

Disková difuzní metoda EUCAST pro vybrané rychle rostoucí anaerobní bakterie* na agaru pro náročné anaeroby – Fastidious Anaerobe Agar with defibrinated horse blood (FAA-HB)

* Tato metoda je validována pro *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* a *Cutibacterium acnes* při inkubaci po dobu 16-20 h. Nelze ji použít pro jiné druhy anaerobních bakterií nebo pro inkubaci delší než 20 h.

Změny proti předchozí verzi (1.0)

Oddíl	Změna
Obecné	Zkratka pro půdu se změnila z FAA na FAA-HB
Půda, 1c	Očekávaná minimální trvanlivost pro vlastní (in-house) FAA-HB se změnila ze 4 na 21 dní
Inokulace, 1a Odstranění problémů, 1b	Nové doporučení pro <i>Clostridium perfringens</i> – odstranit přebytečnou tekutinu z bavlněného tamponu před nanášením inokula
Inokulace, 2a Odstranění problémů, 1b	Informace doplněná o to, že je obzvláště důležité pečlivě čárkovat („to streak“) plotny s FAA-HB u některých <i>Prevotella</i> spp. rostoucích v drobných koloniích
Odstranění problémů, 1a	Přidány informace o složení komerčních ploten FAA-HB
Odstranění problémů, 1c	Další informace o počtu disků daných na jednu plotnu
Tabulky QC	Kritéria kontroly kvality pro anaerobní kmeny QC přesunuta z tohoto dokumentu do tabulek EUCAST QC v. 13.0

Půda

1. Používá se Fastidious Anaerobe Agar s 5% mechanicky defibrinované koňské krve (FAA-HB) a bez dalších přísad.
 - a. Výška agaru musí být $4,0 \pm 0,5$ mm.
 - b. Při vlastní přípravě (in-house) ploten se před přidáním krve půda ochladí na 42-45 °C.
 - c. Vlastní (in-house) plotny by měly být skladovány při teplotě 4-8 °C ve větraných stojanech a chráněny před světlem. Doba skladování by měla být stanovena v rámci programu zajištění kvality laboratoře, nicméně lze očekávat minimální trvanlivost 21 dní.
 - d. Komerčně připravené plotny by měly být skladovány podle doporučení výrobce, chráněny před světlem a použity před datem expirace.
 - e. Plotny FAA-HB se musí před očkovaní vysušit k odstranění přebytečné vlhkosti, která může být příčinou neostrých okrajů zón, plazivého růstu a/nebo zamlžení uvnitř zón. Lze použít jeden z následujících postupů:
 - i. sušení při 20-25 °C přes noc, nebo
 - ii. sušení při 35 °C s odkrytým víčkem po dobu 15 min. Před tímto krokem musí mít plotny pokojovou teplotu.
 - iii. u ploten skladovaných v plastových sáčcích nebo uzavřených nádobách může být nezbytné postupovat podle (i) a následně podle (ii).
 - f. Před použitím se plotny FAA-HB ne pre-redukuje v anaerobním prostředí.

Příprava inokula

1. Z kultury narostlé přes noc na neselektivní půdě se odebere několik morfologicky podobných kolonií pomocí sterilní kličky nebo bavlněným tamponem.
2. Kolonie se suspendují v 0,85 % fyziologickém roztoku a promíchají se tak, aby vznikl rovnoměrný zákal.
3. Hustota inokula se upraví přidáním fyziologického roztoku nebo bakterií na 1,0 McFarlanda (0,9-1,1). Doporučuje se použít fotometr.
4. Suspenze inokula se použije do **15 minut** od přípravy.

Inokulace agarových ploten

1. Sterilní bavlněný tampon se ponoří do suspenze o zákalu 1,0 McFarlanda.
 - a. U *Bacteroides* spp. a *Clostridium perfringens* se přebytečná tekutina odstraní otáčením po vnitřní stěně zkumavky, aby nedošlo k naočkování přílišného množství inokula.
2. Inokulum se rovnoměrně rozetře po celém povrchu agaru tak, aby nevznikly mezery.
 - a. To je zvláště důležité u druhů rostoucích v drobných koloniích na FAA-HB, jako *Cutibacterium acnes* a některé *Prevotella* spp.

Na správně inokulovaných plotnách je růst splývavý s rovnoměrně kruhovými inhibičními zónami.

Aplikace disků s antibiotiky

1. Použijí se disky s obsahem antibiotik doporučené EUCAST, uvedené v [Tabulkách kontroly kvality EUCAST](#) nebo [Tabulkách breakpointů EUCAST](#) (česky: [Klinické breakpointy - breakpointy a návody - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#)) a [Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#) – Kontrola kvality EUCAST).
2. Před otevřením se kazety nebo kontejnery s disky ponechají při pokojové teplotě temperovat.
3. Disky se na plotnu aplikují do **15 minut** od inokulace.
 - a. Disky musí být v těsném a rovnoměrném kontaktu s povrchem agarů a po aplikaci se již nesmí přesouvat.
 - b. Počet disků na plotně musí být omezen tak, aby se vytvořené zóny nepřekrývaly. Optimálně se použijí tři disky na kruhovou plotnu o průměru 90 mm (pro *Bacteroides* spp. lze použít čtyři disky).

Inkubace ploten

1. Plotny se obrátí dnem vzhůru k ujištění, že disky nespadly z povrchu agarů. Plotny se dají inkubovat do **15 minut** po aplikaci disků.
2. Plotny FAA-HB se inkubují v anaerobním prostředí při 35-37 °C po dobu 16-20h.
 - a. Anaerobních podmínek lze dosáhnout buď v anaerobní pracovní stanici, nebo v nádobách, v nichž se vyvíjí plyn pro anaerobní prostředí nebo v systému vyvíjejícím plyn, jako je Anoxomat.
 - b. Prodloužení inkubace (více než 20h) není povoleno, neboť ovlivňuje velikost zón a zneplatňuje kritéria pro interpretaci.

Odečítání inhibičních zón

1. Správné inokulum poskytuje splývavý rovnoměrný růst po celém povrchu agarů. Není-li růst splývavý, je zapotřebí test zopakovat nebo vyšetřit MIC.
2. Plotny se odečítají zepředu po odstranění víčka v odraženém světle.
3. Okraje zón se odečítají od bodu úplné inhibice viditelné pouhým okem, z plotny držené ve vzdálenosti zhruba 30 cm od oka, nakloněné v úhlu 45° k pracovnímu stolu.
4. Průměr inhibiční zóny se měří pravítkem nebo posuvným měřítkem na nejbližší milimetr.
 - a. Při zastření uvnitř zóny se odečítá nejzřetelnější okraj. Nakloněním plotny směrem k sobě lze zjevný okraj lépe rozeznat.
 - b. V případě dvojité zóny se odečítá vnitřní okraj zóny.
 - c. Hemolýza a plazivý růst se přehlížejí.
5. Izolované kolonie uvnitř inhibiční zóny je nutno vzít do úvahy. **U klindamycinu je zvláště důležité pečlivě prozkoumat zóny, zda v nich nerostou kolonie.**
6. Obrázky s příklady odečítání jsou dostupné v [Reading Guide for disk diffusion of anaerobic bacteria on FAA-HB](#) (česky: [Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#)) –

Disková difuzní metodologie EUCAST - Anaerobní bakterie – disková difuzní metoda pro anaerobní bakterie).

Kontrola kvality

1. Kontrola kvality (QC) se provádí při každém vyšetření. Použije se kultura kontrolního kmene narostlá přes noc a stejný postup vyšetření jako u klinických izolátů.
 - a. K monitorování účinnosti testu se použije *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 a *Clostridium perfringens* ATCC 13124. Rozsah a cíle QC, viz [EUCAST QC Tables](#) (česky: [Klinické breakpointy - breakpointy a návody - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#) a [Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#) – Kontrola kvality EUCAST).
 - b. K monitorování anaerobního prostředí se použije *Clostridium perfringens* DSM 25589 a disk s 5 µg metronidazolu. Bylo prokázáno, že tato kombinace je citlivým indikátorem anaerobního prostředí. Nedostatečná anaerobióza může ovlivnit růst a výsledky měření citlivosti anaerobů. Interpretační kritéria, viz see [EUCAST QC Tables](#) (česky: [Klinické breakpointy - breakpointy a návody - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#) a [Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#) – Kontrola kvality EUCAST).
 - i. Zvláštní pozornost vyžaduje anaerobní prostředí pracovních stanic. Pravidelný servis a technická kontrola jsou nezbytné.

Odstranění problémů

1. Pro výsledky QC mimo rozsah existuje jeden nebo více důvodů. Pro zajištění spolehlivých výsledků je nutné přísně dodržovat protokol.
Pokyny pro řešení problémů:
 - a. Půda
 - i. Jsou plotny FAA-HB skladovány a sušeny podle výše uvedených pokynů?
 - ii. Je výška agarů $4,0 \pm 0,5$ mm? Cílová výška agarů je 4,0 mm, tudíž hodnoty $\pm 0,5$ mm je možné připustit jako náhodné, nikoli systematické odchylky.
 - iii. Jsou komerční plotny FAA-HB připraveny podle doporučení EUCAST s 5 % mechanicky defibrinované koňské krve jako jediným doplňkem?
 - b. Očkování ploten
 - i. Dbá se na to, aby inokulum bylo rovnoměrně a bez mezer rozetřeno po celém povrchu agarů.
 1. To je zvláště důležité u druhů rostoucích na FAA-HB v drobných koloniích, jako jsou *Cutibacterium acnes* a některé *Prevotella* spp.

- ii. U *Bacteroides* spp. a *Clostridium perfringens* je třeba odstranění přebytečné tekutiny otáčením tamponu proti vnitřní stěně zkumavky, aby nedošlo k naočkování přílišného množství inokula.
- c. Disky s antibiotiky
 - i. Počet disků na plotně je třeba omezit a umožnit tak neomezený růst a vytváření nepřekrývajících se zón. Pro většinu druhů a antibiotik se na kruhové plotně o průměru 90 mm použijí tři disky, ale u některých izolátů to mohou být pouze dva disky na plotnu.
 - ii. Před otevřením se kazety s disky ponechají při pokojové teplotě temperovat a zkontroluje se, zda byly dodrženy podmínky pro skladování disků.
- d. Inkubace
 - i. Anaerobní atmosféra se kontroluje pravidelně (bez ohledu na to, jak vznikla).
 1. Anaerobní atmosféra pracovních stanic vyžaduje pravidelný servis a technickou kontrolu. Atmosféru a teplotu může ovlivnit to, jak často se systém otevírá pro vkládání a vyndávání ploten, a také množství ploten v pracovní stanici.
 2. Při použití nádob pro anaerobní inkubaci je zapotřebí se ujistit, že nedochází k úniku plynu.
 - ii. Breakpointy EUCAST a QC kritéria pro diskovou difuzi anaerobů na FAA-HB jsou validovány pouze pro 16-20h inkubaci.
 1. Prodloužení inkubace není povoleno, neboť významně ovlivňuje velikost zón.
- e. Odečítání zón
 - i. Je třeba se ujistit, že byly dodrženy výše uvedené specifické pokyny pro odečítání anaerobů. Obrázky s příklady odečítání jsou dostupné na [Reading Guide for disk diffusion of anaerobic bacteria on FAA-HB](#) (česky: [Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#) – Disková difuzní metodologie EUCAST - Anaerobní bakterie – disková difuzní metoda pro anaerobní bakterie).