

Příprava půd pro diskovou difuzní metodu EUCAST a pro vyšetření hodnot MIC bujonovou mikrodiluční metodou.

Změny proti předchozí verzi (v. 5.0)

A. Půdy pro diskovou difuzní metodu

Sekce	Změna
Úvod	Přidány požadavky na půdu Mueller-Hinton

B. Půdy pro vyšetření MIC bujonovou mikrodiluční metodou

Sekce	Změna
Úvod	Byl aktualizován ISO standard 20776-1, verze 2019
Úvod	Přidány požadavky na půdu Mueller-Hinton

A. Půdy pro diskovou difuzní metodu

Mueller-Hinton agar (MHA) a MHA obohacený defibrinovanou koňskou krví a β -NAD (MH-F)

MH agar, nebohacený Mueller-Hinton agar, se užívá k testování nenáročných mikrobů.

MH-F, MH agar obohacený 5 % mechanicky defibrinované koňské krve a 20 mg/l β -NAD, se užívá k testování *Streptococcus* spp. (včetně *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* a *coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* a *urinae* a *Kingella kingae*.

Misky s agarovými půdami mohou být připraveny interně z dehydratovaných půd nebo zakoupeny již hotové z komerčních zdrojů. Dehydratované půdy Mueller-Hinton by měly splňovat požadavky uvedené v technické specifikaci ISO, ISO/TS 16782, 2016 a v kritériích pro kontrolu kvality zveřejněných EUCAST.

1. Reagencie	
1.1	Sušený MH agar z komerčního zdroje.
1.2	Mechanicky defibrinovaná koňská krev.
1.3	β -nikotinamid adenin dinukleotid (β -NAD), čistota \geq 98 %.

2. Příprava zásobního roztoku β -NAD	
2.1	β -NAD se rozpustí ve sterilní deionizované vodě do koncentrace 20 mg/ml.
2.2	Roztok se sterilizuje filtrací přes 0,2 μ m membránový filtr.
2.3	Zásobní roztok se rozdělí do několika zkumavek, které se uchovávají při -20 °C a podle potřeby se rozmrazí. Rozmražený roztok nelze opakovaně zmrazit.

3. Příprava agarových ploten	
3.1	MHA se připraví a autoklávuje podle pokynů výrobce.
3.2	Půda se ochladí na 42-45 °C.
3.3	Pro MH-F se na 1 l půdy asepticky přidá 50 ml mechanicky defibrinované koňské krve a 1 ml zásobního roztoku β-NAD. Směs se ihned dobře promíchá.
3.4	Půda se rozlije do Petriho misek ve výšce 4 mm ± 0,5 mm (přibližně 25 ml na kruhovou plotnu o průměru 90 mm, 31 ml na plotnu o průměru 100 mm, 71 ml na plotnu o průměru 150 mm a 40 ml na čtvercovou plotnu o straně 100 mm). Je třeba se ujistit, že objem je správně vypočítán podle rozměrů Petriho misky. Rozměry ploten různých výrobců se mohou lišit.
3.5	Před manipulací musí plotny ztuhnout.
3.6	Povrch agaru musí být před použitím suchý. Na povrchu agaru nebo na vnitřní straně víčka nesmí být žádné viditelné kapky vody. Je-li nezbytné, pak se plotny suší při 20-25 °C přes noc, nebo s odkrytým víčkem při 35 °C po 15 min. Půdy se nesmí přesušit.

4. Skladování půd	
4.1	Interně připravené plotny se skladují při 8-10 °C.
4.2	Pokyny pro sušení, skladování a trvanlivost interně připravených ploten by měly být součástí laboratorní kontroly kvality.
4.3	Komerčně připravené půdy by měly být skladovány podle doporučení výrobce a spotřebovány ve vyznačeném čase expirace.
4.4	Agarové plotny (získané komerčně nebo vlastní přípravou) a uložené v plastických sáčcích nebo v uzavřených zásobnících, může být před použitím nutno usušit. Důvodem je odstranění přebytku vlhkosti, která je příčinou vytváření nejasných okrajů zón a zastření uvnitř zón.

5. Kontrola kvality	
5.1	Kontrola požadovaného rozmezí pH 7,2-7,4 se provádí povrchovou pH elektrodou.
5.2	Kontroluje se, zda výška agaru je 4 mm ± 0,5 mm.
5.3	Kontroluje se, zda půda vyhovuje růstu příslušných kontrolních kmenů pro testované bakterie.
5.4	Podle doporučení EUCAST se provede disková difuze s kontrolními kmeny a ověří se, zda inhibiční zóny pro všechny kombinace bakterie-antibiotikum jsou v přípustném rozmezí (EUCAST QC Tables , česky http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast).

B. Půdy pro vyšetření MIC bujónovou mikrodiluční metodou

Mueller-Hinton bujon s upravenými kationty (MHB) a MHB obohacený lyzovanou koňskou krví a β -NAD (MH-F bujon)

MH bujon, neobohacený MHB s upravenými kationty, se užívá k testování nenáročných mikrobů podle standardu ISO 20776-1, 2019.

MH-F bujon, MHB s upravenými kationty, obohacený 5 % lyzované koňské krve a 20 mg/l β -NAD, se užívá k testování *Streptococcus* spp. (včetně *S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *M. catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* a *coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* a *urinae*, *Kingella kingae* a některých dalších náročných bakterií.

Neobohacený MH bujón lze zakoupit z komerčních zdrojů nebo připravit na místě podle pokynů výrobce. Dehydratovaný MH bujón by měl splňovat požadavky uvedené v technické specifikaci ISO, ISO/TS 16782, 2016 a v kritériích pro kontrolu kvality zveřejněných EUCAST.

MH-F bujon se připraví následujícím způsobem:

1. Reagencie	
1.1	MH bujón s upravenými kationty z komerčního zdroje.
1.2	50 % lyzovaná koňská krev.
1.3	β -nikotinamid adenin dinukleotid (β -NAD), čistota \geq 98 %.

2. Příprava zásobního roztoku 50% lyzované koňské krve	
2.1	Koňská krev se asepticky smíchá se stejným množstvím sterilní deionizované vody.
2.2	Směs se uloží přes noc v -20 °C a následně se rozmrazí. Tento postup se opakuje až do úplné lýzy buněk (obvykle stačí tři cykly, ale ISO standard 20776-1 doporučuje až sedm cyklů).
2.3	50 % lyzát koňské krve se centrifuguje a čirý supernatant se slije. Pro odečítání je nezbytné, aby roztok byl čirý. Nedostatečně čirý roztok může vzniknout neúplnou lýzou nebo nedostatečnou centrifugací. Opakováním centrifugace lze čirost roztoku zlepšit.
2.4	Zásobní roztok rozplněný v přiměřeném objemu se skladuje při -20 °C a rozmrazuje se před použitím. Nepoužitý roztok nelze znovu zmrazit.

3. Příprava zásobního roztoku β-NAD	
3.1	β -NAD se rozpustí ve sterilní neionizované vodě do koncentrace 20 mg/ml.
3.2	Roztok se sterilizuje filtrací přes 0,2 μ m membránový filtr.
3.3	Zásobní roztok se rozdělí do několika zkumavek, které se uchovávají při -20 °C a podle potřeby se rozmrazí. Rozmražený roztok nelze opakovaně zmrazit.

4. Příprava MH-F bujonu	
4.1	MH bujon s upravenými kationty se připraví a autoklávuje podle pokynů výrobce, avšak na 1 l půdy se přidává o 100 ml méně deionizované vody; příslušný objem vznikne přidáním lyzované koňské krve.
4.2	Půda se ochladí na teplotu 42-45 °C.
4.3	Pro MH-F bujon se na 1 l MH bujonu asepticky přidá 100 ml 50 % lyzované koňské krve a 1 ml zásobního roztoku β -NAD. Směs se ihned dobře promíchá.
4.4	MH-F bujon se rozplní do zkumavek se šroubovacím uzávěrem.

5. Skladování MH-F bujonu	
5.1	MH-F bujon se uchovává při 4-8 °C.
5.2	Skladovací podmínky a trvanlivost by měly být určeny v laboratorním programu kontroly kvality. Předpokládá se trvanlivost po 3 měsíce.

6. Kontrola kvality	
6.1	Kontroluje se, zda pH je v požadovaném rozmezí 7,2-7,4.
6.2	Kontroluje se, zda půda vyhovuje růstu příslušných kontrolních kmenů pro testované bakterie.
6.3	Kontroluje se, zda MIC antibiotik u kontrolních kmenů pro všechny kombinace bakterie-antibiotikum jsou v požadovaném limitu (EUCAST QC Tables , (česky http://www.szuz.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast)).