vielschichtig sein: Ausprägung von Heteroresistenzen, inhomogenes Inokulum bzw. Inokulation, inadäquate Befüllung der Mikrotitrationsplatten, Kreuzkontamination von Kavitäten durch Verschleppung von Antibiotika beim Pipettieren, Arbeiten mit Mischkulturen, Tropfen von Bakteriensuspension am Rand der Kavitäten, die keinen Kontakt mit dem Antibiotikum haben, etc..

Bei MICRONAUT-S MRSA / GP Testplatten kann ein einzelner Springer innerhalb einer Konzentrationsreihe ignoriert werden. Die Konzentration der Kavität, ab der durchgehend kein Wachstum mehr auftritt, kann als MHK-Wert abgelesen werden. Bei mehreren Springern innerhalb einer

Konzentrationsreihe ist der Testansatz zu wiederholen. Bei Breakpoint-Konzentrationen (maximal 2 Konzentrationen pro Antibiotikum) gilt, dass bei Vorliegen von Springern der Testansatz zu wiederholen ist.

Enterokokken Stämme

Die MICRONAUT-S MRSA / GP Testplatten sind bei der Testung von Enterokokken visuell zu überprüfen.

ERLÄUTERUNG DER ANTIBIOTIKA-KONFIGURATION DER MICRONAUT-S MRSA / GP TESTPLATTE

Die Antibiotikakonfiguration der MICRONAUT-S MRSA/GP Testplatte ermöglicht die gezielte Erfassung von klinisch relevanten Einzel- und Multiresistenzen bei Gram-positiven Erregern nosokomialer Infektionen. Durch die Empfindlichkeitsprüfung mit hochwirksamen Reserveantibiotika bestehen Alternativen bei ausgeprägter Multiresistenz.

Empfindlichkeitsprüfung von Staphylokokken

- Detektion von Staphylokokken-Penicillinasen durch Penicillin G-MHK-Bestimmung
- Detektion der Oxacillin-Resistenz durch Oxacillin- und Cefoxitin-MHK-Bestimmung
- Detektion der induzierbaren MLS_B -Resistenz durch Testung der Antibiotikakombination Erythromycin/Clindamycin
- Erfassung der phänotypischen Resistenzmuster epidemischer MRSA
- Testung von Reserveantibiotika

Empfindlichkeitsprüfung von Enterokokken

- Detektion der Ampicillin-Resistenz durch Ampicillin-MHK Bestimmung
- Erfassung der phänotypischen Glycopeptid-Resistenzmuster Vancomycin-resistenter Enterokokken durch Bestimmung der MHK gegenüber Teicoplanin und Vancomycin
- Detektion von HLAR-Stämmen durch Prüfung auf Hochresistenz gegenüber Gentamicin
- Testung von Reserveantibiotika

Empfindlichkeitsprüfung von Pneumokokken

- Detektion von PBP-Veränderungen durch Penicillin G-MHK-Bestimmung
- Detektion der Chinolon Gruppe IV-Resistenz durch Moxifloxacin-MHK-Bestimmung
- Detektion der Erythromycin-Resistenz
- Detektion der Vancomycin-Resistenz
- Testung von Reserveantibiotika

TECHNISCHE HINWEISE

Um bestmögliche Ergebnisse zu erhalten, beachten Sie bitte folgende Punkte der Gebrauchsanleitung genau:

- MICRONAUT-S MRSA / GP Testplatten sind nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Eine Wiederverwendung der Testplatten ist ausgeschlossen.
- Arbeiten Sie mit Reinkulturen von Blutagar (ohne Zusatz), die nicht älter als 24 Stunden sind.

Ausnahme: Anspruchsvolle Bakterien können nach 48 Stunden Inkubation bei 35-37 °C von einer Blutagarplatte (ohne Zusatz) entnommen werden.

- Wenn Sie keine Fertignährmedien verwenden beachten Sie bei der Herstellung der Medien die genaue Anleitung der Rezeptur.
- Achten Sie bei der Benutzung von Mueller Hinton Bouillon auf die korrekten Konzentrationen der zweiwertigen Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ (20 bis 25 mg Ca²⁺/l und 10 bis 12,5 mg Mg²⁺/l). Überprüfen Sie den pH-Wert der Mueller Hinton Bouillon, er sollte zwischen 7,2 und 7,4 bei Raumtemperatur (25°C) liegen.
- Verwenden Sie eine NaCl 0,9%, pH 5,5 - 6,5.
- Lagern Sie das MICRONAUT-H Medium bei 2-8 °C.
- Temperieren Sie das Medium vor Benutzung ausreichend (1 Stunde im Brutschrank).
- Beachten Sie die genaue Einstellung der NaCl Suspension auf McFarland Standard 0,5. Die hergestellte Suspension ist ausreichend zu homogenisieren.
- Überimpfen Sie die Bakteriensuspension zur Reinheitskontrolle auf eine Blutagarplatte (ohne Zusatz).
- Befolgen Sie die Inkubationszeiten. Die Inkubationszeit darf 18 Stunden bzw. bei anspruchsvollen Bakterien 22 Stunden nicht unterschreiten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Testplatten und Reagenzien unterliegen in verschiedenen Stadien der Produktion systematisch durchgeführten Qualitätskontrollen. Die bakteriologische Qualitätskontrolle kann mit folgenden Stämmen durchgeführt werden.

Stämme	ATCC Nr. ¹	DSMZ Nr. ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	DSM 2569
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	DSM 2570
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	DSM 11967

¹ATCC = American Type Culture Collection

²DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

QUALITÄTS- UND LEISTUNGSDATEN

Es gelten die allgemeinen Anforderungen nach DIN EN ISO 20776-1 und folgende. Bei der Auswertung der Kontrollstäme müssen die MHK- bzw. Breakpoint-Werte der eingesetzten Kontrollstäme innerhalb der in der entsprechenden Norm aufgeführten Grenzkontrollbereiche für den jeweils getesteten Wirkstoff liegen.

Achtung: Bei der Empfindlichkeitsprüfung von **Fosfomycin** kann es bei den Kontrollstämen zu Abweichungen von den MHK-Sollwerten kommen. Ursache der zu hoch gemessenen MHK-Werte ist die Ausprägung einer Heteroresistenz infolge resistenter Subpopulationen. Diese Abweichungen sind methodenspezifisch und beruhen auf der vergleichsweise hohen im Rahmen des Mikrodilutionsverfahrens vorgeschriebenen Bakterieneinsaat (siehe Ballesteros et al., 2017).

GEWÄHRLEISTUNG

Die Qualitätsdaten der MICRONAUT-S MRSA / GP Testplatte wurden mit Hilfe der vorliegenden Gebrauchsanleitung ermittelt. Abweichungen oder Änderungen in der Testdurchführung können die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen. Jegliche Entschädigungsansprüche sind in diesem Falle ausgeschlossen.

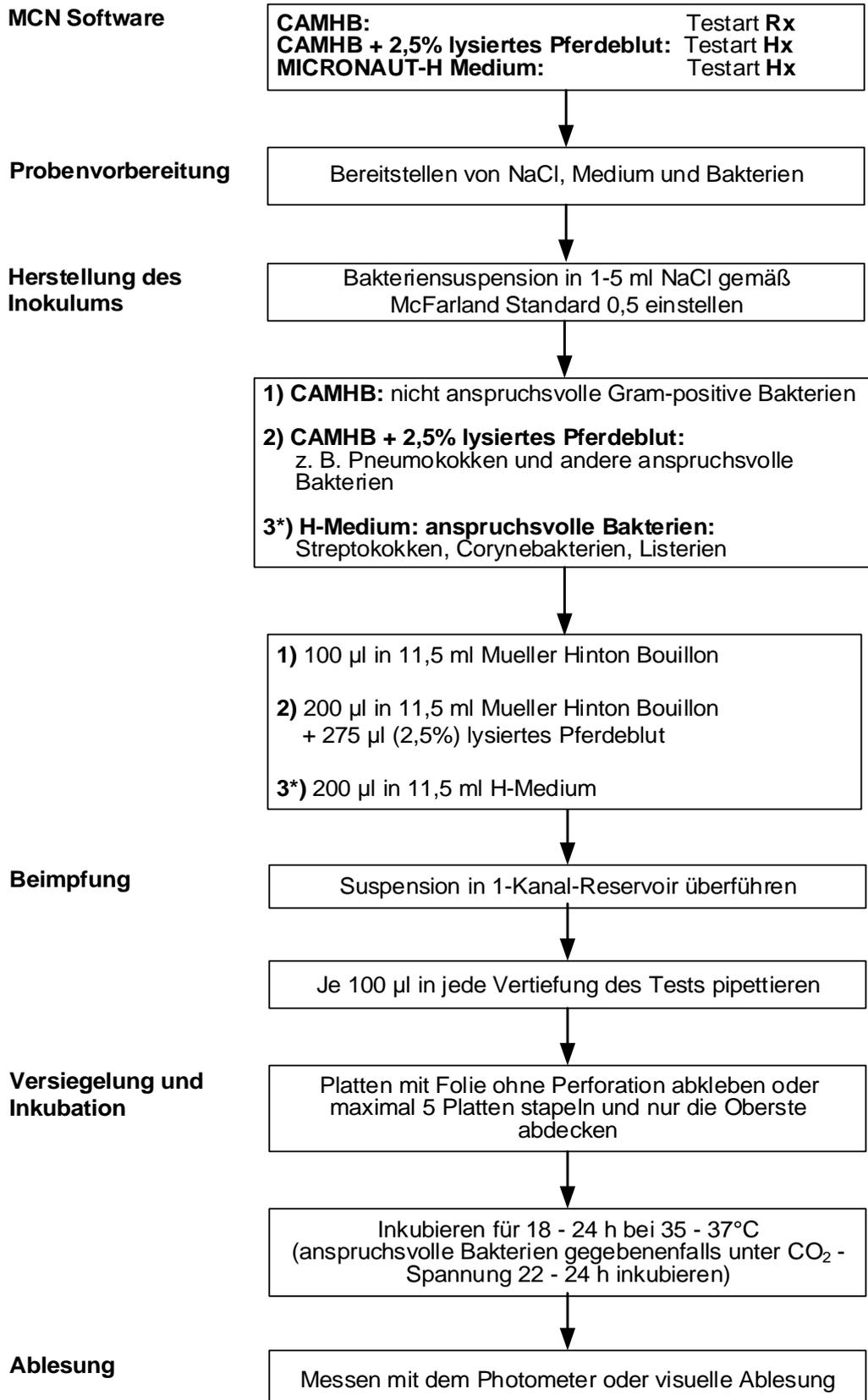
ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE DER ETIKETTEN

-  Nur zum einmaligen Gebrauch
-  Anzahl der möglichen Tests
-  Lagerungsbedingungen
-  Gebrauchsanleitung
-  Sicherheitshinweise im Sicherheitsdatenblatt
-  Verfallsdatum
-  CE-Kennzeichnung gemäß IVDD 98/79/EG
- LOT** Angabe der Chargen Nr.
- IVD** *In vitro* Diagnostika
- REF** Artikelnummer
-  Logo des beauftragten Unternehmens gemäß § 11 der VerpackungsVO zur stofflichen Verwertung der anfallenden Verpackungen. Das Verpackungsmaterial (Karton und Aluminiumverbundfolie) kann den dafür vorgesehenen Sammelbehältnissen im Hausmüll zugeführt werden.

LITERATUR

- Ingo Stock, Konstanze Machka, Arne Rodloff und Bernd Wiedemann. Qualitätssicherung und Qualitätskontrollen in der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien mit der Mikrodilution. *Chemotherapie Journal* 10:78-91 (2001).
- Matthias Noll, Sylvia Kleta, Sascha Al Dahouk. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. *Journal of Infection and Public Health* 11 (2018) 572-577.
- Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI Document M7-A11.
- Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; CLSI Document M45.
- DIN EN ISO 20776-1 – Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme – Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung Teil1: Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen.
- M. Ballesterro-Tellez, F. Docobo-Perez, J.M. Rodriguez-Martinez, M.C. Conejo, M.S. Ramos-Guelfo, J. Blazquez, J. Rodriguez-Bano, A. Pascual. Role of inoculum and mutant frequency on fosfomycin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection* 23 (2017) 325-331.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI Document M100.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.

KURZANLEITUNG MICRONAUT-S MRSA / GP



* MICRONAUT-H Medium für anspruchsvolle Bakterien darf nicht für die Daptomycin-MHK-Bestimmung genutzt werden. Stattdessen muss Kationen-adjustierte Mueller Hinton Bouillon (CAMHB), supplementiert mit 2,5% lysiertem Pferdeblut, verwendet werden.

MICRONAUT-S MRSA / GP



Only for *in vitro* diagnostic

English

Revision A (October 2018)

Microtitration plates for automated or manual susceptibility testing of Gram-positive bacteria.

TEST PRINCIPLE

The susceptibility testing with the MICRONAUT-S MRSA / GP test plate is based on the rehydration of antibiotics by adding a standardized bacterial suspension. After incubation for 18 - 24 hours at 35 - 37 °C the result is read with the plate reader and evaluated with the MICRONAUT Software or read visually and interpreted.

REAGENTS

Contents

- 1 test can be performed per each plate
- 40 test plates per packaging unit
- Sealing foils (not perforated)

Required additional reagents and materials:

- Mueller Hinton Broth, cation adjusted (CAMHB)
- MICRONAUT-H Medium
- Lysed horse blood for *Streptococcus pneumoniae* and other fastidious bacteria; Company Thermo Fisher Scientific (Oxoid) or Fiebig-Nährstofftechnik
- NaCl 0,9%
- 1-channel-reservoirs
- 8-channel-pipette (100-1200 µl) incl. pipette tips
- Plate reader (validated for MICRONAUT systems)
- MICRONAUT Software

Article numbers of reagents and materials are available at the local distributors.

Laboratory materials

- Incubator
- McFarland standard 0.5
- Blood agar plate (without additives)
- Inoculation loops
- Marking pen
- Pipette (50-1000 µl)

COMPOSITION OF THE MEDIA

Media	Components
NaCl 0.9%, 1l	Sodium chloride
Mueller Hinton Broth (cation-adjusted) 100 tubes of 11.5 ml (± 0.5 ml) 20 tubes of 11.5 ml (± 0.5 ml)	Beef Extract Acid Hydrolysate of Casein Starch
MICRONAUT-H Medium ¹ 100 tubes of 11.5 ml (± 0.5 ml)	Glucose Hematin Neopeptone Tween 80 Pyridoxal NAD Columbia Broth Base Yeast Extract Agarose Type II A

¹Compound confidential

Please note: The broth is chosen depending on the testing in accordance with international standards respective the bacteria group. Mueller Hinton Broth should be used as standard medium for testing non-fastidious Gram-positive bacteria. For particular bacteria groups it is advisable to add supplement to the broth.

Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth has to be used for susceptibility testing of **daptomycin**.

STABILITY/ STORAGE

MICRONAUT-S MRSA / GP test plates have to be stored in the original packaging at 15 - 25 °C and can be used up to the indicated expiration date. Mueller Hinton Broth has to be stored at 15 - 25 °C, MICRONAUT-H Medium at 2 - 8 °C. For shelf life of the media please follow the expiration date printed on the product. For reagents follow the storage instructions indicated on the products.

PRECAUTIONARY MEASURES

- Only to be used for *in vitro* diagnostic.
- Do not pipette the reagents by mouth.
- Only for proper use.
- Samples, bacterial cultures and the inoculated test plates have to be considered as potentially infectious and must be treated properly and with respect to the corresponding precautionary measures by qualified specialist staff. It is important to work aseptically during the whole test procedure. For information please refer to "BioSafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 99-8395, 4th Edition (April 1999)", or to the corresponding national legal requirements.
- A pouch filled with the indicator "silica gel" is supplied with the sealed test plates. The drying agent contains cobalt chloride. Please make sure not to damage the drying agent pouch. A colour change of the indicator pouch from blue to pink may indicate trapped moisture. Please do not use this plate.
- Upon reading and evaluation of the tests, all samples, inoculated and contaminated products (pipette tips, 1-channel-reservoir and test plates) must be autoclaved, burnt or disinfected in a bactericidal solution before disposal.
- It is important to follow the instructions carefully, each deviation may influence the quality of the results.
- The test results should be interpreted by qualified staff with experience in microbiology. The clinical background, origin of the samples, colony and microscopic morphology, serology and the identification result must be taken into consideration when interpreting the results.

TEST PROCEDURE

Preparation of the samples

- Prepare a tube with 1-5 ml NaCl 0.9%, pH 5.5 to 6.5.
- Prepare a tube of the corresponding Mueller Hinton Broth or MICRONAUT-H Medium.

Preparation of the inoculum

- Pick several single colonies of a maximum 24 hours old pure culture from the blood agar (without additives).
- Homogenize the colonies well in 1-5 ml NaCl 0.9 % until the turbidity matches a McFarland standard of 0.5.

Mueller Hinton Broth

- Gram-positive bacteria:
Pipette 100 µl of the bacterial suspension into 11.5 ml Mueller Hinton Broth and homogenize well.
- Fastidious bacteria (e. g. *Streptococcus pneumoniae* and other fastidious streptococci):
Pipette 200 µl of the bacterial suspension into 11.5 ml Mueller Hinton Broth. To ensure sufficient growth of fastidious bacteria lysed horse blood is added to the Mueller Hinton Broth. The final concentration of the lysed horse blood should be at least 2.5 % (275 µl to 11.5 ml Mueller Hinton Broth). Homogenize the supplemented medium well. The MICRONAUT-S MRSA / GP test plate must be read visually.
Remark: Photometric reading with MICRONAUT software **panel type „H“** is possible if exclusively lysed horse blood from Thermofisher Scientific (Oxoid) or Fiebig-Nährstofftechnik in the final concentration of 2.5% is used.

MICRONAUT-H Medium

- MICRONAUT-H Medium for fastidious bacteria (e. g. Coryneform bacteria, *Listeria*) and as an alternative test medium for streptococci:
Pipette 200 µl of the bacterial suspension into 11.5 ml MICRONAUT-H Medium and homogenize well.
Note: MICRONAUT-H Medium as test medium must not be used for MIC determination of daptomycin when testing fastidious bacteria (e. g. streptococci). Susceptibility testing of daptomycin requires the use of Mueller Hinton Broth.

Inoculation

- Remove the MICRONAUT-S MRSA / GP test plate from the packaging not more than 30 minutes before inoculation and dispose the drying agent.
- Label the test plate.
- Pour the prepared suspension into a 1-channel-reservoir.
- Inoculate the microtitration plate with 100 µl per well manually by using an 8-channel-pipette.

Sealing and incubation

Mueller Hinton Broth

- After the inoculation cover the test plates with the unperforated sealing foil or an unused microtitration plate (do not stack up more than 5 test plates).
- Place the test plate in an incubator at 35 - 37 °C for 18 - 24 hours.

MICRONAUT-H Medium

- After the inoculation stack up the test plates and cover the one on top with a microtitration plate or another lid. Do not cover with sealing foil (do not stack up more than 5 test plates).
- Place the test plate in an incubator at 35 - 37 °C for 22 - 24 hours in an enriched CO₂-atmosphere if necessary.

Reading

- Remove the sealing foils.
- Wipe off the bottom of the test plates.
- Read the test plates with the photometer or visually.

Evaluation

The growth control must be covered (turbid) otherwise the test must be repeated.

The values that are determined by photometric reading are evaluated, interpreted and the plausibility is checked with the MICRONAUT Software (see instructions for MICRONAUT Software). Test results are displayed on the screen or on the printout. Remarks may appear below the test results indicating an insufficient growth, MRSA phenotype or notifiable bacteria etc.

Results read visually should be documented on a printed layout or an evaluation protocol.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

Breakpoint Interpretation: Antibiotics which are tested in two concentrations.

visual reading		automated reading		result	
1	2	1	2		
no growth	no growth	-	-	S	susceptible
growth	no growth	+	-	I	intermediate
growth	growth	+	+	R	resistant

1 = low breakpoint concentration

2 = high breakpoint concentration

Explanations

To judge the therapeutic susceptibility of bacteria, please refer to MIC interpretation standards of the corresponding guidelines (CLSI, EUCAST).

Enterococci strains

Check the MICRONAUT-S MRSA / GP test plates visually when testing enterococci.

MIC value

Minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration of an antibiotic that will inhibit visible growth of a microorganism. Bacterial growth can be observed as turbidity of the test medium within or as cell sediment (nodule formation) at the bottom of the respective wells of the microtitration plates. Prerequisite for the determination of MIC values is a positive growth control.

Skipped wells

Occasionally skipped wells could occur within the microtitration plates. Skipped wells appear due to lack of growth in one or more wells within an antibiotic concentration series while the wells of the next higher / lower concentration of the same antibiotic show bacterial growth.

Reasons for the occurrence of skipped wells can be complex: manifestation of hetero-resistance, inhomogeneous inoculum or inoculation, inadequate filling of the microtitration plates, cross contamination of cavities by carrying over of antibiotics during pipetting, working with mixed cultures, drops of bacterial suspension at the edge of the cavities and therefore no contact with the antibiotic, etc..

For MICRONAUT-S MRSA / GP test plates a single skipped well within a concentration series can be ignored. The concentration of the well from which on no further growth occurs, can be read as the MIC value. If several skipped wells occur in a concentration series the test must be repeated. If skipped wells occur in breakpoint concentrations (maximum of two concentrations per antibiotic agent) the test must be repeated.

EXPLANATION OF THE ANTIBIOTIC CONFIGURATION OF THE MICRONAUT-S MRSA / GP TEST PLATE

The antibiotic configuration of the MICRONAUT-S MRSA / GP test plate allows the specific detection of clinically relevant single or multi-resistances of Gram-positive bacteria causing nosocomial infections. The susceptibility testing with highly effective reserve antibiotics offers alternatives in case of extreme multiresistance.

Susceptibility testing of staphylococci

- Detection of staphylococcal penicillinases by MIC determination of penicillin G
- Detection of oxacillin resistance by MIC determination of oxacillin and ceftiofur
- Detection of inducible MLS_B resistance by testing the antibiotic combination erythromycin/clindamycin
- Detection of phenotypic resistance patterns of epidemic MRSA
- Testing of novel antibiotics

Susceptibility testing of enterococci

- Detection of ampicillin resistance by MIC determination of ampicillin
- Detection of phenotypic glycopeptide resistance patterns of vancomycin-resistant enterococci by determining the MIC of teicoplanin and vancomycin
- Detection of HLAR-strains through high-level-resistance testing of gentamicin
- Testing of novel antibiotics

Susceptibility testing of pneumococci

- Detection of PBP-changes by MIC determination of penicillin G
- Detection of group IV quinolones resistance by MIC determination of moxifloxacin
- Detection of erythromycin resistance
- Detection of vancomycin resistance
- Testing of novel antibiotics

TECHNICAL REMARKS

In order to obtain best results please follow the below listed points of the instructions carefully:

- MICRONAUT-S MRSA / GP test plates are intended for single use only. Test plates cannot be reused.
- Work with pure culture from blood agar (without additives) not older than 24 hours.
Exception: Fastidious bacteria can be taken from a blood agar plate (without additives) after 48 hours of incubation at 35 - 37 °C.
- If you do not use culture media ready for use follow the instruction carefully when preparing the broth.
- When using Mueller Hinton Broth, check the correct concentration of the bivalent cations Ca²⁺ and Mg²⁺ (20 to 25 mg Ca²⁺/l and 10 to 12.5 mg Mg²⁺/l). Verify the pH-value of the Mueller Hinton Broth. It should be between 7.2 and 7.4 at room temperature (25 °C).
- Use NaCl 0.9 %, pH 5.5 - 6.5.
- Store the MICRONAUT-H Medium at 2 – 8 °C.
- Preheat the medium before using it (1 hour in the incubator).
- Follow the correct McFarland standard 0.5 adjustment of the NaCl suspension. Homogenize the suspension sufficiently.
- Transfer the bacteria suspension on a blood agar plate (without additives) for purity control.
- Follow the incubation times carefully. Do not incubate non-fastidious bacteria less than 18 hours and fastidious bacteria less than 22 hours.

QUALITY CONTROL

The test plates and reagents are subject to quality controls which are carried out systematically at different stages of the production. The bacteriological quality control can be carried out with the following strains.

Strains	ATCC No. ¹	DSMZ No. ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	DSM 2569
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	DSM 2570
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	DSM 11967

¹ATCC = American Type Culture Collection

²DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Ltd.)

QUALITY AND PERFORMANCE DATA

The general requirements apply to DIN EN ISO 20776-1. For monitoring the accuracy for minimal inhibitory concentrations (MICs) please refer to the acceptable limits for quality control strains according to the relevant version of CLSI document M100.

Attention: Deviations from the acceptable QC MIC ranges can occur with **fosfomycin** antimicrobial susceptibility testing (AST) due to expression of hetero-resistance based of resistant subpopulations. These deviations are linked to the high inoculum size of the broth microdilution procedure (refer to Ballesterro-Tellez et al., 2017).

GUARANTEE

The quality data of the MICRONAUT-S MRSA / GP test plate has been determined by strictly following the present instruction. Divergences or alterations of the test procedure may reduce the quality of the results. Any claims for damages are excluded in this case.

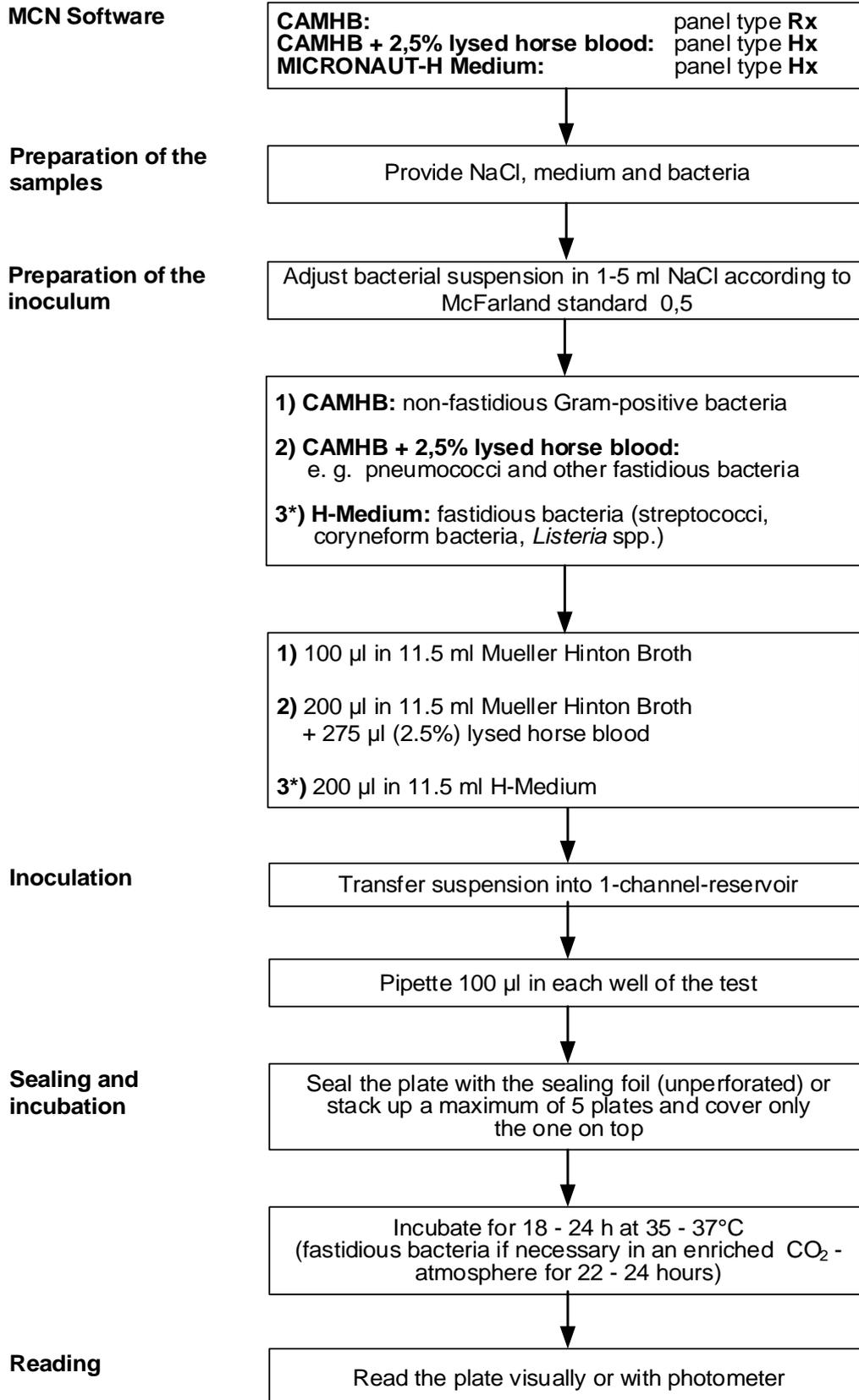
EXPLANATION OF THE SYMBOLS ON THE LABELS

	For single use only
	Number of possible tests
	Storage conditions
	Instructions for use
	Security advice on the safety data sheet
	Expiry date
	CE marking in accordance with 98/79/EC (IVDD)
LOT	Indication of the lot number
IVD	In vitro diagnostics
REF	Article number

LITERATURE

- Ingo Stock, Konstanze Machka, Arne Rodloff und Bernd Wiedemann. Qualitätssicherung und Qualitätskontrollen in der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien mit der Mikrodilution. *Chemotherapie Journal* 10:78-91 (2001).
- Matthias Noll, Sylvia Kleta, Sascha Al Dahouk. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. *Journal of Infection and Public Health* 11 (2018) 572-577.
- Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; CLSI Document M7-A11.
- Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; CLSI Document M45.
- DIN EN ISO 20776-1 – Labormedizinische Untersuchungen und In-vitro-Diagnostika-Systeme – Empfindlichkeitsprüfung von Infektionserregern und Evaluation von Geräten zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung Teil1: Referenzmethode zur Testung der In-vitro-Aktivität von antimikrobiellen Substanzen gegen schnell wachsende aerobe Bakterien, die Infektionskrankheiten verursachen.
- M. Ballesterro-Tellez, F. Docobo-Perez, J.M. Rodriguez-Martinez, M.C. Conejo, M.S. Ramos-Guelfo, J. Blazquez, J. Rodriguez-Bano, A. Pascual. Role of inoculum and mutant frequency on fosfomycin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection* 23 (2017) 325-331.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI Document M100.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.

SHORT INSTRUCTION MICRONAUT-S MRSA / GP



* MICRONAUT-H Medium for fastidious bacteria must not be used for MIC determination of daptomycin. Instead, cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) supplemented with 2.5% lysed horse blood must be used.



MERLIN Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostika mbH
Kleinstraße 14
53332 Bornheim-Hersel, Germany
Tel: +49 (0) 22 22 9631-0
Fax: +49 (0) 22 22 9631-90
Email: info@merlin-diagnostika.de
www.merlin-diagnostika.de

