



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Disková difuzní metoda EUCAST pro vyšetřování citlivosti k antibiotikům

Verze 12.0

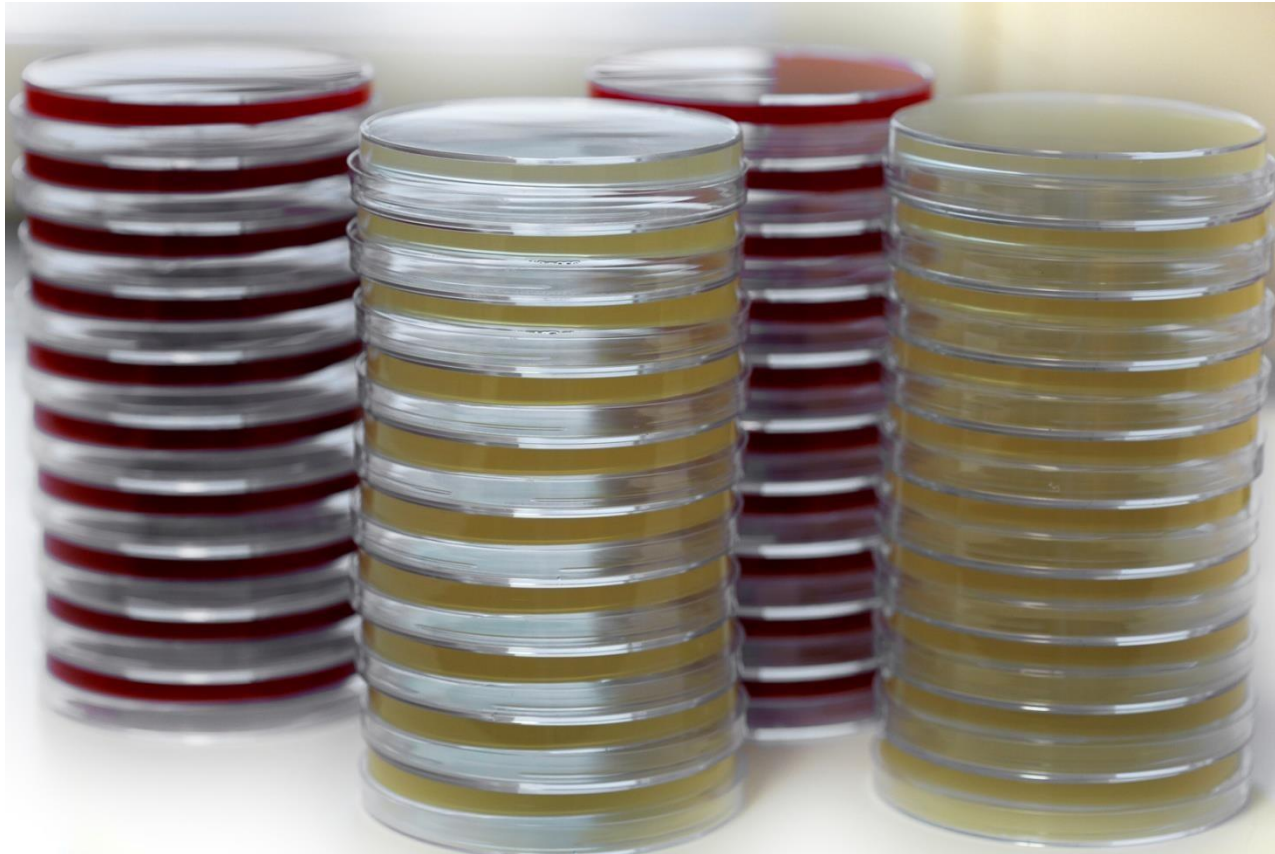
Leden 2024

Metoda diskové difuze pro anaerobní bakterie EUCAST je popsána v samostatném dokumentu
(https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology).

Změny proti předchozí verzi (v 11.0)

Strana	Změna
6	Přidána <i>Brucella melitensis</i>
13	Přidán přijatelný interval pro 0,5 McFarlanda Přidán přijatelný interval pro 1,0 McFarlanda
19	Přidán <i>Bacillus anthracis</i>
20	Přidán přijatelný interval pro inkubaci <i>Campylobacter</i>
20	Přidána <i>Brucella melitensis</i>
28	Přidány zvláštní pokyny pro odečet <i>Brucella melitensis</i> s trimetoprim-sulfametoxazolem a rifampicinem

Půdy pro vyšetření citlivosti



Půdy pro vyšetření citlivosti

- Pro nenáročné bakterie se používá neobohacený Mueller-Hinton (MH) agar.
- Pro náročné bakterie se používá obohacený MH s 5 % mechanicky defibrinované koňské krve a 20 mg/l β -NAD (MH-F, **M**ueller-**H**inton **F**astidious).
- Používá se β -NAD o čistotě ≥ 98 %.

Půdy pro nenáročné bakterie

Bakterie	Půda
<p><i>Enterobacterales</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Vibrio</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Burkholderia pseudomallei</i></p>	<p>Mueller-Hinton agar</p>

Půdy pro náročné bakterie

Bakterie	Půda
<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptokoky skupin A, B, C a G Skupina viridujících streptokoků <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Campylobacter jejuni</i> a <i>coli</i> <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Aerococcus sanguinicola</i> a <i>urinae</i> <i>Kingella kingae</i> <i>Brucella melitensis</i></p>	<p>Mueller-Hinton agar + 5 % mechanicky defibrinované koňské krve + 20 mg/l β-NAD (MH-F)</p>

Vlastní (in-house) příprava půd

- Při přípravě půd se postupuje podle pokynů výrobce.
- Při přípravě MH-F lze přidat krev nebo β -NAD, pouze je-li půda ochlazená na 42-45 °C a pečlivě promíchávána.
- Půda se do ploten vylévá na rovném povrchu do jednotné výšky $4,0 \pm 0,5$ mm. Pokud opakované měření prokáže výšku agarů pod nebo nad 4 mm, vylévaný objem se upraví.

Přibližný objem pro kulaté plotny o průměru 90 mm: 25 ml, 100 mm: 31 ml, 150 mm: 71 ml, pro čtvercové plotny o průměru 100 mm: 40 ml. Rozměry ploten různých výrobců se mohou lišit. Je zapotřebí ověřit, zda byl vypočítán správný objem podle skutečných rozměrů Petriho misek.

Kontrola kvality Mueller-Hinton agaru

Je třeba testovat každou novou šarži MH agaru, aby se zajistilo, že všechny zóny jsou v rozmezí kontroly kvality EUCAST.

Zvláštní problémy:

- Na vyšší nebo nižší obsah dvojmocných kationtů (Ca^{2+} , Mg^{2+}) v půdě ukazuje vytváření inhibičních zón kolem disků s aminoglykosidy pod, respektive nad limity kontroly kvality, u *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Na nadbytek tyminu a tymidinu v půdě ukazuje vytváření inhibičních zón kolem disků s trimetoprim-sulfametoxazolem pod limity kontroly kvality u *E. faecalis* ATCC 29212.

Sušení a skladování agarových ploten

- Plotny připravené in-house (vlastní přípravou):
 - uchovávají se při 4-8 °C.
 - podmínky pro sušení, skladování a dobu použitelnosti by měly být určeny na místě.
- Komerčně připravované plotny:
 - uchovávají se podle pokynů výrobce.
 - použijí se do data expirace.
- Před inokulací je nutno se ujistit, že agarové plotny mají pokojovou teplotu.

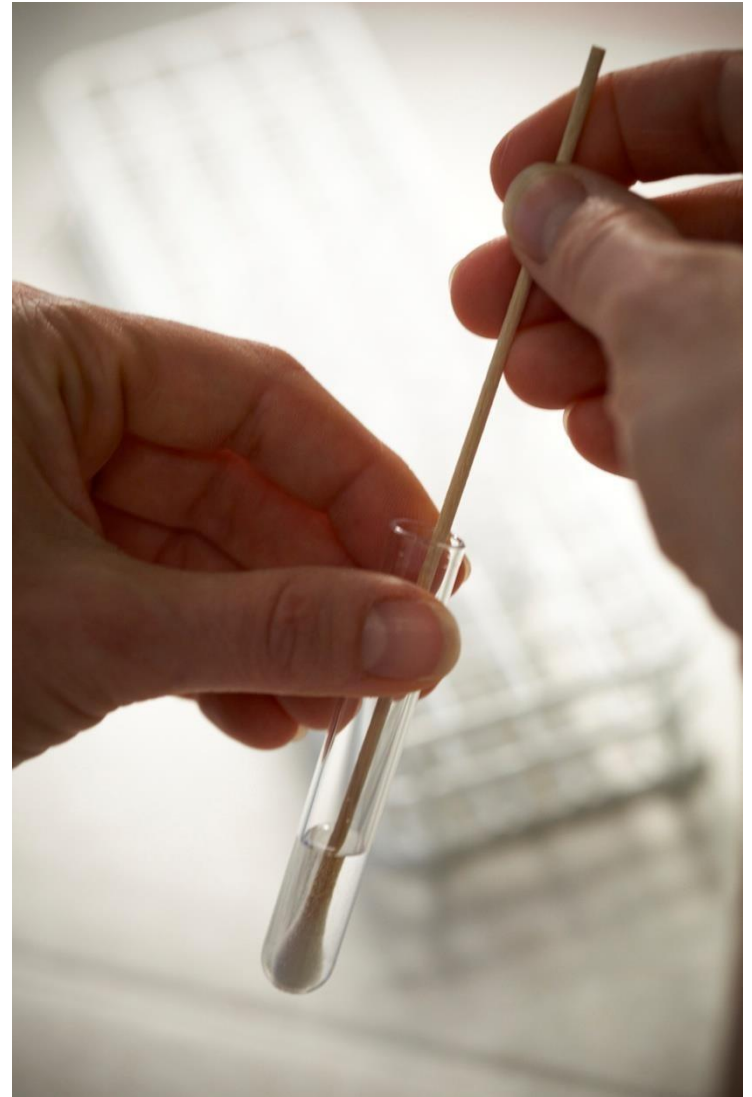
Sušení a skladování agarových ploten

- Povrch agaru musí být před použitím suchý. Přebytečná vlhkost může být příčinou neostrých okrajů zón a/nebo zamlžením uvnitř zón.
 - Na povrchu agaru nebo uvnitř víčka nesmí být žádné viditelné kapky vody. Ty se obvykle vyskytují u ploten skladovaných v plastických sáčkách nebo v uzavřených kontejnerech.
- Pokud je to nezbytné, suší se plotny přes noc při 20-25 °C, nebo s odkrytým víčkem při 35 °C po dobu 15 min.
- Plotny nesmí být přesušené.

Inokulum

- Metoda vyžaduje, aby zákal inokula odpovídal stupni 0,5 McFarlandova standardu*.

* Odpovídá přibližně
 $1-2 \times 10^8$ CFU/ml u *E. coli*.



Výběr dobře izolovaných kolonií vyrostlých přes noc na neselektivní půdě



Příprava inokula

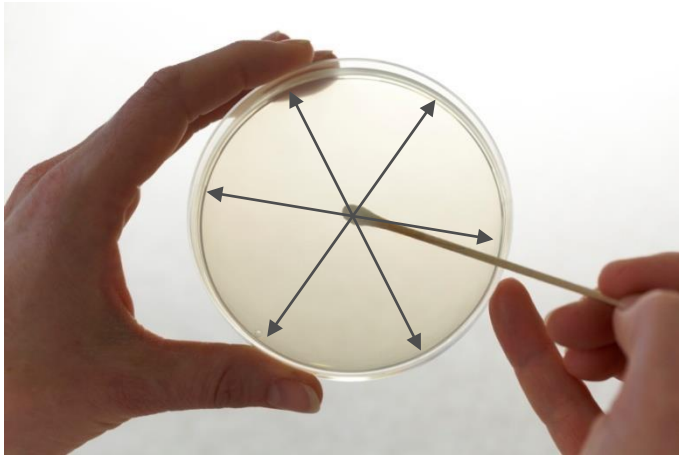
- Z kultury vyrostlé přes noc na neselektivní půdě se kolonie odebírají pomocí sterilní kličky nebo bavlněného tamponu. Odebírá se, pokud možno, několik morfologicky podobných kolonií k vyloučení atypických variant.
- Kolonie se suspendují ve fyziologickém roztoku do vytvoření rovnoměrného zákalu.
- Hustota suspenze bakterií se upraví na 0,5 (přijatelná odchylka 0,4-0,6) McFarlandova zákalového standardu přidáním fyziologického roztoku nebo většího množství bakterií. Zákal se nejlépe měří na fotometru.
 - Výjimka: *Streptococcus pneumoniae* z krevního agaru se suspenduje na hustotu 0,5 McFarlanda, z čokoládového agaru na hustotu 1,0 (přijatelná odchylka 0,9-1,1) McFarlanda.

Inokulace ploten

- Suspenze inokula se očkuje na plotny nejlépe do 15 minut od přípravy, a vždy nejpozději do 60 minut.
- Před inokulací je třeba se ujistit, že agarové plotny mají pokojovou teplotu.
- Sterilní bavlněný tampon se ponoří do suspenze.
- Přebytečné množství gramnegativních bakterií se odstraní otáčením přitlačeného tamponu po vnitřní stěně zkumavky.
- U grampozitivních bakterií se tampon nepřitlačuje a neotáčí po vnitřní stěně zkumavky.

Inokulace ploten

- Inokulum se roztírá tamponem rovnoměrně po celém povrchu plotny ve třech směrech nebo automatickým rotátorem.
- U grampozitivních bakterií se dbá zejména na to, aby nevznikly žádné mezery mezi očkovacími čárami.
- Očkuje-li se stejné inokulum na několik ploten, pak se tampon ponoří do suspenze vždy před očkováním na další plotnu.



Skladování disků s antibiotiky

- Disky se skladují podle pokynů výrobce.
 - Některá antibiotika jsou labilnější než jiná a mohou mít specifická doporučení.
- Skladovat aktuálně používané disky v uzavřených zásobnících s indikátorem vlhkosti a chránit je proti světlu.
- Před otevřením je nutno zásobník s disky umístit do pokojové teploty, aby nedocházelo ke kondenzaci.
 - Lépe je ponechat disky při pokojové teplotě během pracovního dne, než je opakovaně ukládat do ledničky.
- Disky nelze používat po uvedeném datu expirace.

Aplikace disků s antibiotiky

- Disky se aplikují do 15 minut od inokulace.
- Disky musí být pevně a celou plochou přitlačeny k povrchu agaru.
- Počet disků na plotně je nutno omezit, aby se předešlo překrývání inhibičních zón a interferenci mezi antibiotiky. Tím lze dosáhnout spolehlivého měření průměru zón.



Inkubace ploten

- Plotny se obrátí víčkem dolů a ujistí se, že disky nespadly s povrchu agaru.
- Plotny se dají inkubovat do 15 minut od aplikace disků.
- Uspořádání ploten v inkubátoru může ovlivnit výsledky kvůli jejich nerovnoměrnému zahřívání. Účinnost inkubátorů se liší, ale pro většinu inkubátorů je vhodné skládat plotny do sloupců maximálně po pěti.
- Plotny s MH se inkubují na vzduchu při 35 ± 1 °C.
- Plotny s MH-F se inkubují na vzduchu s 4-6 % CO₂ při 35 ± 1 °C (výjimka pro *Campylobacter*).

Inkubace ploten

Bakterie	Podmínky inkubace
<i>Enterobacterales</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Enterococcus</i> spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h (24 h pro glykopeptidy)
<i>Aeromonas</i> spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Vibrio</i> spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Bacillus</i> spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
<i>Bacillus anthracis</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 17 ± 1 h
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h

Inkubace ploten

Bakterie	Podmínky inkubace
Streptokoky skupin A, B, C a G	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h
Skupina viridujících streptokoků	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h
<i>Haemophilus influenzae</i>	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h
<i>Pasteurella multocida</i>	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h
<i>Campylobacter jejuni</i> a <i>coli</i>	41 ± 1 °C v mikroaerobním prostředí, 24 ± 1 h (40-48 h)
<i>Corynebacterium</i> spp.	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h (40-44 h)
<i>Aerococcus sanguinicola</i> a <i>urinae</i>	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h (40-44 h)
<i>Kingella kingae</i>	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 18±2 h (40-44 h)
<i>Brucella melitensis</i>	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO ₂ , 48 ± 2 h

Pravidlo 15-15-15 minut

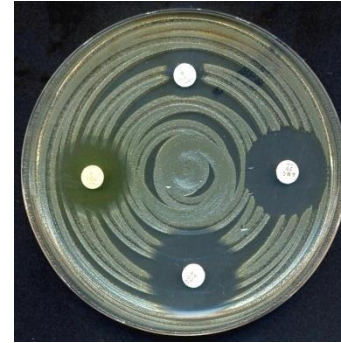
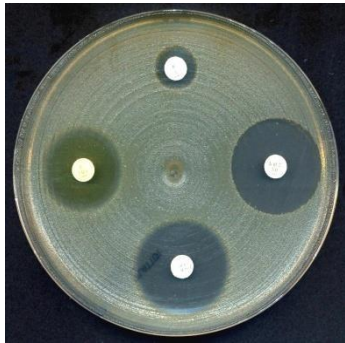
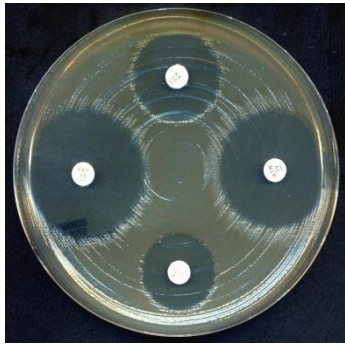
Pokyny pro diskovou difuzi:

- Inokulum se očkuje optimálně do **15 minut** od přípravy, nejpozději však vždy do 60 minut.
- Disky se kladou do **15 minut** po inokulaci ploten.
- Do **15 minut** od aplikace disků je třeba plotny začít inkubovat.

Prohlížení ploten po inkubaci

- Správné inokulum, dobře rozetřené na plotny, poskytuje splývavý nárůst.
- Rovnoměrně rozprostřený nárůst na agaru umožňuje vytvoření rovnoměrně kruhových (nevykousaných) inhibičních zón (viz následující slide).
- Málo koncentrované inokulum vytváří izolované kolonie a vyšetření je nutno opakovat.

Růst na plotně by měl být splývavý a rovnoměrný



Plotny by měly vypadat takto...

...a NIKOLI takto!

Odečítání zón

- Okraje zón se odečítají ve vzdálenosti 30 cm od oka, od bodu úplné inhibice viditelné pouhým okem.

Příklady:



E. coli
Ciprofloxacin



S. aureus
Erythromycin



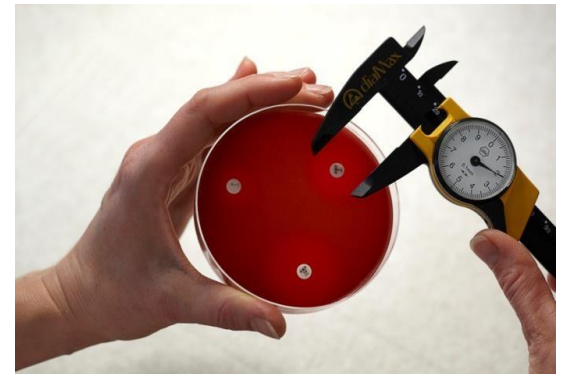
CoNS
Trimetoprim



S. pneumoniae
Rifampicin

Odečítání zón

- Plotny **MH** se odečítají ze spodní strany proti tmavému pozadí v odraženém světle.
- Plotny **MH-F** se odečítají po odstranění víčka z horní strany v odraženém světle.



Odečítání zón

- Plotny nelze odečítat v procházejícím světle (kdy je plotna umístěna proti světlu) nebo pomocí lupy, pokud není stanoveno jinak.
- Naklonění plotny do úhlu 45 °proti desce pracovního stolu usnadní odečítání nezřetelně ohraničených zón
- Průměry zón se měří na nejbližší milimetr pravítkem nebo posuvným měřítkem. Pokud se používá automatický odečítač zón, musí být kalibrován podle manuálního odečítání.
- Vyskytnou-li se dvojité zóny, nebo odlišné kolonie uvnitř zón, kontroluje se čistota kultury a test se případně opakuje. Pokud je kultura čistá, pak se kolonie uvnitř inhibiční zóny při měření berou do úvahy.

Odečítání zón – výjimky (1)

Bakterie	Antibiotikum	Odečítání inhibičních zón
<i>Enterobacterales</i>	Ampicilin Ampicilin-sulbaktam Amoxicilin-klavulanová kys.	Přehlíží se jemný růst uvnitř zóny vyskytující se u některých šarží MH agaru.
<i>Enterobacterales</i>	Temocilin	Přehlíží se izolované kolonie uvnitř inhibiční zóny.
<i>Enterobacterales</i>	Mecilinam	Přehlíží se izolované kolonie uvnitř inhibiční zóny.
<i>E. coli</i>	Fosfomycin	Přehlíží se izolované kolonie uvnitř inhibiční zóny a odečítá se vnější okraj zóny.
<i>Proteus spp.</i>	Jakékoli	Přehlíží se plazivý růst.
<i>S. maltophilia</i> , <i>A. xylosoxidans</i> <i>B. pseudomallei</i>	Trimetoprim-sulfametoxazol	Přehlíží se i výrazný růst uvnitř inhibiční zóny, pokud jsou vytvořeny zřetelné okraje zón.
<i>S. aureus</i>	Benzylnicilin	Okraje zóny se prohlíží z přední strany plotny v procházejícím světle (plotna se drží proti světlu).

Odečítání zón – výjimky (2)

Bakterie	Antibiotikum	Odečítání inhibičních zón
Stafylokoky	Cefoxitin	Zóny se pečlivě zkoumají, aby byly nalezeny kolonie v inhibiční zóně.
<i>Enterococcus</i> spp.	Vankomycin	Okraje zóny se prohlíží z přední strany plotny v procházejícím světle (plotna se drží proti světlu).
<i>Streptococcus</i> spp.	Jakékoli	Odečítá se zóna inhibice růstu, nikoli inhibice hemolýzy.
<i>H. influenzae</i>	Beta-laktamy	Pokud kolem disku je oblast růstu v jinak jasné inhibiční zóně, odečítá se od vnějšího okraje zóny.
<i>Aeromonas</i> spp. <i>Brucella melitensis</i>	Trimetoprim-sulfametoxazol	Přehlíží se jemné zastření zóny nebo růst v zóně, a odečítá se od zřetelného okraje.
Jakékoli	Trimetoprim Trimetoprim-sulfametoxazol	Přehlíží se zastřený růst až k disku a zóna se měří od zřetelného okraje.
<i>Brucella melitensis</i>	Rifampicin	Zóny se pečlivě zkoumají, zda se v nich nevyskytují kolonie blízko okraje zóny. Při odečítání je třeba brát takové kolonie v úvahu.

Interpretace zón

- Před interpretací výsledků se ověří, zda průměry inhibičních zón vytvořené kontrolními kmeny jsou v přípustném rozmezí.
- Průměry zón se interpretují do kategorií citlivosti (C, I a R) podle poslední verze tabulek breakpointů EUCAST (www.eucast.org, česky: [Klinické breakpointy - breakpointy a návody - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#)). K odečítání lze používat také šablony s breakpointy EUCAST.

Kontrola vyšetření citlivosti

- Používají se doporučené rutinní kmeny pro kontrolu kvality (viz [EUCAST QC Tables](#), česky: [Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#) – Kontrola kvality EUCAST).
- Pro kontrolu inhibiční složky v discích obsahujících kombinaci β -laktamů s inhibitory se doporučuje používat specifické kmeny produkující β -laktamázu. Tato kontrola se provádí rutinně. Aktivní složka se kontroluje pomocí citlivého KK kmene.
- K potvrzení schopnosti detekovat rezistenci lze použít KK kmeny s definovanými mechanismy rezistence (Rozšířená kontrola kvality, viz [EUCAST QC Tables](#), česky: [Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze \(szu.cz\)](#) – Kontrola kvality EUCAST).
- Kontrolní kmeny lze koupit ze sbírek kultur nebo z komerčních zdrojů.

Kmeny pro rutinní kontrolu kvality EUCAST

Bakterie	Číslo sbírky kultur	Vlastnosti
<i>E. coli</i>	ATCC 25922; NCTC 12241; CIP 76.24 DSM 1103; CCUG 17620; CECT 434; CNCTC 5276	Citlivý, divoký typ
<i>E. coli</i>	ATCC 35218; NCTC 11954; CIP 102181 DSM 5923; CCUG 30600; CECT 943; CNCTC 5321	Producent TEM-1 β-laktamázy
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603; NCTC 13368 CCUG 45421; CECT 7787; CNCTC 7439	Producent ESBL (SHV-18)
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC BAA-2814	Producent KPC-3, SHV-11 a TEM-1
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853; NCTC 12903; CIP 76.110 DSM 1117; CCUG 17619; CECT 108; CNCTC 5482	Citlivý, divoký typ
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213; NCTC 12973; CIP 103429 DSM 2569; CCUG 15915; CECT 794; CNCTC 5480	Slabý producent β-laktamázy
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212; NCTC 12697; CIP 103214 DSM 2570; CCUG 9997; CECT 795; CNCTC 5483	Citlivý, divoký typ

Kmeny pro rutinní kontrolu kvality EUCAST

Bakterie	Číslo sbírky kultur	Vlastnosti
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 49619; NCTC 12977 CIP 104340; DSM 11967 CCUG 33638; CNCTC 5043	Snížená citlivost k benzylpenicilinu
<i>H. 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 70.2T; DSM 4688 CCUG 11284; CNCTC 7365	Citlivý, divoký typ

Kmeny pro detekci specifických mechanismů rezistence EUCAST (rozšířená kontrola kvality)

Druh	Číslo sbírky kultur	Vlastnosti
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603; NCTC 13368 CCUG 45421; CECT 7787; CNCTC 7439	Producent ESBL (SHV-18)
<i>S. aureus</i>	NCTC 12493; CCUG 67181	<i>mecA</i> pozitivní, meticilin rezistentní (MRSA)
<i>E. faecalis</i>	ATCC 51299; NCTC 13379 CIP 104676; DSM 12956 CCUG 34289; CNCTC 5530	Aminoglykosid-modifikující enzym (High-level aminoglycoside resistant, HLAR) a vankomycin rezistentní (<i>vanB</i> pozitivní)
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247; NCTC 12699 CIP 104604; DSM 9999 CCUG 26214; CNCTC 5063	Snížená citlivost k β -laktamům způsobená mutacemi PBP

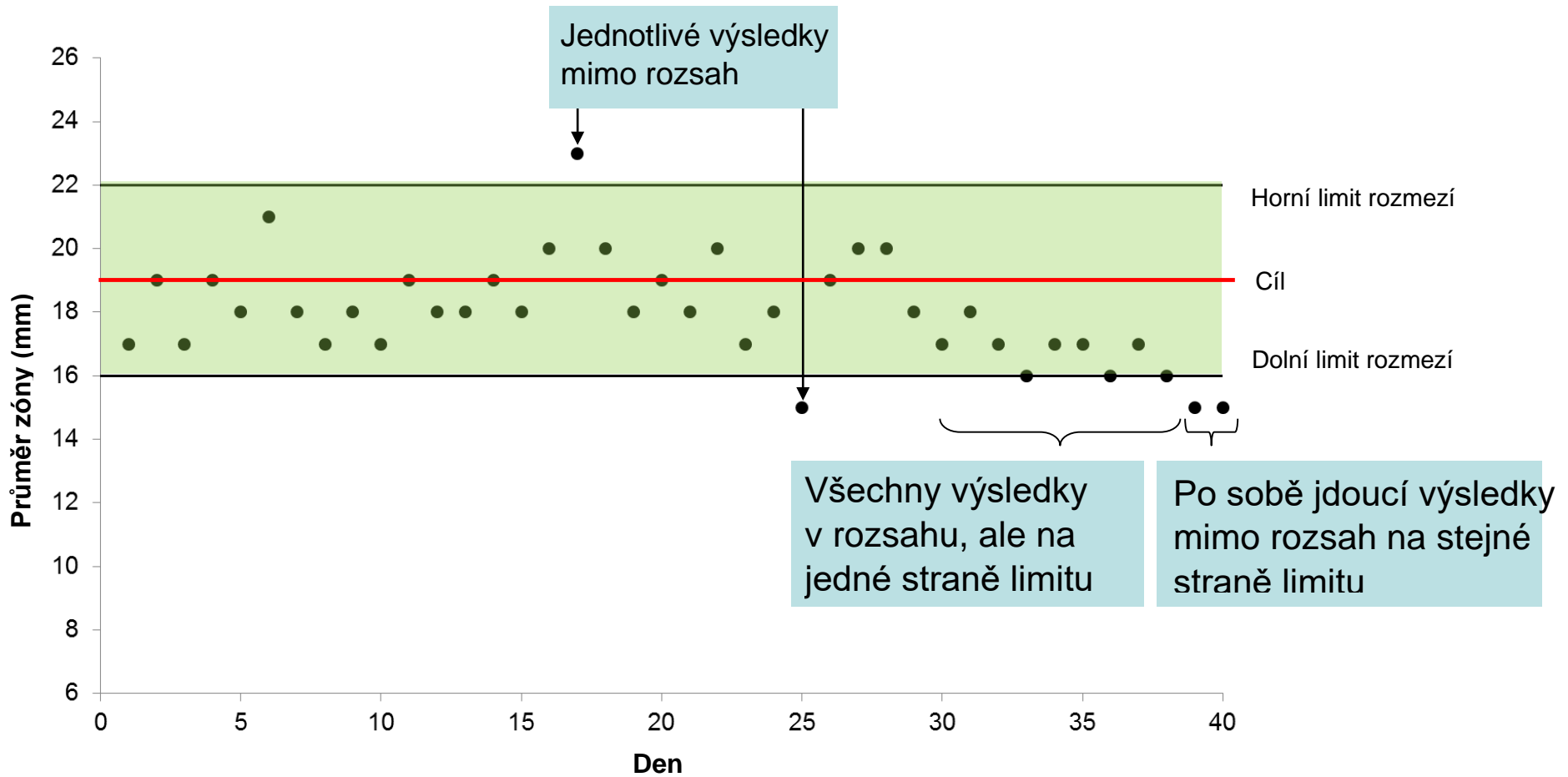
Sbírky kultur

- ATCC American Type Culture Collection, USA <http://www.atcc.org>
- NCTC National Collection of Type Cultures, Public Health England, UK
<https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc>
- CIP Collection de l'Institut Pasteur, France
<https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collection-institut-pasteur-cip>
- DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
<https://www.dsmz.de>
- CCUG Culture Collection University of Gothenburg, Sweden <http://www.ccug.se>
- CECT Colección Española de Cultivos Tipo, Spain <http://www.cect.org>
- CNCTC Česká národní sbírka typových kultur, Česká republika
[CNCTC - Česká národní sbírka typových kultur \(szu.cz\)](http://szu.cz)

Rutinní provádění kontroly kvality pro obecné posouzení kvality

- Kontrolní testy s antibiotiky, která jsou v rutinní sestavě, by měly být prováděny a vyhodnocovány denně, nejméně však čtyřikrát týdně.
- Kontrolní testy by měly být odečítány a vyhodnoceny vždy před hlášením výsledků klinických izolátů.
- Každý den, kdy se provádí vyšetření, se prohlédnou výsledky posledních 20 po sobě jdoucích testů.
- Prozkoumají se výsledky trendů a zón, které opakovaně spadají nad nebo pod přípustné rozmezí.
- Pokud jsou mimo přípustné rozmezí dva nebo více z 20 testů, je zapotřebí vyšetřit příčinu.

Monitoring provádění testů



Postup výsledcích KK kmenů mimo limit

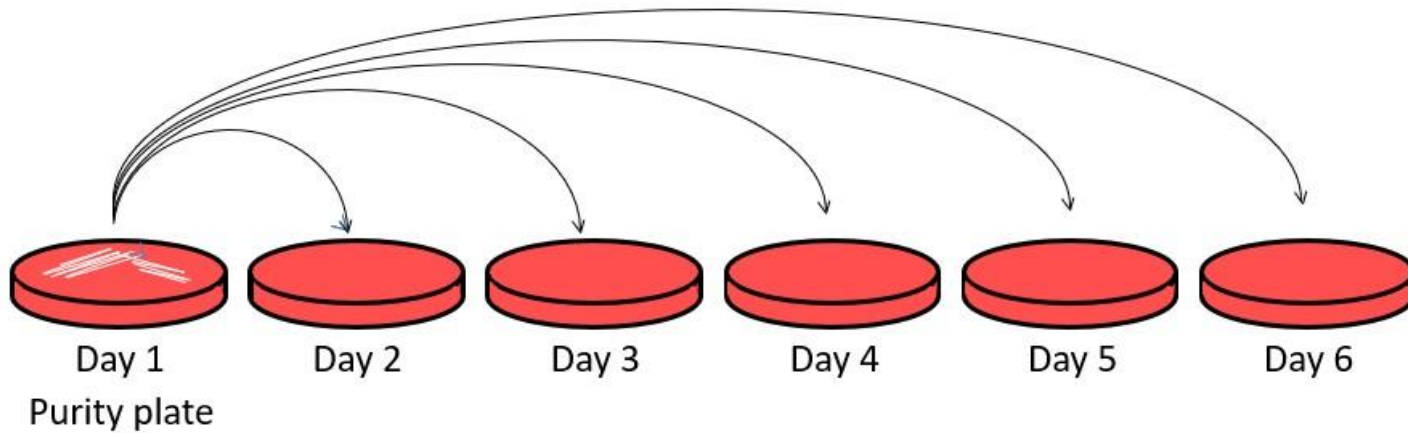
- Pokud jsou hodnoty dvou nekonektivních průměrů zón z 20 testů mimo přípustné rozmezí, lze sice výsledky vyšetření citlivosti hlásit, je však třeba vyřešit příčinu.
- Pokud jsou hodnoty dvou konsekutivních průměrů zón z 20 testů mimo přípustné rozmezí, je zapotřebí vyšetřit příčinu před hlášením výsledků vyšetření citlivosti. Vyšetření citlivosti je zapotřebí opakovat.
- Pokud je ve stejném dni více disků (>2) mimo rozmezí, je zapotřebí vyšetřit příčinu před hlášením výsledků vyšetření citlivosti. Vyšetření citlivosti je zapotřebí opakovat.
- Pokud není prokázána rezistence u KK kmene pro rezistenci, pozastaví se hlášení výsledků, vyšetří se příčina a vyšetření se opakuje.

Uchování a subkultivace kontrolních kmenů

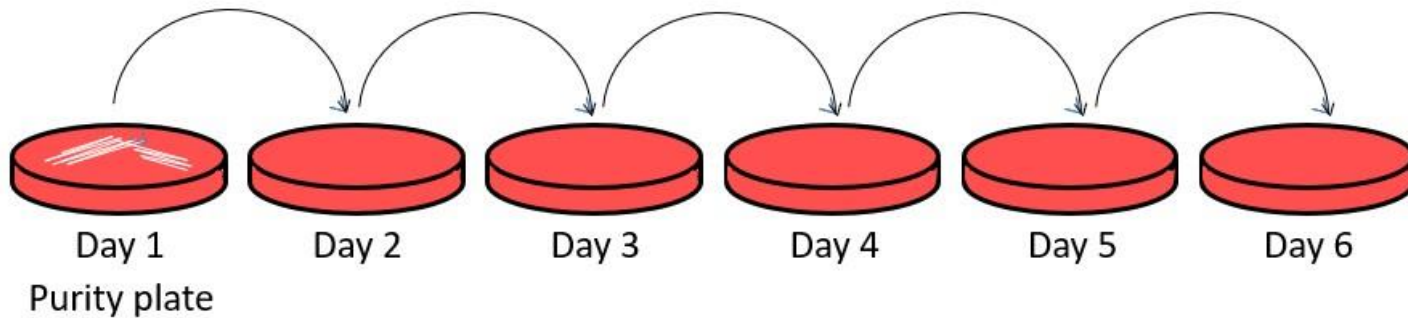
- Kmeny se uchovávají při -70 °C na korálcích v glycerolovém bujónu (nebo komerčním ekvivalentu). Uchovávají se dvě lahvičky, jedna „pro použití“ a jedna jako „archiv“.
- Z lahvičky „pro použití“ se každý týden vyočkují kmeny na vhodné neselektivní půdy a zkontroluje se jejich čistota.
- Každý den v týdnu se vyočkují kolonie z plotny s neselektivní půdou. Odebírá se několik kolonií pro prevenci selekce mutanta. Náročné bakterie by se měly vyočkovávat každodenně.
- Kmeny pro kontrolu kvality mohou být vyočkovávány nejvíce po 6 dnů. Pak se plotna vyřadí a připraví se nová kultura vyočkováním ze zmražené lahvičky „pro použití“.
- Po spotřebování lahvičky „pro použití“ se vyočkuje lahvička „archiv“ a ze subkultury se připraví další lahvička „pro použití“.

Subkultivace KK kmenů

Nenáročný KK kmeny



Náročný KK kmeny



Možné příčiny chyb (1)

Půda	Uchovávání ploten
	Nedodržení postupu při přípravě
	Variabilita šarží nebo změna dodavatele
	Suplementy (variabilita šarží, chybná navážka nebo prošlá expirace)
	pH
	Výška agaru/objem agaru
	Datum expirace
Podmínky vyšetření	Nedodržení pravidla „15-15-15“ (suspenze musí být naočkována do 15 min, disky kladeny do 15 min, inkubace do 15 min)
	Inkubace (teplota, prostředí a čas)
	Nesprávné inokulum (málo/hodně koncentrované nebo nehomogenní)
	Podmínky odečítání (pozadí, světlo)
	Odečítání okrajů zón

Možné příčiny chyb (2)

Disky	Nesprávný disk (chybné antibiotikum nebo obsah disku)
	Účinnost disku (nesprávné uchování, labilita, datum expirace)
	Disky nemají při otevření nádoby pokojovou teplotu
	Příliš mnoho disků na plotně (interference mezi antibiotiky)
Kontrolní kmeny	Nesprávný kontrolní kmen
	Mutace
	Kontaminace
	Stáří kultury

Webová stránka EUCAST

- Webovou stránku EUCAST je nutno navštěvovat pravidelně vzhledem k aktualizacím metodologie, rozmezím kontrolních kmenů a brekapointům.

www.eucast.org

- Jakékoli komentáře a návrhy lze posílat na adresu erika.matuschek@escmid.org nebo na sekretariát EUCAST (viz webová stránka).



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases