Ministerstwo Zdrowia

NPZ NARODOWY PROGRAM ZDROWIA

NARODOWY INSTYTUT LEKÓW · NATIONAL MEDICINES INSTITUTE

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2021-2025 finansowane przez Ministra Zdrowia

Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34,
00-725 Warszaw

Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości EUCAST

Oznaczanie lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową

Wersja 13.0
Styczeń 2025
Tłumaczenie na język polski

Spis treści

		Strona
	Zmiany w stosunku do poprzedniej wersji	3
	Skróty i terminologia	4
1	Wprowadzenie	5
2	Przygotowywanie i przechowywanie podłoży	6
3	Przygotowywanie inokulum	8
4	Inokulacja podłoży stałych	10
5	Nakładanie krążków antybiogramowych	11
6	Inkubacja płytek	12
7	Kontrola płytek po inkubacji	14
8	Pomiar stref i interpretacja wrażliwości	15
9	Kontrola jakości	17
	Dodatek A	21

Zmiany w stosunku do poprzedniej wersji (w. 11.0)

Sekcja	**Zmiana**
8.9.10	Informacja o obowiązującej szczegółowej instrukcji odczytu dla *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* i wankomycyny
Tabela 4	Dodanie *Escherichia coli* NCTC 13353

Skróty i terminologia	
ATCC	Amerykańska Kolekcja Szczepów Wzorcowych (ang. *American Type Culture Collection*) http://www.atcc.org
CCUG	Kolekcja Szczepów Uniwersytetu w Göteborgu (ang. *Culture Collection Universtity of Göteborg*) http://www.ccug.se
CECT	Hiszpańska Kolekcja Szczepów Wzorcowych (hiszp. *Colección Española de Cultivos Tipo*) http://www.cect.org
CFU	Jednostka tworząca kolonię (ang. *Colony Forming Unit*)
CIP	Kolekcja Instytutu Pasteura franc. *Collection de Institut Pasteur*) https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collection-institut-pasteur-cip
DSM	Szczepy bakterii z Niemieckiej Kolekcji Szczepów Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych (niem. *Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen* – DSMZ) https://www.dsmz.de/
ESBL	β-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania
EUCAST	Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) http://www.eucast.org
MH	Mueller-Hinton agar
MH-F	Mueller-Hinton agar dla drobnoustrojów wymagających (MH z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi końskiej i 20mg/L β-NAD)
MIC	Najniższe stężenie hamujące (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*)
MRSA	*Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (*mecA* lub *mecC* dodatni)
NCTC	Narodowa Kolekcja Szczepów Wzorcowych (ang. *National Collection of Type Cultures*) https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc
ß-NAD	Dinukleotyd β-nikotynoamidoadeninowy
QC	Kontrola jakości (ang. *Quality Control*)
Sól fizjologiczna	0,85% wodny roztwór NaCl (8,5 g/L)
Całonocna hodowla	Hodowlę bakteryjną inkubowano przez 16-24 godz

1 Wprowadzenie

Metoda dyfuzyjno-krążkowa 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-krążkowych, oparta jest na zasadach określonych w raporcie *International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing* z roku 1971[1] i doświadczeniach grup eksperckich z całego świata.

Wartości graniczne średnic stref zahamowania wzrostu są dopasowane do ujednoliconych europejskich wartości granicznych MIC publikowanych 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.

Zastosowanie metody dyfuzyjno-krążkowej przez EUCAST dla bakterii beztlenowych opisano w oddzielnym dokumencie (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology).

[1] HM Ericsson i JC Sherris. Badanie wrażliwości na antybiotyki. Raport z badania z współpracy międzynarodowej. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. 1971;217:Dodatek 217:1+.

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 ± 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**
Enterobacterales	MH agar
Pseudomonas spp.	MH agar
Stenotrophomonas maltophilia	MH agar
Acinetobacter spp.	MH agar
Staphylococcus spp.	MH agar
Enterococcus spp.	MH agar
Streptococcus grupy A, B, C i G	MH-F agar[1]
Streptococcus pneumoniae	MH-F agar[1]
Streptococcus grupa viridans	MH-F agar[1]
Haemophilus influenzae	MH-F agar[1]
Moraxella catarrhalis	MH-F agar[1]
Listeria monocytogenes	MH-F agar[1]
Pasteurella multocida	MH-F agar[1]
Campylobacter jejuni i *coli*	MH-F agar[1] (patrz Dodatek A)
Corynebacterium spp.	MH-F agar[1]
Aerococcus sanguinicola i *urinae*	MH-F agar[1]
Kingella kingae	MH-F agar[1]
Aeromonas spp.	MH agar
Achromobacter xylosoxidans	MH agar
Vibrio spp.	MH agar
Bacillus spp.	MH agar
Brucella melitensis	MH-F agar[1]
Burkholderia pseudomallei	MH agar

[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 x 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 ezą lub wymazówką, z całonocnej hodowli na podłożu nieselektywnym. 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 (dopuszczalny przedział 0,4-0,6) 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 (dopuszczalny przedział 0,9-1,1).

3.4 Zawiesina powinna zostać użyta w ciągu 15 minut[1], 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 $BaCl_2 \cdot 2H_20$) do 99,5 mL 0,18 mol/L (0,36 N) H_2S0_4 (1% v/v) i dokładnie wymieszać.
2	Gęstość zawiesiny należy sprawdzić za pomocą spektrofotometru przy ścieżce 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 zawiesinie.

4.3.1 W przypadku bakterii Gram-ujemnych należy usunąć nadmiar płynu z wymazówki przez odciśnięcie jej o wnętrze probówki. Zapobiega to nadmiernej inokulacji.

4.3.2 W przypadku bakterii Gram-dodatnich nie należy odciskać wymazówki o wnętrze probówki.

4.4 W przypadku inokulacji kilku płytek tę samą zawiesiną, dla każdej płytki należy powtórzyć czynności wymienione w podpunkcie 4.3.

4.5 Płytki mogą być inokulowane ręcznie poprzez rozprowadzenie zawiesiny w trzech kierunkach za pomocą wymazówki lub z użyciem automatycznego inokulatora. Zawiesinę 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 Krążki 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: 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.

5	**Nakładanie krążków antybiogramowych**

5.1 Wymagane zawartości krążków wymienione zostały w Tabelach Wartości Granicznych i Tabelach Kontroli Jakości na http://www.eucast.org.

5.1.1 Wartości graniczne średnic stref zahamowania wzrostu przez EUCAST oraz kryteria kontroli jakości dysków są zatwierdzone dla krążków o średnicy 6 mm

5.2 Krążki powinny pozostawać zamknięte w pojemnikach, w których są przechowywane, do uzyskania temperatury pokojowej. Zapobiega to skraplaniu się wody, które może prowadzić do szybkiego rozkładu niektórych antybiotyków.

5.3 Krążki należy nakładać na płytkę pewnym ruchem w ciągu 15 minut od jej inokulacji[1]. 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 aktualnie używanych krążków (patrz punkt 9).

[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.

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 cieplarce 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 po 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 *Enterococcus* spp. na glikopeptydy, kolonie oporne mogą nie być widoczne na płytkach przed upływem 24 h, jednak płytki mogą być oceniane po 16-20 h.
Po 16-20 h można raportować szczep jako oporny, ale inkubacja płytek z izolatami uznanymi po tym czasie za wrażliwe musi zostać przedłużona do 24 h. Po 24 h należy odczytać strefy ponownie.

[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 3	**Warunki inkubacji płytek z testami do badania lekowrażliwości**
Drobnoustrój	**Warunki inkubacji**
Enterobacterales	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Pseudomonas spp.	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Stenotrophomonas maltophilia	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Acinetobacter spp.	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Staphylococcus spp.	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Enterococcus spp.	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h (24 h w przypadku glikopeptydów)
Aeromonas spp.	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Achromobacter xylosoxidans	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Vibrio spp.	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Bacillus spp.	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Burkholderia pseudomallei	35±1°C w warunkach tlenowych przez 18 ± 2 h
Bacillus anthracis	35±1°C w warunkach tlenowych przez **17 ± 1 h**
Streptococcus grupy A, B, C i G	35±1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h
Streptococcus pneumoniae	35±1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h
Streptococcus grupa viridans	35±1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h
Haemophilus influenzae	35±1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h
Moraxella catarrhalis	35±1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h
Listeria monocytogenes	35±1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h
Pasteurella multocida	35±1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h
Brucella melitensis	35±1°C z 4-6% CO_2 przez **48 ± 2 h**
Campylobacter jejuni i *coli*	Patrz **Dodatek A**
Corynebacterium spp.	35 ± 1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h. Inkubacja izolatów, których wzrost jest niewystarczający po 16-20 h, powinna zostać przedłużona do 40-44 h. Po tym czasie należy odczytać strefy zahamowania wzrostu.
Aerococcus sanguinicola i *urinae*	35 ± 1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h. Inkubacja izolatów, których wzrost jest niewystarczający po 16-20 h, powinna zostać przedłużona do 40-44 h. Po tym czasie należy odczytać strefy zahamowania wzrostu.
Kingella kingae	35 ± 1°C z 4-6% CO_2 przez 18 ± 2 h. Inkubacja izolatów, których wzrost jest niewystarczający po 16-20 h, powinna zostać przedłużona do 40-44 h. Po tym czasie należy odczytać strefy zahamowania wzrostu.

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 wzorcowych 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. Jeśli granice strefy zahamowania wzrostu są trudne do wyznaczenia, trzymanie płytki pod kątem 45 stopni do blatu roboczego może ułatwiać odczyt.
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 szablonach 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 (*EUCAST Reading Guide*) na http://www.eucast.org. Dokument ten zawiera także wytyczne odczytu dla konkretnych połączeń drobnoustrój-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	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 W przypadku *Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter xylosoxidans* i *Burkholderia pseudomallei* oraz krążka trimetoprim- sulfametoksazol, każdy izolat przejawiający jakiekolwiek 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.

	W przypadku *Aeromonas* spp. i *Brucella melitensis* oraz krążka trimetoprim-sulfametoksazol, należy odczytywać wyraźną strefę zahamowania wzrostu i ignorować wzrost mgławicowy lub kolonie w jej obrębie. Jeśli krawędź wewnętrznej strefy jest wyraźnie widoczna, należy odczytywać ją jako strefę zahamowania wzrostu.
8.9.3	W przypadku *Enterobacterales* i krążka z ampicyliną, ampicyliną z sulbaktamem i amoksycyliną z kwasem klawulanowym należy ignorować delikatny wzrost tworzący wewnętrzną strefę na niektórych seriach agaru Mueller-Hinton.
8.9.4	W przypadku *Enterobacterales* i krążka z temocyliną należy ignorować pojedyncze kolonie w strefie zahamowania wzrostu i odczytywać zewnętrzną krawędź strefy.
8.9.5	W przypadku *Enterobacterales* i krążka z mecylinamem należy ignorować pojedyncze kolonie w strefie zahamowania wzrostu i odczytywać zewnętrzną krawędź strefy.
8.9.6	W przypadku *Escherichia coli* i krążka *z* fosfomycyną należy ignorować pojedyncze kolonie w strefie zahamowania wzrostu i odczytywać zewnętrzną krawędź strefy.
8.9.7	W przypadku *Proteus* spp. należy ignorować wzrost mgławicowy i odczytywać strefę zahamowania wzrostu.
8.9.8	W przypadku *Staphylococcus aureus* i krążka z penicyliną benzylową o średnicy ≥ 26 mm, należy dokładnie przyjrzeć się granicy strefy od przodu płytki, 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 oporne.
8.9.9	Jeśli do wykrywania oporności na metycylinę u *Staphylococcus spp.* 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.
8.9.10	W przypadku *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* i średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z wankomycyną ≥12 mm, należy przyjrzeć się strefie od przodu płytki, 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.
8.9.11	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.
8.9.12	W przypadku *H. influenzae* z antybiotykami β-laktamowymi, kiedy w wyraźnej strefie zahamowania wzrostu pojawia się podrost tuż przy krążku, należy odczytywać zewnętrzną krawędź strefy.
8.9.13	W przypadku *Brucella melitensis* i krążka z ryfampicyną należy dokładnie przyjrzeć się pod kątem kolonii w pobliżu krawędzi strefy. Kolonie powinny być brane pod uwagę podczas czytania.

9 Kontrola jakości

9.1 W celu kontroli jakości wyników oznaczenia należy użyć szczepów wzorcowych wymienionych w **Tabeli 4**. Podstawowymi szczepami kontrolnymi są typowe, wrażliwe szczepy. Szczepy oporne także mogą być wykorzystywane do potwierdzenia, że daną metodą można wykryć oporność związaną ze znanymi mechanizmami oporności (rozszerzona kontrola jakości, **Tabela 5**). Szczepy wzorcowe można nabyć z kolekcji kultur lub ze źródeł komercyjnych.

9.1.1 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.

9.2 Szczepy wzorcowe powinny być przechowywane w warunkach, które zapewnią im przeżywalność i utrzymanie cech charakterystycznych. Praktyczną metodą jest przechowywanie szczepów w -70°C na kulkach szklanych w bulionie z dodatkiem glicerolu (lub ich komercyjnym odpowiedniku). 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.

9.3 Co tydzień należy wysiewać szczep z probówki do bieżącego użycia na odpowiednie podłoże nieselektywne w celu kontroli czystości. Z tak uzyskanej czystej hodowli należy przygotowywać nowe hodowle na każdy dzień tygodnia. W przypadku drobnoustrojów wymagających, których przeżywalność na płytce jest krótsza niż tydzień, nowe hodowle powinny być przygotowywane kolejno każdego dnia. Szczepy wzorcowe mogą być przesiewane przez maksimum sześć dni, po których płytki należy wyrzucić. Materiał na nową płytkę do kontroli czystości powinien zostać wysiany z zamrożonej probówk do bieżącego użycia. Kiedy zawartość probówki do bieżącego użycia się skończy, należy wysiać materiał z banku (z podpunktu 9.2), a z uzyskanej hodowli przygotować kolejną probówkę do bieżącego użycia.

Przy przesiewaniu szczepów kontrolnych należy pobierać kilka kolonii, aby uniknąć wyselekcjonowania mutantów.

9.4 Wyniki szczepów kontrolnych powinny mieścić się w dopuszczalnych zakresach wartości umieszczonych w Tabelach Kontroli Jakości EUCAST (*EUCAST QC Tables*) dostępnych na http://www.eucast.org.

9.4.1 W Tabelach Kontroli Jakości EUCAST wyszczególnione są zarówno dopuszczalne zakresy wartości, jak i wartości oczekiwane. Powtórzenie badania szczepów wzorcowych 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).

9.5 W celu kontrolowania wyników oznaczeń należy używać rekomendowanych szczepów do rutynowej kontroli jakości. Należy używać całonocnych hodowli szczepów wzorcowych oraz stosować taką samą procedurę badania jak dla izolatów klinicznych.

Kontrola powinna być nastawiana i sprawdzana codziennie, a przynajmniej cztery razy w tygodniu dla antybiotyków, które są oznaczane rutynowo. Wyniki kontroli powinny być odczytywane i oceniane przed wystawieniem wyników oznaczenia lekowrażliwości dla izolatów klinicznych.

9.5.1 Każdego dnia, kiedy nastawiane są badania, należy przejrzeć wyniki minimum 20 ostatnich oznaczeń pod kątem występowania trendów lub stałego sytuowania się wyników powyżej lub poniżej wartości oczekiwanej.

9.5.2 Jeśli dwa nie-kolejne wyniki znajdują się poza dopuszczalnym zakresem po tej samej stronie wartości oczekiwanej, można raportować wyniki lekowrażliwości dla izolatów klinicznych, ale należy zbadać tego przyczynę.

9.5.3 Jeśli wyniki dwóch kolejnych oznaczeń znajdują się poza dopuszczalnym zakresem lub jeśli wyniki dla wielu krążków nastawianych jednego dnia znajdują się poza dopuszczalnym zakresem, należy zbadać przyczynę przed wydaniem wyników oznaczenia lekowrażliwości dla izolatów klinicznych. Oznaczenia mogą wymagać powtórzenia.

9.5.4 Jeśli oporny szczep wzorcowy nie daje wyniku "oporny", należy wstrzymać wydawanie wyników oznaczenia lekowrażliwości dla izolatów klinicznych, zbadać przyczynę i powtórzyć oznaczenia.

9.5.5 Podczas szukania możliwych przyczyn błędów w metodzie dyfuzyjno-krążkowej należy rozważyć problemy związane z krążkami antybiogramowymi, podłożami, warunkami oznaczeń oraz szczepami wzorcowymi.

9.6 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. Dla każdej nowej partii podłoża Mueller-Hinton należy także zmierzyć głębokość agaru, aby upewnić się, że mieści się w dopuszczalnych granicach.

Aminoglikozydy mogą uwidaczniać niedopuszczalne zmiany zawartości kationów dwuwartościowych w podłożu, tigecyklina – zmiany w zawartości magnezu, trimetoprim-sulfametoksazol wskazuje na nieprawidłową zawartość tyminy i tymidyny, a erytromycyna – niedopuszczalne pH. Zbyt gruba lub zbyt cienka warstwa agaru powoduje odpowiednio zaniżenie lub zawyżenie wielkości stref zahamowania wzrostu.

9.6.1 Wyniki kontroli jakości krążków z aminoglikozydami dla *P. aeruginosa* ATCC 27853 poniżej lub powyżej dopuszczalnego zakresu mogą wskazywać na odpowiednio za wysokie lub za niskie stężenie kationów dwuwartościowych (Ca^{2+}, Mg^{2+}).

9.6.2 Wyniki kontroli jakości krążków z połączeniem trimetoprim-sulfametoksazol dla *E. faecalis* ATCC 29212 poniżej dopuszczalnego zakresu mogą wskazywać na nadmiar tyminy i tymidyny w podłożu.

Tabela 4	Drobnoustroje w rutynowej kontroli jakości	
Drobnoustrój	**Szczep**	**Charakterystyka**
Escherichia coli	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 76.24 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434	Wrażliwy, typ dziki
Escherichia coli	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5923 CCUG 30600 CECT 943	β-laktamaza TEM-1, oporny na ampicylinę (do kontroli inhibitora w krążkach z połączeniem β-laktam – inhibitor β-laktamazy)
Escherichia coli	NCTC 13353	Producent ESBL (CTX-M-15) i OXA-1 (do kontroli inhibitora w krążkach z połączeniem β-laktam – inhibitor β-laktamazy)
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	Producent ESBL (SHV-18) (do kontroli inhibitora w krążkach z połączeniem β-laktam – inhibitor β-laktamazy)
Klebsiella pneumoniae	ATCC BAA-2814	KPC-3, SHV-11 i TEM-1 (do kontroli inhibitora w krążkach z połączeniem β-laktam – inhibitor β-laktamazy)
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853 NCTC 12903 CIP 76.110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108	Wrażliwy, typ dziki
Staphylococcus aureus	ATCC 29213 NCTC 12973 CIP 103429 DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794	Słaby producent β-laktamazy
Enterococcus faecalis	ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570 CCUG 9997 CECT 795	Wrażliwy, typ dziki
Streptococcus pneumoniae	ATCC 49619 NCTC 12977 CIP 104340 DSM 11967 CCUG 33638	Obniżona wrażliwość na penicylinę benzylową

Haemophilus influenzae	ATCC 49766 NCTC 12975 CIP 103570 DSM 11970 CCUG 29539	Wrażliwy, typ dziki
Campylobacter jejuni	ATCC 33560 NCTC 11351 CIP 70.2T DSM 4688 CCUG 11284	Wrażliwy, typ dziki Warunki badania: patrz Dodatek A

Tabela 5	**Drobnoustroje w rozszerzonej kontroli jakości do wykrywania określonych mechanizmów oporności**	
Drobnoustrój	**Szczep**	**Charakterystyka**
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	Producent ESBL (SHV-18)
Staphylococcus aureus	NCTC 12493 CCUG 67181	*mecA* dodatni, metycylinooporny (MRSA)
Enterococcus faecalis	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289	Obecność enzymu modyfikującego aminoglikozydy (wysoki poziom oporności na aminoglikozydy – HLAR) i oporność na wankomycynę (*vanB* dodatni)
Haemophilus influenzae	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	Obniżona wrażliwość na β-laktamy z powodu mutacji PBP

Dodatek A

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

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

Tabela A1	**Zastosowanie metody dyfuzyjno-krążkowej dla *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli***
Podłoże	Mueller-Hinton agar z 5% odwłóknionej krwi końskiej i 20 mg/L β-NAD (MH-F) 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).
Inokulum	0,5 McFarlanda
Inkubacja	warunki mikroaerobowe 41 ± 1°C 24 h ± 1 h Wynikiem inkubacji powinien być wzrost zlewny. Niektóre izolaty *C. coli* mogą nie wykazywać wystarczającego wzrostu po 24 h. Ich inkubacja powinna zostać przedłużona, a strefy zahamowania wzrostu odczytane po 40-48 h. Temperatura inkubacji 41 ± 1°C została dobrana w celu stworzenia warunków sprzyjających wzrostowi *Campylobacter* spp.
Odczyt	Płytki z podłożem MH-F należy odczytywać od przodu płytki, ze zdjętą przykrywką, w świetle odbitym. Krawędzie stref powinny być odczytywane w punkcie całkowitego zahamowania wzrostu ocenianego okiem nieuzbrojonym z odległości ok. 30 cm i pod kątem 45 stopni do blatu roboczego.
Kontrola jakości	*Campylobacter jejuni* ATCC 33560