



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Vyšetření citlivosti k antibiotikům

EUCAST disková difuzní metoda

Verze 9.0

Leden 2021

Obsah	Strana
Změny od předchozí verze	
Zkratky a terminologie	
1 Úvod	5
2 Příprava a skladování půd	6
3 Příprava inokula	8
4 Inokulace agarových ploten	10
5 Aplikace disků s antibiotiky	11
6 Inkubace ploten	12
7 Prohlížení ploten po inkubaci	14
8 Měření zón a interpretace citlivosti	15
9 Kontrola kvality	17
Příloha A	21

Změny proti předchozí verzi (v 8.0)

Sekce	Změna
Tabulka 1 a Tabulka 3	Přidány <i>Achromobacter xylosoxidans</i> a <i>Bacillus</i> spp.
8.9.2.	Přidány specifické pokyny pro <i>Achromobacter xylosoxidans</i> a trimetoprim-sulfametoxazol.
8.9.4.	Přidán specifický návod pro <i>Enterobacterales</i> a temocilin.

Zkratky a terminologie

ATCC	American Type Culture Collection http://www.atcc.org
CCUG	Culture Collection University of Göteborg http://www.ccug.se
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo http://www.cect.org
CFU	Colony forming unit
CIP	Collection de Institut Pasteur http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html
CNCTC	Czech National Collection of Type Cultures http://apps.szu.cz/cnctc/
DSM	Bacterial cultures from Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen http://www.dsmz.de/index.htm
ESBL	širokospektrá β -laktamáza
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing http://www.eucast.org
MH	Mueller-Hinton agar
MH-F	Mueller-Hinton agar - náročné bakterie (MH obohacený 5 % defibrinované koňské krve a 20 mg/l β -NAD)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (s geny <i>mecA</i> nebo <i>mecC</i>)
NCTC	National Collection of Type Cultures https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc
β -NAD	β -nikotinamid adenin dinukleotid
KK	Kontrola kvality
Fyziologický roztok	Roztok 0,85 % NaCl ve vodě

Disková difuze je jedním z nejstarších způsobů vyšetřování antibiotické citlivosti a zůstává jednou z nejpoužívanějších metod v rutinních klinických laboratořích. Je vhodná k vyšetřování většiny bakteriálních patogenů včetně těch náročnějších, vyhovuje pro vyšetřování téměř všech antibiotik a nevyžaduje žádné zvláštní vybavení.

Metoda EUCAST, podobně jako další diskové metody, je standardizovaná metoda založená na principech definovaných v roce 1972 v publikaci International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing, a ověřovaná zkušenostmi mezinárodní skupiny expertů.

Breakpointy průměrů inhibičních zón v metodě EUCAST jsou kalibrovány na harmonizované evropské breakpointy, které EUCAST bezplatně zveřejňuje na své webové stránce (<http://www.eucast.org>).

Jako u jiných metod, je k dosažení reprodukovatelných výsledků nutno popsanou metodu dodržovat bez jakékoli modifikace.

2	Příprava a skladování pŮd
2.1	MH agar se připraví podle pokynů výrobce, a pro náročné bakterie se obohatí podle Tabulky 1 . Příprava a přidání suplementů je podrobně popsáno na http://www.eucast.org (česky http://www.szu.cz/priprava-medii-eucast).
2.2	Výška pŮdy by měla být 4 mm ± 0,5 mm (přibližně 25 ml na kulatou plotnu o průměru 90 mm, 31 ml na kulatou 100 mm plotnu, 71 ml na 150 mm kulatou plotnu, 40 ml na 100 mm čtvercovou plotnu). Je zapotřebí ověřit, zda bylo vypočítán správný objem podle skutečných rozměrů Petriho misek. Rozměry ploten různých výrobců se mohou lišit.
2.3	Před použitím by měl být povrch ploten suchý. Na povrchu agaru nebo uvnitř víčka by neměly být žádné viditelné kapky vody. Pokud je nezbytné, suší se plotny přes noc při 20-25 °C, nebo s odkrytým víčkem při 35 °C po 15 min. Přesušené plotny nelze používat.
2.4	Při vlastní (in-house) přípravě jsou plotny skladovány při 8-10 °C.
2.5	Při vlastní (in-house) přípravě ploten by měly být podmínky pro jejich sušení, uchovávání a použitelnost uvedeny v laboratorním programu zajištění jakosti.
2.6	Komerční pŮdy se skladují podle pokynů výrobce do data expirace.
2.7	Agarové pŮdy (získané od výrobce nebo vlastní přípravou), skladované v plastických sáčcích nebo uzavřených kontejnerech, může být nezbytné před použitím usušit (viz sekce 2.3). Tím se odstraní přebytečná vlhkost, která může být příčinou neostrých okrajů zón a/nebo povlaku uvnitř zón.

Tabulka 1	Půdy pro vyšetření citlivosti
Bakterie	Půda
<i>Enterobacterales</i>	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
Streptokoky skupin A, B, C a G	MH agar ¹
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH agar ¹
Skupina viridujících streptokoků	MH agar ¹
<i>Haemophilus influenzae</i>	MH agar ¹
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH agar ¹
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH agar ¹
<i>Pasteurella multocida</i>	MH agar ¹
<i>Campylobacter jejuni</i> a <i>coli</i>	MH agar ¹ (viz Příloha A)
<i>Corynebacterium</i> spp.	MH agar ¹
<i>Aerococcus sanguinicola</i> a <i>urinae</i>	MH agar ¹
<i>Kingella kingae</i>	MH agar ¹
<i>Aeromonas</i> spp.	MH agar
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	MH agar
<i>Bacillus</i> spp.	MH agar
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	MH agar
Jiné náročné bakterie	V přípravě

¹ MH + 5 % mechanicky defibrinované koňské krve + 20 mg/L β-NAD

3	Příprava inokula
3.1	<p>Kolonie bakterií se rozetřou přímo ve fyziologickém roztoku tak, aby zákal odpovídal stupni 0,5 McFarlandova zákalového standardu (Tabulka 2), tj. přibližně $1-2 \times 10^8$ CFU/ml u <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Přímý roztěr kolonií vyhovuje pro všechny bakterie, včetně náročných bakterií, uvedených v Tabulce 1.</p>
3.2	<p>Z kultury vyrostlé přes noc na neselektivní půdě se kolonie odebírají dotykem sterilní kličkou nebo bavlněným tamponem. Odebírá se pokud možno několik morfologicky podobných kolonií k vyloučení atypických variant. Kolonie se roztírají ve fyziologickém roztoku do vytvoření zákalu.</p>
3.3	<p>Hustota suspenze bakterií se upraví podle stupně 0,5 McFarlandova zákalového standardu přidáním fyziologického roztoku nebo bakterií. Hustší inokulum vytváří malé zóny inhibice, řídké inokulum má opačný účinek.</p>
3.3.1	<p>K úpravě vhodného zákalu lze doporučit fotometr. Fotometr musí být kalibrován podle pokynů výrobce na stupeň 0,5 McFarlandova zákalového standardu.</p>
3.3.2	<p>Alternativně se hustota inokula upravuje vizuálně porovnáváním se stupněm 0,5 McFarlandova zákalového standardu. K usnadnění lze použít bílý papír s vyznačenými černými linkami, na jehož pozadí se porovnává zákal inokula a standardu.</p>
3.3.3	<p>U <i>Streptococcus pneumoniae</i> se upřednostňuje příprava inokula z kultury narostlé na krevním agaru v zákalu 0,5 dle McFarlandova standardu. Pokud se připravuje inokulum <i>Streptococcus pneumoniae</i> z čokoládového agaru, musí být ekvivalentní zákalovému stupni 1,0 McFarlandova standardu.</p>
3.4	<p>Suspenze inokula se očkuje na plotny nejlépe do 15ti minut od přípravy, a vždy nejpozději do 60ti minut.</p>

¹ Část pravidla 15-15-15 minut: Inokulum se očkuje do 15ti minut od přípravy, disky se kladou do 15ti minut po inokulaci ploten a do 15ti minut po aplikaci disků je třeba plotny začít inkubovat.

Tabulka 2	Příprava stupně 0,5 McFarlandova zákalového standardu
1	K 99,5 ml 0,18 mol/l (0,36 N) H ₂ SO ₄ (1% v/v) se přidá 0,5 ml 0,048 mol/l BaCl ₂ (1,175% w/v BaCl ₂ ·2H ₂ O) a směs se promíchá.
2	Zákal suspenze se změří na spektrofotometru v kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Absorbance při 625 nm by měla být v rozmezí od 0,08 do 0,13.
3	Suspenze se rozplní do stejných zkumavek jako pro přípravu inokula. Zkumavky se uzavřou.
4	Uzavřené zkumavky se standardem se skladují při pokojové teplotě v temnu.
5	Bezprostředně před použitím se standard důkladně promíchá na vortexu.
6	Po 6 měsících skladování se standard připraví znovu, nebo se zkontroluje absorbance.

4	Inokulace agarových pŮd
4.1	Před inokulací je zapotřebí se ujistit, že agarové plotny mají pokojovou teplotu.
4.2	Suspenze inokula se očkuje na plotny nejlépe do 15ti minut od přípravy, a vždy nejpozději do 60ti minut.
4.3	Bavlněný tampon se ponoří do suspenze.
4.3.1	Přebytečné množství suspenze gramnegativních bakterií se odstraní otáčením přitlačeného tamponu po vnitřní stěně zkumavky.
4.3.2	U grampozitivních bakterií se tampon nepřitlačuje a neotáčí proti stěně zkumavky.
4.4	Očkuje-li se stejné inokulum na několik ploten, opakuje se u každé plotny postup popsáný v sekci 4.3.
4.5	Plotny se očkují tamponem ve třech směrech nebo automatickým rotátorem. Inokulum musí být rozetřeno po celém povrchu agaru tak, aby nevznikly žádné mezery mezi očkovacími čarami.
4.5.1	U grampozitivních bakterií se dbá se zvlášt' pečlivě na to, aby nevznikly žádné mezery mezi očkovacími čarami.
4.6	Disky se kladou do 15ti minut ¹ po inokulaci. Pokud jsou inokulované plotny ponechány při pokojové teplotě před aplikací disků delší dobu, bakterie mohou zahájit růst a výsledkem jsou chybné zóny inhibice o menším průměru.

¹ Část pravidla 15-15-15 minut: Inokulum se očkuje do 15ti minut od přípravy, disky se kladou do 15ti minut po inokulaci ploten a do 15ti minut po aplikaci disků je třeba plotny začít inkubovat.

5	Aplikace disků s antibiotiky
5.1	Požadované obsahy disků jsou v tabulkách Breakpoint a Quality Control Tables na http://www.eucast.org (česky http://www.szu.cz/tabulky-breakpointu-eucast a http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontroly-kvality-eucast).
5.2	Disky před otevřením zásobníků nebo nádobek, v nichž jsou uchovávány je nutno temperovat při pokojové teplotě. Toto opatření brání kondenzaci, jejímž důsledkem je rychlý rozklad některých antibiotik.
5.3	Disky se aplikují pevně na povrch inokulované agarové plotny do 15ti minut od inokulace ploten ¹ . Celá plocha disku musí být v těsném a rovnoměrném kontaktu s povrchem plotny. Po aplikaci se disk nesmí přesunovat, neboť difuze antibiotika z disku je velmi rychlá.
5.4	Počet disků na plotně je nutno omezit, aby se předešlo překrývání inhibičních zón a interferenci mezi antibiotiky. Tím lze dosáhnout spolehlivé měření průměrů zón. Počet disků na plotně závisí na vyšetřovaném druhu bakterie a na výběru disků. Nejvyšší počet disků je obvykle 6 na 90 mm a 12 na 150 mm kruhové plotně.
5.4.1	Pro detekci indukované rezistence ke klindamycinu u stafylokoků a streptokoků se disky s erytromycinem a klindamycinem umístí ve vzdálenosti 12-20 mm od okrajů disků pro stafylokoky a 12-16 mm od okrajů disků pro streptokoky.
5.5	Obvyklým zdrojem chyb je ztráta aktivity antibiotik v discích, která se projeví zmenšením inhibiční zóny. Je nezbytné postupovat takto:
5.5.1	Skladovat disky, včetně těch v dispenzorech nebo v uzavřených zásobnících s vysoušečem a chráněné proti světlu (některé z nich, jako metronidazol, chloramfenikol a fluorochinolony, inaktivuje delší expozice světlu).
5.5.2	Skladovat zásobní disky podle pokynů výrobce. Pro některá labilnější antibiotika (amoxicilin-klavulanová kyselina, cefaklor, karbapenemy) výrobci uvádějí speciální doporučení.
5.5.3	Dodávky disků je nutno skladovat podle pokynů výrobce. Disky z jednou otevřeného zásobníku by měly být používány do časového limitu uvedeného výrobcem.
5.5.4	Po datu expirace je nutno disky vyhodit.
5.5.5	Provádět časté kontroly kvality (viz sekce 9) používaných disků k ověření, zda disky s antibiotiky neztratily během skladování účinnost.

¹ Část pravidla 15-15-15 minut: Inokulum se očkuje do 15ti minut od přípravy, disky se kladou do 15ti minut po inokulaci ploten a do 15ti minut po aplikaci disků je třeba plotny začít inkubovat.

6	Inkubace ploten
6.1	K ujištění, že disky nepadnou z povrchu agaru, se plotny obrátí víčkem dolů. Plotny se dají inkubovat do 15ti minut ¹ od aplikace disků. Pokud jsou plotny po aplikaci disků ponechány při pokojové teplotě, vytvářejí se nežádoucí velké zóny v důsledku predifuze.
6.2	Stohování ploten v inkubátoru ve sloupcích je příčinou nerovnoměrné teploty ploten. Výkonnost inkubátorů je odlišná a proto je zapotřebí v rámci programu laboratorní kontroly kvality kontrolovat podmínky inkubace, včetně přiměřeného počtu ploten ve sloupcích. Pro většinu inkubátorů je vhodné ukládat plotny ve sloupcích po pěti.
6.3	Plotny je třeba inkubovat podle podmínek uvedených v Tabulce 3 .
6.3.1	Výsledkem inkubace delší než je doporučený časový limit může být růst uvnitř inhibičních zón a chybné označení rezistence u izolátu.
6.3.2	Při vyšetřování glykopeptidů jsou u některých kmenů <i>Enterococcus</i> spp. rezistentní kolonie viditelné až po inkubaci trvajících plných 24 h. Po 16-20 h sice lze plotny odečíst a hlásit případnou rezistenci, ale izoláty, které se po této době jeví jako citlivé, musí být reinkubovány a znovu odečteny za 24 h.

¹ Část pravidla 15-15-15 minut: Inokulum se očkuje do 15ti minut od přípravy, disky se kladou do 15ti minut po inokulaci ploten a do 15ti minut po aplikaci disků je třeba plotny začít inkubovat.

Tabulka 3	Podmínky inkubace ploten pro vyšetřování citlivosti
Bakterie	Podmínky inkubace
<i>Enterobacterales</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Pseudomonas spp.</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Acinetobacter spp.</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Staphylococcus spp.</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Enterococcus spp.</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h (24 h pro glykopeptidy)
<i>Aeromonas spp.</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Bacillus spp.</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Streptokoky sk. A, B, C a G	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h
Viridující streptokoky	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Haemophilus spp.</i>	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Pasteurella multocida</i>	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Campylobacter jejuni a coli</i>	Viz Příloha A
<i>Corynebacterium spp.</i>	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h. Nedostatečně vyrostlé izoláty jsou ihned reinkubovány a inhibiční zóny se odečítají po celkové době inkubace 40-44 h.
<i>Aerococcus sanguinicola a urinae</i>	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h. Nedostatečně vyrostlé izoláty jsou ihned reinkubovány a inhibiční zóny se odečítají po celkové době inkubace 40-44 h.
<i>Kingella kingae</i>	35 ± 1 °C v 4-6 % CO ₂ na vzduchu, 18 ± 2 h. Nedostatečně vyrostlé izoláty jsou ihned reinkubovány a inhibiční zóny se odečítají po celkové době inkubace 40-44 h.
Ostatní náročné bakterie	V přípravě

7	Prohlížení ploten po inkubaci
7.1	Správné inokulum, dobře rozetřené na plotny, poskytuje splývavý nárůst.
7.1.1	Málo koncentrované inokulum vytváří izolované kolonie a vyšetření je nutno opakovat.
7.2	Nárůst by měl být rovnoměrně rozprostřený na plotně, aby zóny inhibice byly ostré, s nevykousanými okraji.
7.3	Kontroluje se, zda inhibiční zóny kontrolních kmenů jsou v přípustném rozmezí (http://www.eucast.org , česky http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast)

8	Měření zón a interpretace citlivosti
8.1	Okraje zón u všech antibiotik (není-li stanoveno jinak v sekci 8.9) se odečítají ve vzdálenosti 30ti cm od oka, od bodu úplné inhibice viditelné pouhým okem. U obtížně viditelných zón pomůže naklonění plotny do úhlu 45 ° proti stolu.
8.2	Neobohacené plotny se odečítají ze spodní strany proti tmavému pozadí v odraženém světle.
8.3	Obohacené plotny se odečítají po odstranění víčka z horní strany v odraženém světle.
8.4	Plotny nelze odečítat v procházejícím světle (kdy je plotna umístěna proti zdroji světla) nebo pomocí lupy, pokud není stanoveno jinak (viz sekce 8.9).
8.5	Průměry zón lze měřit na nejbližší milimetr pravítkem nebo posuvným měřítkem.
8.5.1	Používá-li se automatický odečítač zón, musí být kalibrován podle manuálního odečítání.
8.6	Průměry zón se interpretují do kategorií citlivosti podle poslední verze tabulky breakpointů na http://www.eucast.org (česky http://www.szu.cz/tabulky-breakpointu-eucast).
8.7	Pokud se plotny odečítají s pomocí šablon, je zapotřebí umístit plotnu na šablonu a zóny interpretovat podle breakpointů EUCAST vyznačených na šabloně. Je třeba se ujistit, že breakpointy na šabloně jsou podle poslední verze tabulky breakpointů EUCAST. Program pro výrobu šablony je volně dostupný na http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program .
8.8	Několik obrázků s příklady odečítání průměrů zón uvádí Reading Guide EUCAST na http://www.eucast.org (česky Návod k odečítání http://www.szu.cz/diskova-difuzni-metoda-eucast). Tento dokument také zahrnuje pokyny pro odečítání specifických kombinací bakterie-antibiotikum.
8.9	Specifické pokyny pro odečítání:
8.9.1	Vyskytnou-li se dvojitě zóny, nebo odlišné kolonie uvnitř zóny, kontroluje se čistota kultury a test se případně opakuje. Pokud je kultura čistá, pak se při měření berou do úvahy kolonie uvnitř inhibiční zóny.
8.9.2	Antagonisté v půdě mohou být příčinou jemného růstu v zóně kolem disku s trimetoprimem nebo kombinace trimetoprimu se sulfametoxazolem. Takový nárůst se přehlídí a průměr zóny se měří od jejího zřetelného okraje.

Izolát *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* a *Burkholderia pseudomallei* lze označit jako citlivý, vytváří-li kolem disku s trimetoprimem-sulfametoxazolem jakoukoli známku inhibiční zóny \geq breakpoint pro citlivost. Je třeba upozornit, že uvnitř některých zón může být růst masivní. Až pokud kmen roste až k disku a není přítomna žádná známka inhibice, hodnotí se výsledek jako žádná zóna.

Aeromonas spp. se odečítá od okraje zřetelné inhibiční zóny kolem trimethoprimu-sulfamethoxazolu a jemné zastření nebo růst v zóně se přehlíží. Je-li vytvořen zřetelný okraj vnitřní zóny, odečítá se zóna od tohoto okraje.

- 8.9.3 U *Enterobacterales* a ampicilinu, ampicilinu-sulbaktamu a amoxicilinu-klavulanové kyseliny se přehlíží jemný růst ve vnitřní zóně, který se vyskytuje u některých šarží MH agaru.
- 8.9.4 Izolované kolonie *Enterobacterales* uvnitř inhibiční zóny temocilinu se přehlíží.
- 8.9.5 Izolované kolonie *E. coli* uvnitř inhibiční zóny kolem mecillinamu se přehlíží.
- 8.9.6 Izolované kolonie *E. coli* uvnitř inhibiční zóny kolem fosfomycinu se přehlíží a odečítá se od okraje vnější zóny.
- 8.9.7 Plazivý růst *Proteus* spp. uvnitř inhibičních zón se přehlíží a odečítá se inhibice růstu.
- 8.9.8 Okraj zóny kolem benzylpenicillinu se u *Staphylococcus aureus* prohlíží blízko proti zdroji světla (v procházejícím světle). Izoláty, které mají průměr inhibiční zóny \geq breakpoint pro citlivost, avšak s ostrými okraji zón, se označí jako rezistentní.
- 8.9.9 Při detekci rezistence k meticilinu pomocí cefoxitinu se změří průměr zřetelné zóny a uvnitř zóny inhibice se při dobrém osvětlení pátrá po koloniích. Tyto kolonie mohou být způsobeny kontaminací, nebo expresí heterogenní rezistence k meticilinu.
- 8.9.10 U enterokoků se okraje zóny kolem vankomycinu prohlížejí blízko proti zdroji světla (v procházejícím světle). Neostré okraje zóny a kolonie uvnitř zóny ukazují na rezistenci k vankomycinu a měly by být dále vyšetřeny. Izoláty nesmí být hlášeny jako citlivé dříve než za 24 h inkubace.
- 8.9.11 U hemolytických streptokoků se odečítá inhibice růstu, nikoli hemolýzy. β -hemolýza obvykle růst neobsahuje, zatímco α -hemolýza a růst se většinou překrývají. Odlišit růst od hemolýzy napomáhá naklánění plotny dopředu a dozadu.
- 8.9.12 U *H. influenzae* a beta-laktamů se průměr zóny odečítá od vnějšího okraje i v případě, kdy jasná inhibiční zóna obsahuje oblast růstu kolem disku.

9	Kontrola kvality
9.1	Ke sledování kvality vyšetření se používají specifické kontrolní kmeny (KK) uvedené v Tabulce 4 . Doporučené základní KK jsou typické citlivé kmeny. Pro ověření metod k detekci rezistence, zprostředkované známými mechanismy, jsou určeny rezistentní KK (Rozšířená kontrola kvality, Tabulka 5). KK mohou být zakoupeny ze sbírky kultur nebo z komerčních zdrojů.
9.1.1	Ke kontrole složky inhibitoru v discích obsahujících kombinaci inhibitor β -laktamázy s β -laktamem jsou doporučeny speciální producenti β -laktamázy (Tabulka 4). Tato kontrola by měla být prováděna rutinně. Kontrola aktivní složky se provádí citlivým KK.
9.2	KK se uchovávají v podmínkách, které udržují životaschopnost a vlastnosti kmenů. Vyhovující je skladování kmenů na skleněných korálcích při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v glycerolovém bujonu (nebo v podobné komerční pomůcce). Nenáročné bakterie mohou být uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Každý kmen by měl být uchováván ve dvou lahvičkách, v jedné pro použití a ve druhé v archivu jako případná náhrada lahvičky pro použití.
9.3	Každý týden se korálek z lahvičky pro použití subkultivuje na příslušnou neselektivní půdu a ověří se čistota kultury. Z této čisté kultury se každý den týdne připraví jedna subkultura. Náročná bakterie je zapotřebí přeočkovávat každý den, neboť po dobu týdne nepřežijí. KK lze přeočkovávat nejvýše za 6 dnů, pak se vyřadí a znovu se vyočkují ze zmrazené lahvičky. Po vypotřebování lahviček pro použití se nové lahvičky pro použití připraví z archivované lahvičky. Při subkultivaci KK se očkuje několik kolonií k prevenci selekce mutant.
9.4	Ověřuje se, zda výsledky jsou v přípustných rozmezech inhibičních zón uvedených v EUCAST QC Tables na http://www.eucast.org (česky http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast).
9.4.1	V tabulkách KK EUCAST jsou uvedeny cílové hodnoty i rozmezí. Opakovaná vyšetření KK EUCAST by měla poskytnout náhodně rozdělené hodnoty průměrů zón v doporučeném rozmezí. Je-li počet měření ≥ 10 , pak střední hodnota průměru zón by měla být v blízkosti cílové hodnoty ($\pm 1\text{ mm}$ od cílové hodnoty).
9.5	Ke sledování kvality vyšetření je nutno používat doporučené KK. Používá se stejný postup vyšetření citlivosti jako u klinických izolátů. Kontrolní testy by měly být prováděny a vyhodnocovány denně, nebo alespoň čtyři krát týdně u antibiotik v rutinní sestavě. Používá se stejný postup vyšetření citlivosti jako u klinických izolátů.
9.5.1	V každý den, kdy se vyšetření provede, se prohlédnou výsledky posledních 20ti testů následujících po sobě (konsekutivních). Prozkoumají se výsledky trendů a zón, které opakovaně spadají nad nebo pod přípustné rozmezí.
9.5.2	Pokud dva z testů nenásledujících po sobě jsou mimo rozmezí, avšak na stejné straně cílové hodnoty (target), lze výsledek vyšetření citlivosti klinického izolátu hlásit, je však zapotřebí vyšetřit příčinu.

- 9.5.3 Pokud jsou mimo rozmezí hodnoty dvou po sobě následujících testů, nebo u více disků vyšetřených v týž den, je zapotřebí před hlášením výsledků vyšetřit příčinu. Test možná bude nutno opakovat.
- 9.5.4 Není-li prokázána rezistence u rezistentního KK, je nutno pozastavit vyšetření citlivosti klinických izolátů, vyšetřit příčinu a rezistentní KK znovu otestovat.
- 9.5.5 Při hledání možných příčin chyb u diskové difúze je třeba vzít do úvahy problémy vztahující se k diskům s antibiotiky, podmínkám vyšetření a ke KK.
- 9.6 Kromě rutinní kontroly kvality je u každé nové šarže agaru Mueller-Hinton nutno ověřit, zda jsou všechny zóny v přípustném rozmezí. U každé nové šarže je nutno také změřit, zda výška agaru je v přípustném limitu.
- Nepříjemné odchylky se mohou vyskytnout v těchto souvislostech s kvalitou půdy: u aminoglykosidů a dvojmocných kationtů, u tigecyklinu a hořčíku, u trimetoprimu a trimetoprimu-sulfametoxazolu a obsahem tyminu a tymidinu, erytromycinu a nevhodném pH. Výška agaru nad a pod přípustným limitem je příčinou vytváření menších, respektive větších zón inhibice.
- 9.6.1 Na vyšší nebo nižší obsah dvojmocných kationtů (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ukazuje vytváření inhibičních zón kolem disků s aminoglykosidy o menším, respektive větším průměru u *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- 9.6.2 Na nadbytek tyminu a tymidinu ukazuje vytváření inhibičních zón pod přípustným rozmezím kolem disků s trimetoprimem a trimetoprimem-sulfametoxazolem u *E. coli* ATCC 29212.

Tabulka 4 Kontrolní kmeny pro rutinní kontrolu kvality		
Bakterie	Kmen	Vlastnosti
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434 CNCTC 5276	Citlivý, divoký typ
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5564 CCUG 30600 CECT 943 CNCTC 5321	TEM-1 β-laktamáza, kampicilinu rezistentní (pro kontrolu složky inhibitoru v discích s kombinací β-laktam a inhibitor β-laktamázy)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787 CNCTC 7439	Producent ESBL (SHV-18) (pro kontrolu složky inhibitoru v discích s kombinací β-laktam a inhibitor β-laktamázy)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 NCTC 12934 CIP 76110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108 CNCTC 5482	Citlivý, divoký typ
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 NCTC 12973 CIP 103429 DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794 CNCTC 5480	Slabý producent β-laktamázy
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570 CCUG 9997 CECT 795 CNCTC 5483	Citlivý, divoký typ
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619 NCTC 12977 CIP 104340 DSM 11967 CCUG 33638 CNCTC 5043	Snížená citlivost k benzylpenicilinu
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766 NCTC 12975 CIP 103570 DSM 11970 CCUG 29539 CNCTC 5105	Citlivý, divoký typ
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560 NCTC 11351 CIP 702 DSM 4688 CCUG 11284 CNCTC 7365	Citlivý, divoký typ Podmínky vyšetření, viz Příloha A

Tabulka 5	Další kontrolní kmeny k detekci specifických mechanismů rezistence	
Bakterie	Kmen	Vlastnosti
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787 CNCTC 7439	Producent ESBL (SHV-18)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2814	Producent KPC-3, SHV-11 a TEM-1
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12493 CCUG 67181	Heterorezistentní MRSA, <i>mecA</i> pozitivní
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289 CNCTC 5530	Rezistentní k vysoké koncentraci aminoglykosidů (HLAR) a k vankomycinu (<i>vanB</i> pozitivní)
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214 CNCTC 5063	Snížená citlivost k β-laktamům způsobená mutacemi PBP (β-laktamáza negativní, ampicilin rezistentní, BLNAR)

Příloha A

Disková difuzní metoda pro *Campylobacter jejuni* a *coli*

Při vyšetřování citlivosti diskovou difuzní metodou EUCAST u *Campylobacter jejuni* a *coli* musí být dodržen následující postup (Tabulka A1)

Tabulka A1	Disková difuzní metoda pro <i>Campylobacter jejuni</i> a <i>coli</i>
Půda	Mueller-Hinton agar s 5 % defibrinované koňské krve a 20 mg/l β -NAD (MH-F). Plazivému růstu lze předejít sušením ploten MH-F před inokulací (při 20-25 °C přes noc, nebo s odstraněným víčkem při 35 °C po dobu 15ti min).
Inokulum	McFarland 0,5
Inkubace	Mikroaerobní prostředí 41 ± 1 °C 24 h Růst po inkubaci by měl být splývavý. Některé izoláty <i>C. coli</i> po 24 h dostatečně nerostou. Takové izoláty je nutné ihned po odečtení dále inkubovat a zóny se odečítají po 40-48 h. Inkubační teplota 41 ± 1 °C zajišťuje optimální podmínky pro růst <i>Campylobacter</i> spp.
Odečítání	Provádí se MH-F ploten zepředu po odstranění víčka v odraženém světle. Odečítá se na plotně vzdálené zhruba 30 cm od prostého oka, nakloněné ve 45 °úhlu nad pracovním stolem, v místě úplné inhibice růstu na okraji inhibiční zóny.
Kontrola kvality	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560

X EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases