

Postup při zavádění breakpointů EUCAST do vyšetřování citlivosti

Před zavedením metod vyšetřování citlivosti a breakpointů EUCAST do laboratoře je třeba zvážit následující:

1. Kontaktovat národní antibiotickou komisi (NAK) pro vyšetřování antibiotické citlivosti.
2. Identifikovat všechny metody pro vyšetření citlivosti používané v laboratoři (disková difuze, automatické metody, gradientní testy a ostatní metody). Ujistit se, že všechny metody jsou vhodné pro použití breakpointů EUCAST.
3. Identifikovat podpůrné systémy, které může zavedení ovlivnit (laboratorní akreditaci, příručky, laboratorní informační systém a povinné hlášení výsledků).
4. Určit "vedoucího" laboratorního personálu, který bude mít zodpovědnost v celém průběhu zavádění metod EUCAST.
5. Spolupracovat s laboratoří, která již zavedla breakpointy a metody vyšetření citlivosti EUCAST. Dohodnout návštěvu pracovníků v této laboratoři.
6. Identifikovat a informovat všechny zúčastněné strany (zaměstnance laboratoře, zákazníky / uživatele, laboratorní programy a programy surveillance a dodavatele materiálu a přístrojů pro vyšetření citlivosti).
7. Ujistit se, že je k dispozici veškerý potřebný materiál k vyšetření citlivosti. Zkontrolovat připravenost výrobců produktů (materiálu a pomůcek) nezbytných pro vyšetření citlivosti podle doporučení EUCAST (webová stránka EUCAST [Compliance of manufacturers](#)).
8. V předem stanoveném termínu realizovat v laboratoři 3-6 měsíční vzdělávací program pro zavedení metod v laboratoři.
9. Informovat organizátory programu externího hodnocení kvality.
10. V případě potřeby konzultovat EUCAST (kontaktní informace jsou k dispozici na <http://www.eucast.org/>).

Problematika zavádění automatizovaných systémů vyšetření citlivosti

1. Kontaktovat národní antibiotickou komisi pro vyšetřování antibiotické citlivosti (NAK) ohledně jakéhokoli problému.
2. Ujistit se, že daný automatizovaný systém poskytuje podporu pro breakpointy EUCAST všech požadovaných antibiotik. Zeptat se výrobce, zda jeho systém akceptuje aktuální doporučení EUCAST (v různých zemích a v odlišném čase instalace systému se mohou vyskytnout rozdíly).
3. Zkontrolujte, zda symboly "IE" a "-" uvedené v tabulkách EUCAST nejsou v automatizovaném systému nahrazeny jinými breakpointy.

Problematika zavádění diskové difúzní metody EUCAST

Základem diskové difúzní metody EUCAST je splývavé inokulum (McFarland 0,5) na Mueller-Hinton agaru s nebo bez 5% koňské krve a 20 mg/l β -NAD. Je důležité dodržovat postup metody podle popisu (dostupného na www.eucast.org).

Je třeba si všimnout těchto důležitých detailů:

- **Suspenze inokula by měla být ekvivalentní standardu McFarland 0,5**, nejlépe při měření fotometrem.
Výjimka: suspenze *Streptococcus pneumoniae* z nárůstu na krevním agaru se připravuje podle standardu McFarlanda 0,5, z čokoládového agaru podle standardu McFarlanda 1,0.
- **Růst by měl být splývavý a rovnoměrně rozložený na plotně.**
Správné inokulum, příslušně rozetřené na plotnách, vytváří splývající nárůst a uniformně kruhové inhibiční zóny. Rovnoměrné rozetření inokula poskytuje reprodukovatelné průměry inhibičních zón. Zvláštní pozornost před inokulací ploten je zapotřebí věnovat odstranění přebytečné tekutiny lehkým otáčením tamponu proti stěnám zkumavky k odstranění příliš koncentrovaného inokula gramnegativních bakterií.
- **Pravidlo 15-15-15 minut** k získání reprodukovatelných výsledků:
 - o Do 15ti minut od přípravy použít inokulum.
 - o Do 15ti minut od inokulace ploten aplikovat disky.
 - o Do 15ti minut od aplikace disků zahájit inkubaci.Dodržování pravidla "15-15-15" si může vyžádat malé změny v organizaci práce rutinní laboratoře, např. provádění testů po menších dávkách.
- **Používat disky se správným obsahem.** Obsah disků je uveden v tabulkách klinických breakpointů a v tabulkách pro kontrolu kvality EUCAST. Obsahy disků se mohou odlišovat od obsahů dříve používaných v laboratoři.

- **Neprodłużovat nebo nezkracovat předepsanou dobu inkubace 16-20h.**
- **Postupovat podle pokynů pro odečítání.**
Okraje zóny by měly být odečítány v místě úplné inhibice viditelné pouhým okem. Plotny Mueller-Hinton bez suplementů se odečítají v odraženém světle na spodní straně misky, umístěné na tmavém pozadí. Plotny Mueller-Hinton se suplementy se odečítají v misce s odkrytým víčkem v odraženém světle při pohledu zřepředu.

Návrh postupu při zavádění diskové difuzní metody EUCAST do laboratoře: Praktický průvodce vedoucího laboranta

1. Vzdělávat laboratorní personál v diskové difuzní metodologii se zaměřením na očkování ploten a měření zón. Presentace je na www.eucast.org (česky na <http://www.szu.cz/diskova-difuzni-metoda-eucast>).
2. Zahájit praktický výcvik tím, že všichni laboratorní pracovníci odečtou zóny ze stejné plotny. Cílem je sladit odečítání inhibičních zón v laboratoři. Stejný výcvik je zapotřebí provést před zařazením nových pracovníků do rutinní práce v laboratoři. Návod k odečítání je na www.eucast.org (česky na <http://www.szu.cz/diskova-difuzni-metoda-eucast>).
 - Začít odečítáním zón dvou kontrolních kmenů (např. *E. coli* ATCC 25922 a *S. aureus* ATCC 29213) na agaru Mueller-Hinton agar bez suplementů. Vybrat čtyři antibiotika, rutinně testovaná u příslušného druhu. Vyšetření opakovat tři dny po sobě. Srovnat průměry inhibičních zón naměřené laboratorními pracovníky mezi sebou a v jednotlivých dnech a zjistit, zda jsou v limitním rozmezí hodnot kontrolních kmenů. Tabulky pro kontrolu kvality jsou dostupné na www.eucast.org (česky na <http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast>).
 - Diskutovat o výsledcích na poradách. Opakovat výuku se stejnými kontrolními kmeny a antibiotiky, pokud se nebudou výsledky všech shodovat.
 - Opakovat výcvik s *P. aeruginosa* ATCC 27853 a *E. faecalis* ATCC 29212.
 - Opakovat výcvik na MH-F (agar Mueller-Hinton s 5% koňské krve a 20 mg/l β -NAD) s *H. influenzae* NCTC 8468 a *S. pneumoniae* ATCC 49619.
 - Opakovat výcvik s několika klinickými izoláty dalších bakterií, jako jsou streptokoky skupin A, B, C a G. Porovnat jednotlivé výsledky s průměrem skupiny.
3. Dalším krokem je příprava inokula a očkování ploten. Cílem je dosáhnout standardizovaný, splývající a neroztřepený nárůst na plotně. Nejlepší způsob k získání příslušné koncentrace inokula je použití jednoduchého nefelometru / spektrofotometru. Bez ohledu na použitý způsob inokulace ploten (vatovým tampónem, plotnovým rotátorem nebo ručním rozetřením

ve třech směrech) by měl být výsledný nárůst splývavý a neroztřepený. Odečítání usnadňuje použití antibiotických disků, které vytvářejí ostrý okraj zóny.

Laboratorní pracovníci by měli tento postup opakovat u všech kontrolních kmenů doporučených EUCAST. Srovnají se průměry inhibičních zón naměřené laboratorními pracovníky mezi sebou a v jednotlivých dnech a zjistí se, zda jsou v limitním rozmezí hodnot kontrolních kmenů. Tabulky pro kontrolu kvality jsou dostupné na www.eucast.org (česky na <http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast>).

4. Před zavedením diskové difuzní metody EUCAST do rutinní práce v laboratoři se kontrola kvality s kontrolními kmeny (s využitím všech běžně používaných antibiotických disků) provádí denně, dokud není postup v laboratoři harmonizován a testování je kompatibilní s požadavky EUCAST.

Máte otázky ohledně diskové difuzní metody? Nebo potřebujete pomoc při provádění diskového difuzního testu?

Kontaktujte prosím erika.matuschek@ltkronoberg.se