EUCAST EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Vyšetření citlivosti k antibiotikům

EUCAST disková difuzní metoda

Verze 12.0

Leden 2024

Obsah

		Strana
	Změny od přechozí verze	
	Zkratky a terminologie	
1	Úvod	5
2	Příprava a skladování půd	6
3	Příprava inokula	8
4	Inokulace agarových ploten	10
5	Aplikace disků s antibiotiky	11
6	Inkubace ploten	12
7	Prohlížení ploten po inkubaci	14
8	Měření zón a interpretace citlivosti	16
9	Kontrola kvality	17
	Příloha A	21

Změny proti předchozí verzi (v. 11.0)

Sekce	Změna
Zkratky a terminologie	Přidaná definice jednodenní kultury
Tabulka 1	Přidána *Brucella melitensis*
3.3	Přidán přijatelný interval pro 0,5 McFarlanda
3.3.3	Přidán přijatelný interval pro 1,0 McFarlanda
Tabulka 3	Přidány *Bacillus anthracis* a *Brucella melitensis*
8.9.2	Přidány zvláštní pokyny pro odečet *Brucella melitensis* s trimethoprim-sulfamethoxazolem
8.9.13	Přidány zvláštní pokyny pro odečet *Brucella melitensis* s rifampicinem
Příloha A Tabulka A1	Přidán přijatelný interval pro inkubaci *Campylobacter*

Zkratky a terminologie

ATCC	American Type Culture Collection http://www.atcc.org
CCUG	Culture Collection University of Gothenburg http://www.ccug.se
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo http://www.cect.org
CFU	Colony Forming Unit
CIP	Collection de l`Institut Pasteur https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collectioninstitut-pasteur-cip
DSM	Bacterial cultures from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) https://www.dsmz.de
ESBL	širokospektrá β-laktamáza
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing http://www.eucast.org
MH	Mueller-Hinton agar
MH-F	Mueller-Hinton agar pro náročné bakterie (MH obohacený 5 % defibrinované koňské krve a 20 mg/l β-NAD)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (s geny *mecA* nebo *mecC*)
NCTC	National Collection of Type Cultures https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc
ß-NAD	ß-nikotinamid adenin dinukleotid
QC (KK)	kontrola kvality
Fyziologický roztok	roztok 0,85 % NaCl ve vodě (8,5 g/l)
Jednodenní kultura	bakteriální kultura inkubovaná po dobu 16-24 h

1 Úvod

Disková difuze je jedním z nejstarších způsobů vyšetřování antimikrobiální citlivosti a zůstává jednou z nejpoužívanějších metod testování citlivosti v rutinních klinických laboratořích. Je vhodná pro testování většiny bakteriálních patogenů včetně těch náročnějších, je univerzální, pokud jde o rozsah antimikrobiálních látek, které lze testovat, a nevyžaduje žádné speciální vybavení.

Metoda EUCAST, podobně jako další diskové metody, je standardizovaná metoda založená na principech definovaných ve zprávě International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing z roku 1971[1], a ověřovaná zkušenostmi mezinárodní skupiny expertů.

Breakpointy průměrů inhibičních zón v metodě diskové difuze EUCAST jsou kalibrovány podle harmonizovaných evropských breakpointů MIC, které EUCAST bezplatně zveřejňuje na svých webových stránkách (http://www.eucast.org).

Stejně jako u všech standardizovaných metod musí být popsaný postup dodržen bez jakékoli modifikace, aby bylo možné získat spolehlivé výsledky.

Metodika EUCAST pro diskovou difuzi anaerobních bakterií je popsána v samostatném dokumentu (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology).

[1] H M Ericsson and J C Sherris. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 1971;217:Suppl 217:1+.

2 Příprava a skladování půd

2.1 Mueller-Hinton (MH) agar se připraví podle pokynů výrobce, a pro náročné bakterie se obohatí podle **Tabulky1**. Příprava a přidání suplementů je podrobně popsáno na http://www.eucast.org (česky: Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze (szu.cz) – Příprava půd EUCAST).

2.2 Výška půdy by měla být 4,0 ± 0,5 mm (přibližně 25 ml na kulatou plotnu o průměru 90 mm, 31 ml na kulatou plotnu o průměru 100 mm, 71 ml na kulatou plotnu o průměru 150 mm, 40 ml na čtvercovou plotnu o průměru 100 mm). Je zapotřebí ověřit, zda byl vypočítán správný objem podle skutečných rozměrů Petriho misek. Rozměry ploten různých výrobců se mohou lišit.

2.3 Povrch agaru by měl být před použitím suchý. Na povrchu agaru nebo uvnitř víčka by neměly být viditelné žádné kapky vody. Pokud je to nezbytné, suší se plotny přes noc při 20-25 °C, nebo s odkrytým víčkem při 35 °C 15 minut. Plotny nepřesušte.

2.4 Vlastní (in-house) připravené plotny skladujte při 4-8 °C.

2.5 Při vlastní (in-house) přípravě ploten by měly být v rámci programu zajištění kvality laboratoře stanoveny podmínky pro jejich sušení, skladování a doba použitelnosti.

2.6 Komerčně připravené plotny by měly být skladovány podle doporučení výrobce a měly by být použity do data expirace uvedeného na etiketě.

2.7 Agarové plotny (komerčně nebo vlastně (in-house) připravené), skladované v plastových sáčcích nebo uzavřených nádobách, může být nutné před použitím usušit (viz oddíl 2.3). To proto, aby se zabránilo nadměrné vlhkosti, která může být příčinou neostrých okrajů zón a/nebo zamlžením uvnitř zón.

Tabulka 1	**Půdy pro vyšetření antimikrobiální citlivosti**
Bakterie	**Půda**
Enterobacterales	MH agar
Pseudomonas spp.	MH agar
Stenotrophomonas maltophilia	MH agar
Acinetobacter spp.	MH agar
Staphylococcus spp.	MH agar
Enterococcus spp.	MH agar
Streptokoky skupin A, B, C a G	MH-F agar[1]
Streptococcus pneumoniae	MH-F agar[1]
Skupina viridujících streptokoků	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 a *coli*	MH-F agar[1] (viz Příloha A)
Corynebacterium spp.	MH-F agar[1]
Aerococcus sanguinicola a *urinae*	MH-F agar[1]
Kingella kingae	MH 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 % mechanicky defibrinované koňské krve + 20 mg/l β-NAD

3 Příprava inokula

3.1 Metodou přímé suspenze kolonií se vytvoří suspenze bakterie ve fyziologickém roztoku (kolonie bakterií se rozetřou přímo ve fyz. roztoku) o hustotě 0,5 McFarlandova zákalového standardu (**Tabulka 2**), tj. přibližně 1-2 x 10^8 CFU/ml pro *Escherichia coli*.

Metoda přímé suspenze kolonií je vhodná pro všechny bakterie, včetně náročných bakterií, uvedených v **Tabulce 1**.

3.2 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.

3.3 Hustota suspenze bakterií se upraví na 0,5 (přijatelná odchylka 0,4-0,6) McFarlandova zákalového standardu přidáním fyziologického roztoku nebo většího množství bakterií. Hustší inokulum vytváří menší inhibiční zóny, řídké inokulum má opačný účinek.

3.3.1 K úpravě hustoty (zákalu) suspenze se doporučuje použít fotometr. Fotometr musí být kalibrován podle pokynů výrobce na stupeň 0,5 McFarlandova zákalového standardu.

3.3.2 Alternativně lze hustotu inokula vizuálně porovnat se stupněm 0,5 McFarlandova zákalového standardu. K usnadnění lze použít bílý papír s vyznačenými černými linkami, na jehož pozadí se porovnává zákal inokula a standardu.

3.3.3 U *Streptococcus pneumoniae* se upřednostňuje příprava inokula z kultury narostlé na krevním agaru na hustotu 0,5 McFarlandova standardu. Pokud se připravuje inokulum *Streptococcus pneumoniae* z čokoládového agaru, musí inokulum odpovídat hustotě 1,0 (přijatelná odchylka 0,9-1,1) McFarlandova standardu.

3.4 Suspenze inokula se očkuje na plotny nejlépe do 15 minut[1] od přípravy, a vždy nejpozději do 60 minut.

[1] Součást pravidla 15-15-15 minut: Suspenze inokula se očkuje do 15 minut od přípravy, disky se aplikují do 15 minut od inokulace ploten a plotny se inkubují do 15 minut od aplikace disků.

Tabulka 2	Příprava 0,5 McFarlandova zákalového standardu
1	K 99,5 ml 0,18 mol/l (0,36 N) H_2SO_4 (1% v/v) se přidá 0,5 ml 0,048 mol/l $BaCl_2$ (1,175% w/v $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) a směs se promíchá.
2	Zákal suspenze se změří na spektrofotometru v kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Absorbance při 625 nm by měla být v rozmezí od 0,08 do 0,13.
3	Suspenze se rozplní do stejných zkumavek (stejná velkost) jako pro přípravu inokula. Zkumavky se uzavřou.
4	Uzavřené zkumavky se standardem se skladují při pokojové teplotě v temnu.
5	Bezprostředně před použitím se standard důkladně promíchá na vortexu.
6	Po 6 měsících skladování se standard připraví znovu, nebo se zkontroluje absorbance.

4 Inokulace agarových ploten

4.1 Před inokulací je zapotřebí se ujistit, že agarové plotny mají pokojovou teplotu.

4.2 Suspenze inokula se očkuje na plotny nejlépe do 15 minut[1] od přípravy, a vždy nejpozději do 60 minut.

4.3 Sterilní bavlněný tampon se ponoří do suspenze.

4.3.1 Přebytečné množství suspenze gramnegativních bakterií se odstraní otáčením přitlačeného tamponu po vnitřní stěně zkumavky.

4.3.2 U grampozitivních bakterií se tampon nepřitlačuje a neotáčí po vnitřní stěně zkumavky.

4.4 Očkuje-li se stejné inokulum na několik ploten, opakuje se u každé plotny postup popsaný v sekci 4.3.

4.5 Plotny se očkují tamponem ve třech směrech nebo automatickým rotátorem. Inokulum musí být rozetřeno rovnoměrně po celém povrchu tak, aby nevznikly žádné mezery mezi očkovacími čárami.

4.5.1 U grampozitivních bakterií se dbá zejména na to, aby nevznikly žádné mezery mezi očkovacími čárami.

4.6 Disky se aplikují do 15 minut[1] po inokulaci.
Pokud jsou inokulované plotny ponechány při pokojové teplotě před aplikací disku delší dobu, bakterie mohou zahájit růst a výsledkem jsou chybné inhibiční zóny o menším průměru.

[1] Součást pravidla 15-15-15 minut: Suspenze inokula se očkuje do 15 minut od přípravy, disky se aplikují do 15 minut od inokulace ploten a plotny se inkubují do 15 minut od aplikace disků.

5 Aplikace disků s antibiotiky

5.1 Požadované obsahy disků jsou v tabulkách Breakpoint and Quality Control Tabels na http://www.eucast.org (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).

5.1.1 Breakpointy průměru inhibičních zón EUCAST a kontrola kvality disků jsou validovány pro 6 mm papírové disky.

5.2 Disky je nutno před otevřením zásobníků nebo nádobek, v nichž jsou uchovávány, temperovat při pokojové teplotě. Toto opatření brání kondenzaci, jejímž důsledkem je rychlé znehodnocení některých antibiotik.

5.3 Disky se aplikují pevně na povrch inokulované agarové plotny do 15 minut od inokulace ploten[1]. Celá plocha disku musí být v těsném a rovnoměrném kontaktu s povrchem agaru a po aplikaci se disk nesmí přesunovat, neboť difuze antibiotika z disku je velmi rychlá.

5.4 Počet disků na plotně je nutno omezit, aby se předešlo překrývání inhibičních zón a interferenci mezi antibiotiky. Tím lze dosáhnout spolehlivého měření průměru zón. Maximální počet disků na plotně závisí na vyšetřovaném druhu bakterie a na výběru disků. Nejvyšší počet disků je obvykle 6 na 90 mm a 12 na 150 mm kruhové plotně.

5.4.1 Pro detekci indukované rezistence ke klindamycinu u stafylokoků a streptokoků se disky s erytromycinem a klindamycinem umístí ve vzdálenosti 12-20 mm od okrajů disků pro stafylokoky a 12-16 mm od okraje disků pro streptokoky.

5.5 Obvyklým zdrojem chyb je ztráta aktivity antibiotik v discích, která se projeví zmenšením inhibiční zóny. Je nezbytné postupovat takto.

5.5.1 Skladovat disky, včetně těch v dispenzorech, v uzavřených zásobnících s indikátorem vlhkosti a chránit je proti světlu (některé z antibiotik, jako metronidazol, chloramfenikol a fluorochinolony inaktivuje delší expozice světlu).

5.5.2 Skladovat zásobní disky podle pokynů výrobce. Pro některá labilnější antibiotika (např. amoxicilin-klavulanová kyselina, cefaklor a karbapenemy) výrobci uvádějí specifická doporučení.

5.5.3 Dodávky disků je nutno skladovat podle pokynů výrobce. Disky z jednou otevřeného zásobníku by měly být používány do časového limitu uvedeného výrobcem.

5.5.4 Po datu expirace uvedené výrobcem na obalu je nutno disky vyhodit.

5.5.5 Provádět časté kontroly kvality (viz sekce 9) používaných disků k ověření, zda disky s antibiotiky neztratily během skladování účinnost.

[1] Součást pravidla 15-15-15 minut: Suspenze inokula se očkuje do 15 minut od přípravy, disky se aplikují do 15 minut od inokulace ploten a plotny se inkubují do 15 minut od aplikace disků.

6 Inkubace ploten

6.1 K ujištění, že disky nespadnou z povrchu agaru, se plotny obrátí víčkem dolů. Plotny se dají inkubovat do 15 minut[1] od aplikace disků. Pokud jsou plotny po aplikaci disků ponechány při pokojové teplotě, vytvářejí se nežádoucí velké inhibiční zóny v důsledku predifuze.

6.2 Stohování ploten (ve sloupcích) v inkubátoru může ovlivnit výsledky příčinou nerovnoměrné teploty ploten. Účinnost inkubátorů je odlišná a proto je zapotřebí v rámci programu laboratorní kontroly kvality kontrolovat podmínky inkubace, včetně přiměřeného počtu ploten ve sloupcích. Pro většinu inkubátorů je vhodné ukládat plotny ve sloupcích maximálně po pěti.

6.3 Plotny je třeba inkubovat podle podmínek uvedených v **Tabulce 3**.

6.3.1 Inkubace po uplynutí doporučené doby by neměla být prováděna, protože to může vést k růstu v inhibičních zónách a k hlášení izolátů jako falešně pozitivních.

6.3.2 Při vyšetřování citlivosti glykopeptidů jsou u některých kmenů *Enterococcus* spp. rezistentní kolonie viditelné až po inkubaci trvající plných 24 h. Po 16-20 h sice lze plotny odečíst a hlásit případnou rezistenci, ale izoláty, které se po této době jeví jako citlivé, musí být reinkubovány a znovu odečteny za 24 h.

[1] Součást pravidla 15-15-15 minut: Suspenze inokula se očkuje do 15 minut od přípravy, disky se aplikují do 15 minut od inokulace ploten a plotny se inkubují do 15 minut od aplikace disků.

Tabulka 3	**Podmínky inkubace ploten pro vyšetřování antimikrobiální citlivosti**
Bakterie	**Podmínky inkubace**
Enterobacterales	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Pseudomonas spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Stenotrophomonas maltophilia	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Acinetobacter spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Staphylococcus spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Enterococcus spp.	35 ± 1°C na vzduchu, 18 ± 2 h (24 h pro glykopeptidy)
Aeromonas spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Achromobacter xylosoxidans	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Vibrio spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Bacillus spp.	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Burkholderia pseudomallei	35 ± 1 °C na vzduchu, 18 ± 2 h
Bacillus anthracis	35 ± 1 °C na vzduchu, **17 ± 1 h**
Streptokoky skupin A, B, C a G	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, 18 ± 2 h
Streptococcus pneumoniae	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
Haemophilus influenzae	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, 18 ± 2 h
Moraxella catarrhalis	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, 18 ± 2 h
Listeria monocytogenes	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, 18 ± 2 h
Pasteurella multocida	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, 18 ± 2 h
Brucella melitensis	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, **48 ± 2 h**
Campylobacter jejuni a *coli*	Viz **Příloha A**
Corynebacterium spp.	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, 18 ± 2 h. Izoláty s nedostatečným růstem po 16-20 h jsou ihned reinkubovány a inhibiční zóny se odečítají po celkové době inkubace 40-44 h.
Aerococcus sanguinicola a *urinae*	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, 18 ± 2 h. Izoláty s nedostatečným růstem po 16-20 h jsou ihned reinkubovány a inhibiční zóny se odečítají po celkové době inkubace 40-44 h.
Kingella kingae	35 ± 1 °C na vzduchu s 4-6 % CO_2, 18 ± 2 h. Izoláty s nedostatečným růstem po 16-20 h jsou ihned reinkubovány a inhibiční zóny se odečítají po celkové době inkubace 40-44 h.

7	Prohlížení ploten po inkubaci
7.1	Správné inokulum, dobře rozetřené na plotny, poskytuje splývavý nárůst.
7.1.1	Málo koncentrované inokulum vytváří izolované kolonie a vyšetření je nutno opakovat.
7.2	Nárůst by měl být rovnoměrně rozprostřený na agaru, aby inhibiční zóny byly rovnoměrně kruhové, ostré, s nevykousanými okraji.
7.3	Kontroluje se, zda inhibiční zóny kontrolních kmenů jsou v přípustném rozmezí (http://www.eucast.org, česky: Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze (szu.cz) – Tabulky pro kontrolu kvality EUCAST).

8 Měření zón a interpretace citlivosti

8.1 Okraje zón u všech antibiotik (není-li stanoveno jinak v sekci 8.9) se odečítají ve vzdálenosti 30 cm od oka, od bodu úplné inhibice viditelné pouhým okem. U obtížně viditelných zón pomůže naklonění plotny do úhlu 45 ° proti pracovnímu stolu.

8.2 Neobohacené plotny se odečítají ze spodní strany proti tmavému pozadí v odraženém světle.

8.3 Obohacené plotny se odečítají po odstranění víčka z horní strany v odraženém světle.

8.4 Plotny nelze odečítat v procházejícím světle (kdy je plotna umístěna proti světlu) nebo pomocí lupy, pokud není stanoveno jinak (viz sekce 8.9).

8.5 Průměry inhibičních zón se měří na nejbližší milimetr pravítkem nebo posuvným měřítkem.

8.5.1 Používá-li se automatický odečítač zón, musí být kalibrován podle manuálního odečítání.

8.6 Průměry zón se interpretují do kategorií citlivosti podle poslední verze tabulek breakpointů na http://www.eucast.org (česky: Klinické breakpointy - breakpointy a návody - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze (szu.cz)).

8.7 Pokud se průměry zón odečítají s pomocí šablon, je zapotřebí umístit plotnu na šablonu a zóny interpretovat podle breakpointů EUCAST vyznačených na šabloně. Je třeba se ujistit, že breakpointy na šabloně jsou podle poslední verze tabulek breakpointů EUCAST. Program pro vyrobení šablony je volně dostupný na http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program.

8.8 Několik obrázků s příklady odečítání průměru inhibičních zón uvádí Reading Guide na http://www.eucast.org (česky: Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze (szu.cz) – Disková difuzní metodologie EUCAST → Návod k odečítání). Tento dokument také zahrnuje pokyny pro odečítání specifických kombinací bakterie-antibiotikum.

8.9 Specifické pokyny pro odečítání:

8.9.1 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.

8.9.2 Antagonisté v půdě mohou být příčinnou slabého růstu v zóně kolem disku s trimetoprimem nebo trimetoprim-sulfametoxazolem. Takový nárůst se přehlíží a průměr zóny se měří od jejího zřetelného okraje.

Izoláty *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* a *Burkholderia pseudomallei* se hlásí jako citlivé, vytváří-li kolem disku s trimetoprim-sulfametoxazolem jakoukoli známku inhibiční zóny ≥ breakpoint pro citlivost. Je třeba upozornit, že uvnitř některých zón může být růst výrazný.

	Pokud kmen roste až k disku a není přítomna žádná známka inhibice, hodnotí se výsledek jako žádná zóna. *Aeromonas* spp. a *Brucella melitensis* se odečítají od okraje zřetelné inhibiční zóny kolem trimetoprim-sulfometoxazolu a jemné zastření nebo růst v zóně se přehlíží. Je-li vytvořen zřetelný okraj vnitřní zóny, odečítá se zóna od tohoto okraje.
8.9.3	U *Enterobacterales* s ampicilinem, ampicilin-sulbaktamem a amoxicilin-klavulanovou kyselinou se přehlíží jemný růst uvnitř zóny, který se vyskytuje u některých šarží MH agaru.
8.9.4	U *Enterobacterales* s temocillinem se přehlíží izolované kolonie uvnitř inhibiční zóny a odečte se vnější okraj zóny.
8.9.5	U *Enterobacterales* s mecilinamem se přehlíží izolované kolonie uvnitř inhibiční zóny a odečte se vnější okraj zóny.
8.9.6	U *Escherichia coli* s fosfomycinem se přehlíží izolované kolonie uvnitř inhibiční zóny a odečte se vnější okraj zóny.
8.9.7	Plazivý růst *Proteus* spp. se přehlíží a odečítá se inhibice růstu.
8.9.8	Okraj zóny kolem benzylpenicilinu ≥ 26 mm se u *Staphylococcus aureus* prohlíží z přední strany plotny blízko světla (v procházejícím světle). Izoláty s průměrem inhibiční zóny ≥ breakpoint pro citlivost, ale s ostrými okraji zón, se hlásí jako rezistentní.
8.9.9	Při detekci rezistence k meticilinu pomocí cefoxitinu u *Staphylococcus* spp. se měří průměr zřetelné zóny a při dobrém osvětlení se pátrá po koloniích uvnitř inhibiční zóny. Tyto kolonie mohou být buď způsobeny kontaminací nebo expresí heterogenní rezistence k meticilinu.
8.9.10	Okraj zóny kolem vankomycinu ≥ 12 mm se u enterokoků prohlíží z přední strany plotny blízko světla (v procházejícím světle). Neostré okraje zóny a kolonie uvnitř zóny ukazují na rezistenci k vankomycinu a měly by být dále zkoumány. Izoláty nesmí být hlášeny jako citlivé dříve než za 24 h inkubací.
8.9.11	U hemolytických streptokoků se odečítá inhibice růstu, nikoli inhibice hemolýzy. β-hemolýza obvykle růst neobsahuje, zatímco α-hemolýza a růst se většinou překrývají. Odlišit růst od hemolýzy napomáhá naklánění plotny dopředu a dozadu.
8.9.12	U *H. influenzae* a beta-laktamů se průměr zóny odečítá od vnějšího okraje i v případě, kdy jasná inhibiční zóna obsahuje oblast růstu kolem disku.
8.9.13	U *Brucella melitensis* s rifampicinem se zóny pečlivě zkoumají, zda se v nich nevyskytují kolonie blízko okraje zóny. Při odečítání je třeba brát takové kolonie v úvahu.

9 Kontrola kvality

9.1 Ke sledování kvality vyšetření se používají kontrolní kmeny (KK) uvedené v **Tabulce 4**. Základní doporučené kontrolní kmeny jsou typicky citlivé kmeny. Pro ověření metod k detekci rezistence, zprostředkované známými mechanismy, jsou určeny rezistentní KK (Rozšířená kontrola kvality, **Tabulka 5**). KK mohou být zakoupeny ze sbírek kultur nebo z komerčních zdrojů.

9.1.1 Pro kontrolu inhibiční složky v discích obsahujících kombinaci β-laktamů s inhibitory β-laktamáz se doporučuje používat specifické kmeny produkující β-laktamázu (**Tabulka 4**). Tato kontrola se provádí rutinně. Aktivní složka se kontroluje pomocí citlivého KK kmene.

9.2 KK se uchovávají v podmínkách, které udržují životaschopnost a vlastnosti kmenů. Vyhovující je skladování kmenů na skleněných korálcích při -70 °C v glycerolovaném bujonu (nebo v podobné komerční pomůcce). Každý kmen by měl být uchováván ve dvou lahvičkách, v jedné pro použití a v druhé v archivu jako případná náhražka lahvičky pro použití.

9.3 Každý týden se korálek z lahvičky pro použití subkultivuje na příslušnou neselektivní půdu a ověří se čistota kultury. Z této čisté kultury se každý den týdne připraví jedna subkultura. Náročné bakterie, které nepřežijí na plotnách po dobu týdne, je zapotřebí přeočkovat každý den. KK lze přeočkovávat nejvýše za 6 dnů, pak se plotny vyřadí a znovu se připraví nové čisté plotny ze zmražené lahvičky pro použití. Po vypotřebování lahvičky pro použití se nová lahvička pro použití připraví z archivované lahvičky.

Při subkultivaci KK se očkuje několik kolonií k prevenci selekce mutanta.

9.4 Ověřuje se, zda výsledky jsou v přípustných rozmezích v EUCAST QC Tables na http://www.eucast.org (česky: Vyšetření antibiotické citlivosti bakterií - SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze (szu.cz) – Tabulky pro kontrolu kvality EUCAST).

9.4.1 V tabulkách kontroly kvality EUCAST jsou uvedeny cílové hodnoty i rozmezí. Opakovaná vyšetření KK EUCAST by měla poskytnout náhodně rozdělené hodnoty průměru v doporučeném rozmezí. Je-li počet měření ≥ 10, pak střední hodnota průměru zón by měla být v blízkosti cílové hodnoty (optimálně ± 1 mm od cílové hodnoty).

9.5 Ke sledování kvality vyšetření je nutno používat doporučené KK. Používá se jednodenní kultura KK a stejný postup vyšetření citlivosti jako u klinických izolátů.

Kontrolní testy by měly být prováděny a vyhodnocovány denně, nebo alespoň čtyřikrát týdně u antibiotik v rutinní sestavě. Kontrolní testy by měly být odečítány a vyhodnoceny před oznámení výsledků testů citlivosti.

9.5.1 Každý den, kdy se provádí vyšetření, se zkontrolují výsledky posledních 20 testů. Prozkoumají se výsledky z hlediska trendů a zón, které opakovaně spadají nad nebo pod cílovou hodnotu.

9.5.2 Pokud dva z testů nenásledujících po sobě jsou mimo rozmezí, avšak na stejné straně cílové hodnoty, lze výsledek vyšetření citlivosti klinického izolátu hlásit, je však zapotřebí vyšetřit příčinu.

9.5.3 Pokud jsou dva po sobě jdoucí testy mimo rozmezí, nebo pokud je mimo rozmezí více disků vyšetřených v týž den, je zapotřebí před hlášením výsledků vyšetřit příčinu. Test možná bude nutno opakovat.

9.5.4 Není-li prokázána rezistence u rezistentního KK, je nutno pozastavit vyšetření citlivosti klinických izolátů, vyšetřit příčinu a rezistentní KK znovu otestovat.

9.5.5 Při hledání možných příčin chyb u diskové difuze je třeba vzít do úvahy problémy vztahující s k diskům s antibiotiky, médiím, podmínkám vyšetření a KK.

9.6 Kromě rutinní kontroly kvality je u každé nové šarže Mueller-Hintonova agaru nutno ověřit, zda jsou všechny zóny v přípustném rozmezí. U každé nové šarže je nutno také změřit, zda výška agaru je v přípustném limitu.

Nepřijatelné odchylky se mohou vyskytnout v těchto souvislostech s kvalitou půdy: u aminoglykosidů a dvojmocných kationtů, u tigecyklinu a hořčíku, u trimetoprim-sulfametoxazolu a obsahu tyminu a tymidinu, u erytromycinu a nevhodného pH. Výška agaru nad nebo pod přípustným limitem je příčinnou vytváření menších, respektive větších průměrů zón.

9.6.1 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.

9.6.2 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.

Tabulka 4	**Kontrolní kmeny pro rutinní kontrolu kvality**

Bakterie	**Kmen**	**Vlastnosti**
Escherichia coli	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 76.24 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434 ***CNCTC 5276***	Citlivý, divoký typ
Escherichia coli	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 10218 DSM 5923 CCUG 30600 CECT 943 ***CNCTC 5321***	TEM-1 ß-laktamáza, ampicilin rezistentní (pro kontrolu inhibiční složky v discích obsahujících kombinaci β-laktamů s inhibitory)
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700603 NCTC 13368 CECT 7787	Producent ESBL (SHV-18) (pro kontrolu inhibiční složky v discích obsahujících kombinaci β-laktamů s inhibitory)
Klebsiella pneumoniae	ATCC BAA-2814	KPC-3, SHV-11 a TEM-1
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853 NCTC 12903 CIP 76.110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108 ***CNCTC 5482***	Citlivý, divoký typ
Staphylococcus aureus	ATCC 29213 NCTC 12973 CIP 103429 DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794 ***CNCTC 5480***	Slabý producent β-laktamázy
Enterococcus faecalis	ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570 CCUG 9997 CECT 795 ***CNCTC 5483***	Citlivý, divoký typ
Streptococcus pneumoniae	ATCC 49619 NCTC 12977 CIP 104340 DSM 11967 CCUG 33638 ***CNCTC 5043***	Snížená citlivost k benzylpenicilinu
Haemophilus influenzae	ATCC 49766 NCTC 12975	Citlivý, divoký typ

	CIP 103570 DSM 11970 CCUG 29539 ***CNCTC 5105***	
Campylobacter jejuni	ATCC 33560 NCTC 11351 CIP 702 DSM 4688 CCUG 11284 ***CNCTC 7365***	Citlivý, divoký typ Pro podmínky vyšetření, viz **Příloha A**

Tabulka 5	**Další kontrolní kmeny k detekci specifických mechanismů rezistence (rozšířená kontrola kvality)**	
Bakterie	**Kmen**	**Vlastnosti**
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787 ***CNCTC 7439***	Producent ESBL (SHV-18)
Staphylococcus aureus	NCTC 12493 CCUG 67181	*mecA* pozitivní, meticilin rezistentní (MRSA)
Enterococcus faecalis	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289 ***CNCTC 5530***	Aminoglykosid-modifikující enzym (High-level aminoglycoside resistant, HLAR) a vankomycin rezistentní (*vanB* pozitivní)
Haemophilus influenzae	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	Snížená citlivost k β-laktamům způsobená mutacemi PBP

Příloha A

Disková difuzní metoda pro *Campylobacter jejuni* a *coli*

Při vyšetřování citlivosti diskovou difuzní metodou EUCAST u *Campylobacter jejuni* a *coli* musí být dodržen následující postup (Tabulka A1).

Tabulka A1	**Disková difuzní metoda pro *Campylobacter jejuni* a *coli***
Půda	Mueller-Hinton agar s 5 % defibrinované koňské krve a 20 mg/l β-NAD (MH-F). Plazivému růstu lze předejít sušením ploten MH-F před inokulací (při 20-25 °C přes noc, nebo s odstraněným víčkem při 35 °C po dobu 15 min).
Inokulum	0,5 McFarland
Inkubace	Mikroaerobní prostředí 41 ± 1 °C 24 ± 1 h Růst po inkubaci by měl být splývavý. Některé izoláty *C. coli* po 24 h dostatečně nerostou. Takové izoláty je nutné ihned po odečtení dále reinkubovat a inhibiční zóny se odečítají po celkové inkubaci 40-48 h. Inkubační teplota 41 ± 1 °C zajišťuje optimální podmínky pro růst *Campylobacter* spp.
Odečítání	Odečítají se MH-F plotny zepředu po odstranění víčka v odraženém světle. Okraje zón se odečítají na plotně vzdálené cca 30 cm od oka, nakloněné ve 45 ° úhlu nad pracovním stolem, v místě úplné inhibice růstu na okraji inhibiční zóny.
Kontrola kvality	*Campylobacter jejuni* ATCC 33560

EUCAST EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases