



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Oznaczanie lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową (EUCAST)

Wersja 6.0

Styczeń 2017



Ministerstwo Zdrowia

Dostosowanie zaleceń do potrzeb diagnostyki mikrobiologicznej w Polsce wykonano ze środków finansowych będących w dyspozycji Ministra Zdrowia w ramach realizacji programu polityki zdrowotnej pn. „Narodowy Program Ochrony Antybiotyków na lata 2016-2020”



www.antybiotyki.edu.pl

Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa
tel. 22 841-33-67, fax 22 841-29-49
www.antybiotyki.edu.pl

Spis treści

Strona

	Zmiany w stosunku do poprzedniej wersji	
	Skróty i terminologia	
1	Wprowadzenie	6
2	Przygotowywanie i przechowywanie podłoży	7
3	Przygotowywanie inokulum	9
4	Inokulacja podłoży stałych	11
5	Nakładanie krążków antybiogramowych	12
6	Inkubacja płytek	13
7	Kontrola płytek po inkubacji	15
8	Pomiar stref i interpretacja wrażliwości	16
9	Kontrola jakości	18
	Dodatek A	21

Zmiany w stosunku do poprzedniej wersji (w. 5.0)

Sekcja	Zmiana
2.2	Dodanie informacji o wymiarach płytek Petriego
2.3	Dodanie informacji o suszeniu płytek
2.4	Zmiana zaleceń dotyczących przechowywania płytek przygotowywanych w laboratorium
2.7	Wyjaśnienie celu osuszania płytek
Tabela 1	Dodanie <i>Aerococcus sanguinicola</i> , <i>Aerococcus urinae</i> i <i>Kingella kingae</i>
3.2, 3.3	Dodanie informacji dotyczącej przygotowania inokulum
3.3.2	Wyjaśnienie użycia wzorców 0,5 McFarlanda
3.4	Dodanie podsumowania zasady 15-15-15 minut (patrz przypis 1)
Tabela 2	Usunięcie informacji dotyczącej komercyjnych standardów w skali McFarlanda
4.1	Dodanie informacji o ocieplaniu płytek do temperatury pokojowej przed inokulacją
4.3, 4.3.1, 4.3.2	Dodanie informacji dotyczących inokulacji podłoża stałego: bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne
4.4	Dodanie informacji dotyczących inokulacji więcej niż jednej płytki z podłożem stałym
4.5, 4.5.1	Dodanie informacji o technikach inokulacji
4.6	Dodanie podsumowania zasady 15-15-15 minut (patrz przypis 1)
5.3	Dodanie informacji o limicie czasowym przy nakładaniu krążków. Dodanie podsumowania zasady 15-15-15 minut (patrz przypis 1)
5.5.2, 5.5.3, 5.5.5	Dodanie informacji dotyczących stosowania i przechowywania krążków antybiogramowych
6.1	Dodanie informacji o odwracaniu płytek Dodanie podsumowania zasady 15-15-15 minut (patrz przypis 1)
6.2	Dodanie informacji dotyczącej układania płytek w cieplarkach
6.3.1	Doprecyzowanie czasu inkubacji
Tabela 3	Poprawienie przedziałów czasowych dla przedłużonej inkubacji <i>Corynebacterium</i> spp.
Tabela 3	Dodanie <i>Aerococcus sanguinicola</i> , <i>Aerococcus urinae</i> i <i>Kingella kingae</i>
8.5, 8.5.1	Wyjaśnienie sposobu odczytu stref zahamowania wzrostu i użycia automatycznych czytników stref
8.8	Dodanie informacji o Przedwodniku Odczytu EUCAST (<i>EUCAST Reading Guide</i>)
8.9.1	Wyjaśnienie sposobu odczytu stref zahamowania wzrostu w przypadku podwójnych stref lub kolonii widocznych w obrębie strefy
8.9.2	Wyjaśnienie sposobu odczytu stref trimetoprim – sulfametoksazol dla <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
8.9.3	Dodanie instrukcji odczytu ampicyliny z pulbaktamem i amoksycyliny z kwasem klawulanowym dla Enterobacteriaceae

Sekcja	Zmiana
8.9.6	Aktualizacja instrukcji odczytu benzylpenicyliny
8.9.10	Wyjaśnienie sposobu odróżniania hemolizy od wzrostu w odczycie stref zahamowania wzrostu
8.9.11	Dodanie instrukcji odczytu stref fosfomycyny dla <i>Escherichia coli</i>
9.1.1	Dodanie informacji o kontroli inhibitora w krążkach zawierających połączenie β -laktam-iinhibitor β -laktamazy
9.3	Dodanie informacji o przesiewaniu szczepów kontrolnych
9.4.1	Dodanie informacji o tym jak stosować wartości oczekiwane i dopuszczalne zakresy wartości z Tabeli Kontroli Jakości EUCAST (EUCAST QC)
9.5	Zmiana zaleceń dotyczących częstotliwości przeprowadzania kontroli jakości
Tabela 4	Dodanie informacji do charakterystyki <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
Tabela 4	Dodanie <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
Tabela 4	Usunięcie <i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468
Tabela 5	Przeredagowanie charakterystyki <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766

Skróty i terminologia	
ATCC	Amerykańska Kolekcja Szczepów Wzorcowych (ang. <i>American Type Culture Collection</i>) http://www.atcc.org
CCUG	Kolekcja Szczepów Uniwersytetu w Göteborgu (ang. <i>Culture Collection University of Göteborg</i>) http://www.ccug.se
CECT	Hiszpańska Kolekcja Szczepów Wzorcowych (hiszp. <i>Colección Española de Cultivos Tipo</i>) http://www.cect.org
CIP	Kolekcja Instytutu Pasteura (franc. <i>Collection de Institut Pasteur</i>) http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html
DSM	Szczepy bakterii z Niemieckiej Kolekcji Szczepów Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych (niem. <i>Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen</i> - DSMZ) https://www.dsmz.de/
ESBL	β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania
EUCAST	Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>) http://www.eucast.org
MH	Mueller-Hinton agar
MH-F	Mueller-Hinton agar dla drobnoustrojów wymagających (MH z 5% dodatkiem odwióknionej krwi końskiej i 20mg/L β -NAD)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę (<i>mecA</i> lub <i>mecC</i> dodatni)
NCTC	Narodowa Kolekcja Szczepów Wzorcowych (ang. <i>National Collection of Type Cultures</i>) http://www.hpacultures.org.uk
β -NAD	Dinukleotyd β -nikotynoamidoadeninowy
Sól fizjologiczna	0,85% wodny roztwór NaCl (8,5 g/L)

Metoda dyfuzyjno-krażkowa jest jednym z najstarszych sposobów badania lekowrażliwości drobnoustrojów i pozostaje jedną z najszerzej stosowanych metod oceny lekowrażliwości w laboratoriach klinicznych. Jest odpowiednia do badania większości patogenów bakteryjnych, w tym bakterii wymagających, umożliwia badanie szerokiej gamy antybiotyków i nie wymaga specjalnego wyposażenia.

Metoda EUCAST, podobnie jak kilka innych technik dyfuzyjno-krażkowych, oparta jest na zasadach określonych w raporcie *International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing* z roku 1972 i doświadczeniach grup eksperckich z całego świata.

Wartości graniczne średnic stref zahamowania wzrostu są dopasowane do ujednoczonych europejskich wartości granicznych MIC opublikowanych przez EUCAST, które są dostępne bezpłatnie na stronie (<http://www.eucast.org>).

Jak wszystkie wystandaryzowane metody, opisana technika powinna być stosowana bez modyfikacji w celu uzyskania wiarygodnych wyników.

2 Przygotowywanie i przechowywanie podłoży

- 2.1 Podłoże Mueller-Hinton (MH) należy przygotowywać zgodnie z zaleceniami producenta, a dla drobnoustrojów wymagających – z suplementacją wskazaną w **Tabeli 1**. Przygotowywanie i suplementowanie podłoża zostało szczegółowo opisane na stronie <http://www.eucast.org>.
- 2.2 Podłoże powinno mieć głębokość 4 mm \pm 0,5 mm (ok. 25 ml na płytkę o średnicy 90 mm, 31 ml na płytkę o średnicy 100 mm, 71 ml na płytkę o średnicy 150 mm i 40 ml na płytkę kwadratową o boku 100 mm). Na podstawie faktycznych wymiarów używanych w laboratorium płytek Petriego należy sprawdzić czy stosowana jest odpowiednia objętość podłoża. Wymiary płytek mogą różnić się w zależności od producenta.
- 2.3 Powierzchnia agaru powinna być sucha przed użyciem. Na powierzchni agaru, ani po wewnętrznej stronie przykrywki nie powinno być widocznych kropli wody. Jeśli to konieczne, płytki można suszyć przez noc w temperaturze 20-25°C lub przez 15 minut bez przykrywki w 35°C. Nie należy dopuszczać do przesuszenia podłoża.
- 2.4 Płytki przygotowywane w laboratorium powinny być przechowywane w temperaturze 4-8°C.
- 2.5 W przypadku płytek przygotowywanych w laboratorium ich suszenie, warunki przechowywania i data ważności powinny być wyznaczone w ramach laboratoryjnego programu zapewniania jakości.
- 2.6 Gotowe, komercyjne płytki powinny być przechowywane zgodnie z zaleceniami producenta i wykorzystane przed upływem terminu ważności zamieszczonym na opakowaniu.
- 2.7 W przypadku płytek z podłożem (zarówno komercyjnym, jak i przygotowywanym w laboratorium) przechowywanych w plastikowych torebkach lub zamkniętych pojemnikach, konieczne może być ich suszenie przed użyciem (patrz podpunkt 2.3). Osuszenie płytek ma na celu uniknięcie nadmiaru wilgoci, który może powodować problemy z rozmytymi brzegami strefy i/lub wzrostem mgławicowym w jej obrębie.

Tabela 1 Podłoża do badania lekowrażliwości

Drobnoustrój	Podłoże
Enterobacteriaceae	MH agar
<i>Pseudomonas</i> spp.	MH agar
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MH agar
<i>Acinetobacter</i> spp.	MH agar
<i>Staphylococcus</i> spp.	MH agar
<i>Enterococcus</i> spp.	MH agar
Streptococcus grupy A, B, C i G	MH-F agar ¹
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH-F agar ¹
<i>Streptococcus</i> spp. grupa viridans	MH-F agar ¹
<i>Haemophilus influenzae</i>	MH-F agar ¹
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH-F agar ¹
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH-F agar ¹
<i>Pasteurella multocida</i>	MH-F agar ¹
<i>Campylobacter jejuni</i>	MH-F agar ¹ (patrz Dodatek A)
<i>Campylobacter coli</i>	MH-F agar ¹ (patrz Dodatek A)
<i>Corynebacterium</i> spp	MH-F agar ¹
<i>Aerococcus sanguinicola</i>	MH-F agar ¹
<i>Aerococcus urinae</i>	MH-F agar ¹
<i>Kingella kingae</i>	MH-F agar ¹
Pozostałe drobnoustroje wymagające	Do ustalenia

¹ MH + 5% mechanicznie odwłóknionej krwi końskiej + 20 mg/l β-NAD

3 Przygotowywanie inokulum

3.1 Należy przygotować inokulum o gęstości 0,5 w skali McFarlanda (**Tabela 2**), zawieszając kolonie danego szczepu w soli fizjologicznej. 0,5 McFarlanda odpowiada ok. $1-2 \times 10^8$ CFU/mL dla *Escherichia coli*.

Metoda przygotowywania zawiesiny bezpośrednio z kolonii jest odpowiednia dla wszystkich drobnoustrojów, w tym drobnoustrojów wymagających z **Tabeli 1**.

3.2 Kolonie należy pobrać, sterylną eżą lub wymazówką, z całonocnej hodowli na podłożu nioselektywnym. Jeśli to możliwe, należy pobrać kilka podobnych morfologicznie kolonii, aby uniknąć wybrania nietypowego wariantu szczepu. Kolonie należy zawiesić w soli fizjologicznej i mieszać do ustalenia gęstości.

3.3 Gęstość zawiesiny należy doprowadzić do 0,5 McFarlanda przez dodawanie soli fizjologicznej lub kolonii bakterii. Zbyt duża gęstość inokulum może powodować zmniejszenie strefy zahamowania wzrostu, a zbyt mała – powodować odwrotny skutek.

3.3.1 Podczas ustalania gęstości zawiesiny zaleca się stosowanie urządzeń fotometrycznych. Urządzenie powinno być skalibrowane w oparciu o wzorzec 0,5 w skali McFarlanda według zaleceń producenta.

3.3.2 Gęstość zawiesiny może być ewentualnie porównywana wzrokowo ze wzorcem 0,5 McFarlanda. Dla ułatwienia, gęstość zawiesiny i wzorca zmętnienia należy porównywać na białym tle w czarne paski.

3.3.3 Zawiesinę *Streptococcus pneumoniae* najlepiej przygotowywać z płytki z agarem krwawym, a jej gęstość powinna wynosić 0,5 McFarlanda. Jeśli zawiesina *Streptococcus pneumoniae* przygotowywana jest z płytki z agarem czekoladowym, gęstość inokulum powinna odpowiadać wzorcowi 1 w skali McFarlanda.

3.4 Zawiesina powinna zostać użyta w ciągu 15 minut¹, a najpóźniej w ciągu 60 minut od przygotowania.

¹ Element zasady 15-15-15: zawiesinę należy zużyć w ciągu 15 minut od przygotowania, krążki nałożyć w ciągu 15 minut od inokulacji płytki, a inkubację płytek rozpocząć w ciągu 15 minut od nałożenia krążków.

Tabela 2	Przygotowanie wzorca zmętnienia o gęstości 0,5 w skali McFarlanda
1	Należy dodać 0,5 mL 0,048 mol/L BaCl ₂ (1,175% w/o BaCl ₂ ·2H ₂ O) do 99,5 mL 0,18 mol/L (0,36 N) H ₂ SO ₄ (1% o/o) i dokładnie wymieszać.
2	Gęstość zawiesiny należy sprawdzić za pomocą spektrofotometru przy drodze światła długości 1 cm i w odpowiednich kuwetach. Absorbancja przy długości fali 625 nm powinna mieścić się w zakresie od 0,08 do 0,13.
3	Zawiesinę należy przelać do probówek takiej samej wielkości jak te, których używa się do przygotowywania zawiesin bakterii i szczelnie zamknąć.
4	Wzorce należy przechowywać w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła.
5	Wzorce należy dokładnie zworteksować bezpośrednio przed użyciem.
6	Po 6 miesiącach przechowywania należy sprawdzić absorbancję wykonanych wzorców lub przygotować nowe.

4	Inokulacja płytek z podłożem stałym
4.1	Przed inokulacją należy upewnić się, że płytki osiągnęły temperaturę pokojową.
4.2	Inokulum powinno zostać użyte w ciągu 15 minut ¹ , a najpóźniej w ciągu 60 minut od przygotowania.
4.3	Sterylną wymazówkę bawełnianą należy zanurzyć w zawieszynie.
4.3.1	W przypadku bakterii Gram-ujemnych należy usunąć nadmiar płynu z wymazówki przez odcisnięcie jej o wnętrze probówki. Zapobiega to inokulacji płytki zbyt dużą ilością zawiesziny.
4.3.2	W przypadku bakterii Gram-dodatnich nie należy odciskać wymazówki o wnętrze probówki.
4.4	W przypadku inokulacji kilku płytek tą samą zawieszyną, dla każdej płytki należy powtórzyć czynności wymienione w podpunkcie 4.3.
4.5	Płytki mogą być inokulowane ręcznie poprzez rozprowadzenie zawiesziny w trzech kierunkach za pomocą wymazówki lub z użyciem automatycznego inokulatora. Zawieszynę należy równomiernie rozprowadzić na powierzchni agaru, upewniając się, że pomiędzy poszczególnymi pasmami nie ma przerw.
4.5.1	W przypadku bakterii Gram-dodatnich należy zwrócić szczególną uwagę na to, by nie było przerw pomiędzy poszczególnymi pasmami.
4.6	Krażki należy nałożyć w ciągu 15 minut ¹ od inokulacji. Jeśli inokulowane płytki przed nałożeniem krążków pozostaną na dłużej w temperaturze pokojowej, drobnoustroje mogą zacząć się namnażać, czego skutkiem będzie zaniżenie średnic stref zahamowania wzrostu.

¹ Element zasady 15-15-15: zawieszynę należy zużyć w ciągu 15 minut od przygotowania, krążki nałożyć w ciągu 15 minut od inokulacji płytki, a inkubację płytek rozpocząć w ciągu 15 minut od nałożenia krążków.

5 Nakładanie krążków antybiogramowych

- 5.1 Wymagane zawartości krążków wymienione zostały w Tabelach Wartości Granicznych i Tabelach Kontroli Jakości na <http://www.eucast.org>.
- 5.2 Krążki powinny pozostawać zamknięte w pojemnikach, w których są przechowywane do uzyskania temperatury pokojowej. Zapobiega to skraplaniu się wody, która może prowadzić do szybkiego rozkładu niektórych antybiotyków.
- 5.3 Krążki należy nakładać na płytkę pewnym ruchem w ciągu 15 minut od jej inokulacji¹. Krążki powinny przylegać do powierzchni agaru i po nałożeniu nie mogą być przesuwane, ponieważ dyfuzja antybiotyku z krążka do podłoża zachodzi bardzo szybko.
- 5.4 Liczba krążków na płytce powinna być ograniczona, aby strefy nie zachodziły na siebie, a poszczególne antybiotyki nie oddziaływały na pozostałe. Możliwość wiarygodnego pomiaru stref zahamowania wzrostu jest bardzo istotna. Maksymalna liczba krążków na płytce waha się w zależności od badanego drobnoustroju i stosowanych krążków. Zwykle maksymalna liczba krążków to 6 na płytce o średnicy 90 mm i 12 na płytce o średnicy 150 mm.
- 5.4.1 Aby możliwe było wykrycie indukowalnej oporności na klindamycynę u gronkowców i paciorkowców, krążki z erytromycyną i klindamycyną powinny być położone w odległości 12-20 mm (licząc od brzegów krążków) dla gronkowców i odległości 12-16 mm (licząc od brzegów krążków) dla paciorkowców.
- 5.5 Spadek aktywności antybiotyków zawartych w krążkach powoduje zmniejszenie średnic stref zahamowania wzrostu i jest częstym źródłem błędów. Niezbędne są następujące środki zapobiegawcze:
- 5.5.1 Krążki, także te będące w użyciu, należy przechowywać w zamkniętych pojemnikach ze środkiem osuszającym i chronić je przed dostępem światła (niektóre antybiotyki, w tym metronidazol, chloramfenikol i fluorochinolony są inaktywowane przy przedłużającej się ekspozycji na światło).
- 5.5.2 Krążki należy przechowywać zgodnie z zaleceniami producenta. Niektóre antybiotyki mogą być mniej trwałe od pozostałych (np. amoksycylina – kwas klawulanowy, cefaklor i karbapenemy), a producenci mogą dysponować dokładnymi zaleceniami.
- 5.5.3 Krążki będące w użyciu należy przechowywać zgodnie z zaleceniami producenta. Od momentu otwarcia opakowania, krążki powinny zostać wykorzystane w czasie określonym przez producenta.
- 5.5.4 Po upływie daty ważności podanej na opakowaniu krążki należy wyrzucić.
- 5.5.5 W celu kontrolowania czy antybiotyki w krążkach nie straciły aktywności w czasie przechowywania, należy regularnie nastawiać kontrolę jakości (patrz punkt 9) aktualnie używanych krążków.

¹ Element zasady 15-15-15: zawieszinę należy zużyć w ciągu 15 minut od przygotowania, krążki nałożyć w ciągu 15 minut od inokulacji płytki, a inkubację płytek rozpocząć w ciągu 15 minut od nałożenia krążków.

6	Inkubacja płytek
6.1	Płytki należy odwrócić podłożem do góry, upewniając się, że krążki nie spadły z powierzchni agaru. Inkubacja płytek powinna rozpocząć się w ciągu 15 minut ¹ od nałożenia krążków. Pozostawienie płytek w temperaturze pokojowej po nałożeniu krążków może skutkować zawyżeniem średnic stref zahamowania wzrostu.
6.2	Układanie stosów płytek w cieplarni może wpływać na wyniki badań z powodu ich nierównomiernego ogrzewania. Wydajność cieplarek jest różna, dlatego kontrola inkubacji, w tym odpowiedniej liczby płytek w stosie, powinna być elementem laboratoryjnego programu zapewniania jakości. W większości cieplarek można układać maksymalnie 5 płytek w stosie.
6.3	Płytki należy inkubować w warunkach określonych w Tabeli 3 .
6.3.1	Płytki nie powinny być inkubowane dłużej niż jest to zalecane. Przedłużenie inkubacji może powodować wystąpienie wzrostu w obrębie stref i błędne raportowanie izolatów jako opornych.
6.3.2	W przypadku badania wrażliwości <i>Enterococcus</i> spp. na aminoglikozydy, kolonie odporne mogą nie być widoczne na płytkach przed upływem 24h, jednak płytki mogą być oceniane po 16-20h. Po 16-20h można raportować szczep jako odporny, ale inkubacja płytek z izolatami uznanymi po tym czasie za wrażliwe musi zostać przedłużona do 24h. Po 24h należy odczytać strefy ponownie.

¹ Element zasady 15-15-15: zawieszinę należy zużyć w ciągu 15 minut od przygotowania, krążki nałożyć w ciągu 15 minut od inokulacji płytki, a inkubację płytek rozpocząć w ciągu 15 minut od nałożenia krążków.

Tabela 3	Warunki inkubacji płytek z testami do badania lekowrażliwości
Drobnoustrój	Warunki inkubacji
Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	35±1°C w warunkach tlenowych przez 16-20h 35±1°C w warunkach tlenowych przez 16-20h 35±1°C w warunkach tlenowych przez 16-20h 35±1°C w warunkach tlenowych przez 16-20h 35±1°C w warunkach tlenowych przez 16-20h 35±1°C w warunkach tlenowych przez 16-20h (24h w przypadku glikopeptydów)
Streptococcus grupy A, B, C i G <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> spp. grupa viridans <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pasteurella multocida</i>	35±1°C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h 35±1°C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h 35±1°C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h 35±1°C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h 35±1°C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h 35±1°C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h 35±1°C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h
<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i>	Patrz Dodatek A Patrz Dodatek A
<i>Corynebacterium</i> spp.	35 ± 1 ° C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h. Inkubacja izolatów, których wzrost jest niewystarczający po 16-20h, powinna zostać przedłużona do 40-44h. Po tym czasie należy odczytać strefy zahamowania wzrostu.
<i>Aerococcus sanguinicola</i> <i>Aerococcus urinae</i>	35 ± 1 ° C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h. Inkubacja izolatów, których wzrost jest niewystarczający po 16-20h, powinna zostać przedłużona do 40-44h. Po tym czasie należy odczytać strefy zahamowania wzrostu.
<i>Kingella kingae</i>	35 ± 1 ° C z 4-6% CO ₂ przez 16-20h. Inkubacja izolatów, których wzrost jest niewystarczający po 16-20h, powinna zostać przedłużona do 40-44h. Po tym czasie należy odczytać strefy zahamowania wzrostu.
Pozostałe drobnoustroje wymagające	Do ustalenia

7	Kontrola płytek po inkubacji
7.1	Wynikiem przygotowania odpowiedniej zawiesiny i prawidłowego inokulowania płytki powinien być wzrost zlewny.
7.1.1	Jeśli widoczne są poszczególne kolonie, inokulum było zbyt małe, a badanie powinno zostać powtórzone.
7.2	Na całej powierzchni agaru wzrost powinien być równomierny, aby krawędzie stref były regularne, a nie postrzępione.
7.3	Należy sprawdzać czy średnice stref zahamowania wzrostu dla szczepów kontroli jakości mieszczą się w dopuszczalnych zakresach (http://www.eucast.org).

8	Pomiary stref i interpretacja lekowrażliwości
8.1	Dla wszystkich antybiotyków (o ile nie zaznaczono inaczej w podpunkcie 8.9) granica strefy powinna być odczytywana w punkcie całkowitego zahamowania wzrostu ocenianego okiem nieuzbrojonym z odległości ok. 30 cm od płytki.
8.2	Płytki z podłożem niewzbogaconym należy odczytywać na ciemnym tle, od tyłu, w świetle odbitym.
8.3	Płytki z podłożem wzbogaconym należy odczytywać od przodu, ze zdjętą przykrywką, w świetle odbitym.
8.4	Nie należy oglądać płytek w świetle przechodzącym (unosić płytek pod światło), ani używać szkła powiększającego, o ile nie zaznaczono inaczej (patrz podpunkt 8.9).
8.5	Średnice stref zahamowania wzrostu należy mierzyć z dokładnością do milimetra za pomocą linijki lub suwmiarki.
8.5.1	Jeśli używany jest automatyczny czytnik stref, musi być on skalibrowany z odczytem manualnym.
8.6	Średnice stref należy zaszeregowywać do danej kategorii wrażliwości zgodnie z aktualnymi Tabelami Wartości Granicznych EUCAST dostępnymi na http://www.eucast.org .
8.7	Jeśli do interpretacji średnic stref używane są szablony, płytka powinna być umieszczona na szablonie, a średnice stref interpretowane zgodnie z zaznaczonymi na nim wartościami granicznymi EUCAST. Należy sprawdzać czy wartości zaznaczone na szablonech są zgodne z aktualną wersją Tabel Wartości Granicznych EUCAST. Program do przygotowywania szablonów został bezpłatnie udostępniony na http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program .
8.8	Przykładowe zdjęcia przedstawiające sposób odczytu średnic stref zahamowania wzrostu zamieszczone zostały w Przewodniku Odczytu (<i>EUCAST Reading Guide</i>) na http://www.eucast.org . Dokument ten zawiera także wytyczne odczytu dla konkretnych połączeń drobnuśtrój-antybiotyk.
8.9	Szczegółowe instrukcje odczytu:
8.9.1	W przypadku podwójnych stref lub kolonii wyraźnie widocznych w obrębie strefy, należy sprawdzić czystość hodowli i w razie potrzeby powtórzyć test. Jeśli hodowle są czyste, należy wziąć pod uwagę kolonie w strefie podczas pomiaru jej średnicy.
8.9.2	<p>W przypadku trimetoprimu i trimetoprimu z sulfametoksazolem w obrębie strefy może pojawiać się podrost pod krążek z powodu obecności antagonistów w podłożu. Taki wzrost powinien być ignorowany, a średnica strefy mierzona na jej wyraźniejszej granicy.</p> <p>W przypadku <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> z połączeniem trimetoprim – sulfametoksazol, każdy izolat przejawiający jakiegokolwiek oznaki wystąpienia strefy większej lub równej wartości granicznej wrażliwości powinien być raportowany jako wrażliwy. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w obrębie strefy może występować znaczny wzrost. Brak strefy powinien być raportowany wtedy, kiedy szczep podrasta pod krążek i nie ma żadnego śladu strefy zahamowania wzrostu.</p>

- 8.9.3 W przypadku Enterobacteriaceae z ampicyliną, ampicyliną z sulbaktamem i amoksycyliną z kwasem klawulanowym należy ignorować drobny wzrost tworzący wewnętrzną strefę na niektórych seriach agaru Mueller-Hinton.
- 8.9.4 W przypadku *Escherichia coli* z mecylinamem należy ignorować pojedyncze kolonie w strefie zahamowania wzrostu.
- 8.9.5 W przypadku *Proteus* spp. należy ignorować wzrost mgławicowy i odczytywać strefę zahamowania wzrostu.
- 8.9.6 W przypadku *Staphylococcus aureus* z benzylpenicyliną należy dokładnie przyjrzeć się granicy strefy pod światło (w świetle przechodzącym). Izolaty, których strefa zahamowania wzrostu jest większa lub równa wartości granicznej wrażliwości, ale jej brzeg jest ostry, powinny być raportowane jako odporne.
- 8.9.7 Jeśli do wykrywania oporności na metycylinę u *Staphylococcus aureus* używana jest cefoksytyna, należy zmierzyć wyraźną strefę i przyjrzeć się jej dokładnie przy dobrym oświetleniu w celu znalezienia kolonii w jej obrębie. Ich obecność może świadczyć o zanieczyszczeniu lub ekspresji heterogennej oporności na metycylinę.
- 8.9.8 W przypadku gronkowców oznaczenie linezolidu należy odczytywać od tyłu, w świetle przechodzącym.
- 8.9.9 W przypadku enterokoków z wankomycyną należy przyjrzeć się strefie pod światło (w świetle przechodzącym). Rozmyte krawędzie strefy i kolonie w jej obrębie wskazują na oporność na wankomycynę – wymagane są dalsze badania. Izolat nie może być uznany za wrażliwy przed upływem 24-godzinnej inkubacji.
- 8.9.10 W przypadku paciorkowców hemolizujących należy odczytywać strefę zahamowania wzrostu, a nie hemolizy. β -hemoliza jest zwykle wolna od wzrostu, jednak α -hemoliza i wzrost zwykle się pokrywają. Aby łatwiej odróżnić hemolizę od wzrostu należy poruszać płytką zmieniając kąt jej nachylenia.
- 8.9.11 W przypadku *Escherichia coli* z fosfomycyną należy ignorować pojedyncze kolonie w strefie zahamowania wzrostu i odczytywać zewnętrzną krawędź strefy.

9	Kontrola jakości
9.1	<p>W celu kontroli wyników testu należy użyć szczepów do kontroli jakości wymienionych w Tabeli 4. Podstawowymi szczepami kontrolnymi są typowe, wrażliwe szczepy. Szczepy odporne także mogą być wykorzystywane do potwierdzenia, że daną metodą można wykryć oporność związaną ze znanymi mechanizmami oporności (rozszerzona kontrola jakości, Tabela 5). Szczepy do kontroli jakości można nabyć z kolekcji kultur lub ze źródeł komercyjnych.</p>
9.1.1	<p>Do kontroli inhibitora w krążkach z połączeniem β-laktam-inhibitor β-laktamazy, rekomendowane są konkretne, produkujące β-laktamazę szczepy (Tabela 4). Powinien być to element rutynowej kontroli jakości. Antybiotyk jest sprawdzany z użyciem wrażliwego szczepu QC.</p>
9.2	<p>Szczepy do kontroli jakości powinny być przechowywane w warunkach, które zapewnią im przeżywalność i utrzymanie cech charakterystycznych. Praktyczną metodą jest przechowywanie szczepów na kulkach szklanych w bulionie z dodatkiem glicerolu w -70°C (lub ich komercyjnym odpowiedniku). Drobnoustroje niewymagające mogą być przechowywane w temperaturze -20°C. Każdy szczep powinien być przechowywany w dwóch powtórzeniach: jedno do bieżącego użycia, drugie jako bank, z którego w razie potrzeby uzupełnia się probówkę do bieżącego użycia.</p>
9.3	<p>Co tydzień należy wysiewać szczep z probówki do bieżącego użycia na odpowiednie podłoże nioselektywne w celu kontroli czystości. Z tak uzyskanej czystej hodowli należy przygotowywać nowe hodowle na każdy dzień tygodnia. W przypadku drobnoustrojów wymagających, których przeżywalność na płycie jest krótsza niż 5-6 dni, nie należy przesiewać ich codziennie przez dłużej niż tydzień.</p> <p>Przy przesiewaniu szczepów kontrolnych należy pobierać kilka kolonii, aby uniknąć wyselekcjonowania mutantów.</p>
9.4	<p>Wyniki szczepów kontrolnych powinny mieścić się w dopuszczalnych zakresach wartości umieszczonych w Tabelach Kontroli Jakości EUCAST (<i>EUCAST QC Tables</i>) dostępnych na http://www.eucast.org.</p>
9.4.1	<p>W Tabelach Kontroli Jakości EUCAST wyszczególnione są zarówno dopuszczalne zakresy wartości, jak i wartości oczekiwane. Powtórzenie badania szczepów kontroli jakości EUCAST powinno dać średnice stref wokół krążków losowo rozmieszczone w zalecanych zakresach wartości. Jeśli liczba testów jest ≥ 10, średnia wielkość strefy powinna być zbliżona do wartości oczekiwanej (± 1 mm od wartości oczekiwanej).</p>
9.5	<p>W celu kontrolowania wyników oznaczeń należy używać rekomendowanych szczepów do rutynowej kontroli jakości.</p> <p>Kontrola powinna być nastawiana i sprawdzana codziennie, a przynajmniej cztery razy w tygodniu dla antybiotyków, które są oznaczane rutynowo.</p> <p>Każdego dnia, kiedy nastawiane są badania, należy przejrzeć wyniki ostatnich 20 testów pod kątem występowania trendów lub stałego sytuowania się wyników powyżej lub poniżej wartości oczekiwanej. Jeśli dwa lub więcej wyników z 20 znajduje się poza dopuszczalnym zakresem, należy zbadać tego przyczynę.</p>
9.6	<p>Poza rutynową kontrolą jakości, należy sprawdzać każdą nową serię agaru Mueller-Hinton w celu upewnienia się, że wszystkie strefy znajdują się w dopuszczalnych zakresach wartości.</p> <p>Aminoglikozydy mogą uwidaczniać niedopuszczalne zmiany zawartości kationów dwuwartościowych w podłożu, tigeocyklina – zmiany w zawartości magnezu, trimetoprim – sulfametoksazol wskazuje na nieprawidłową zawartość tyminy, a erytromycyna – niedopuszczalne pH.</p>

Tabela 4: Drobnoustroje w rutynowej kontroli jakości		
Drobnoustrój	Szczep	Charakterystyka
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434	Wrażliwy, typ dziki
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5564 CCUG 30600 CECT 943	β - laktamaza TEM-1, oporny na ampicylinę (do kontroli inhibitora w krążkach z połączeniem β-laktam-inhibitor β-laktamazy)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	Producent ESBL (SHV-18) (do kontroli inhibitora w krążkach z połączeniem β-laktam-inhibitor β-laktamazy)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 NCTC 12934 CIP 76110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108	Wrażliwy, typ dziki
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 NCTC 12973 CIP 103429 DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794	Słaby producent β-laktamazy
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570 CCUG 9997 CECT 795	Wrażliwy, typ dziki
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619 NCTC 12977 CIP 104340 DSM 11967 CCUG 33638	Obniżona wrażliwość na benzylpenicylinę
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766 NCTC 12975 CIP 103570 DSM 11970 CCUG 29539	Wrażliwy, typ dziki
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560 NCTC 11351 CIP 702 DSM 4688, CCUG 11284	Wrażliwy, typ dziki Warunki badania, patrz Dodatek A

Tabela 5: Drobnoustroje w rozszerzonej kontroli jakości do wykrywania specyficznych mechanizmów oporności		
Drobnoustrój	Szczep	Charakterystyka
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	Producent ESBL (SHV-18)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12493	<i>mecA</i> dodatni, heterooporny MRSA
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289	Wysoki poziom oporności na aminoglikozydy (HLAR) i oporność na wankomycynę (<i>vanB</i> dodatni)
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	Obniżona wrażliwość na β -laktamy z powodu mutacji PBP (β -laktamazoujemny, oporny na ampicylinę, BLNAR)

Badanie *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* metodą dyfuzyjno-krażkową

Poniższe zasady (Tabela A1) powinny być stosowane podczas badania *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* metodą dyfuzyjno-krażkową wg EUCAST.

Tabela A1	Zastosowanie metody dyfuzyjno-krażkowej dla <i>Campylobacter jejuni</i> i <i>Campylobacter coli</i>
Podłoże	<p>Mueller-Hinton agar z 5% odwłóknionej krwi końskiej i 20 mg/L β-NAD (MH-F)</p> <p>W celu ograniczenia wzrostu mgławicowego, płytki z agarem MH-F powinny zostać osuszone przed inokulacją (w 20-25°C przez noc lub 35°C, bez przykrywki, przez 15 minut).</p>
Inokulum	0,5 McFarlanda
Inkubacja	<p>Obniżona zawartość tlenu 41±1°C 24 h</p> <p>Wynikiem inkubacji powinien być wzrost zlewny. Niektóre izolaty <i>C. coli</i> mogą nie wykazywać wystarczającego wzrostu po 24h. Ich inkubacja powinna zostać przedłużona, a strefy zahamowania wzrostu odczytane po 40-48h.</p> <p>Temperatura inkubacji 41±1°C została dobrana w celu stworzenia warunków sprzyjających wzrostowi <i>Campylobacter</i> spp.</p>
Odczyt	<p>Należy stosować standardowe instrukcje odczytu EUCAST:</p> <p>Płytki z podłożem MH-F należy odczytywać od przodu, ze zdjętą przykrywką, w świetle odbitym.</p> <p>Krawędzie stref powinny być odczytywane w punkcie całkowitego zahamowania wzrostu ocenianego okiem nieuzbrojonym z odległości ok. 30 cm.</p>
Kontrola jakości	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases