

Европейское общество по клинической микробиологии и инфекционным болезням

# Определение чувствительности к антимикробным препаратам Диско-диффузионный метод EUCAST

Версия 6.0 Январь 2017

### Изменения по сравнению с предыдущей версией (5.0)

Слайд	Изменения
7	Добавлены Aerococcus sanguinicola и urinae и Kingella kingae.
8	Добавлена информация о размерах чашек Петри.
10	Изменены рекомендации по условиям хранения чашек с агаром, приготовленным в лаборатории.
11	Добавлена информация о подсушивании чашек с агаром.
15-16	Добавлены рекомендации по инокуляции чашек при исследовании грамотрицателных и грамположительных бактерий.
17	Добавлена информация о стабильности дисков с антибиотиками.
19	Добавлена информация по расположению чашек Петри в термостате.
21	Добавлены Aerococcus sanguinicola и urinae и Kingella kingae.

### Изменения по сравнению с предыдущей версией (5.0)

Слайд	Изменения
27	Дано разъяснение по учету зон подавления роста и использованию автоматических систем для учета зон подавления роста.
28	Добавлены ампициллин-сульбактам и амоксициллин-клавулановая кислота.
29	Добавлены инструкции по учету результатов определения чувствительности Escherichia coli к фосфомицину.
31	Добавлена информация по контролю ингибирующего компонента в дисках, содержащих комбинации β-лактамов с ингибиторами β-лактамаз.
32	Добавлено: Klebsiella pneumoniae ATCC 700603.
33	Удалено: <i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468.

### Питательные среды для определения чувствительности



### Питательные среды для определения чувствительности

- Используйте только агар Мюллера-Хинтон (МХ)
- Среда для привередливых бактерий (МХ-П, Мюллера-Хинтон Привередливые) среда Мюллера-Хинтон с добавлением 5% механически дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД (никотинамидадениндинуклеотид).
- Следует использовать β-НАД со степенью чистоты ≥ 98%.

### Питательные среды для непривередливых бактерий

Микроорганизмы	Питательные среды
Enterobacteriaceae  Pseudomonas spp.  Stenotrophomonas maltophilia  Acinetobacter spp.  Staphylococcus spp.  Enterococcus spp.	Агар Мюллера-Хинтон

### Питательные среды для привередливых бактерий

Микроорганизмы	Питательные среды
Streptococcus pneumoniae Streptococcus групп A, B, C и G Стрептококки группы Viridans Haemophilus influenzae Moraxella catarrhalis Listeria monocytogenes Pasteurella multocida Campylobacter jejuni и coli Corynebacterium spp. Aerococcus sanguinicola и urinae Kingella kingae	Агар Мюллера-Хинтон + 5% механически дефибринированной лошадиной крови + 20 мг/л β-НАД (МХ-П)
Другие привередливые микроорганизмы	В процессе валидации

### Приготовление питательных сред в лаборатории (In-house)

- Приготовить среду в соответствии с инструкцией производителя.
- Добавить кровь и β-НАД только после остывания среды до 42-45°С. После добавления крови и β-НАД – тщательно перемешать и сразу разлить по чашкам Петри.
- Разлить агар по чашкам Петри на ровной поверхности, чтобы толщина слоя агара составляла 4,0 +/- 0,5 мм. Если при повторных измерениях этот параметр воспроизводимо оказывается больше или меньше 4 мм, необходимо провести коррекцию дозируемого объема.

Обычно на круглую чашку Петри диаметром 90 мм требуется около 25 мл агара, круглую Чашку Петри диаметром 100 мм – 31 мл, круглую чашку Петри диаметром 150 мм – 71 мл, квадратную чашку Петри размером 100х100 мм – 40 мл агара.

### Контроль качества агара Мюллера-Хинтон

Для каждой новой партии агара необходимо удостовериться, что результаты исследования всех комбинаций контрольный микроорганизм-антибиотик находятся в пределах допустимых диапазонов.

#### Особые проблемы:

- О высокой или низкой концентрации двухвалентных катионов может свидетельствовать увеличение/уменьшение по сравнению с контрольными значениями диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг дисков с аминогликозидами.
- Превышение содержания тимина и тимидина может приводить к уменьшению по сравнению с контрольными значениями диаметра зоны подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 вокруг диска с триметопримом-сульфаметоксазолом.

## Подсушивание и хранение чашек с агаром

- Чашки с агаром, приготовленные в лаборатории (In-house):
  - Хранить при 4-8°С
  - Условия подсушивания и хранения чашек с агаром определяются непосредственно в лаборатории.
- Коммерческие готовые чашки:
  - Хранить в соответствии с инструкцией производителя.
  - Использовать до даты указанной на упаковке.

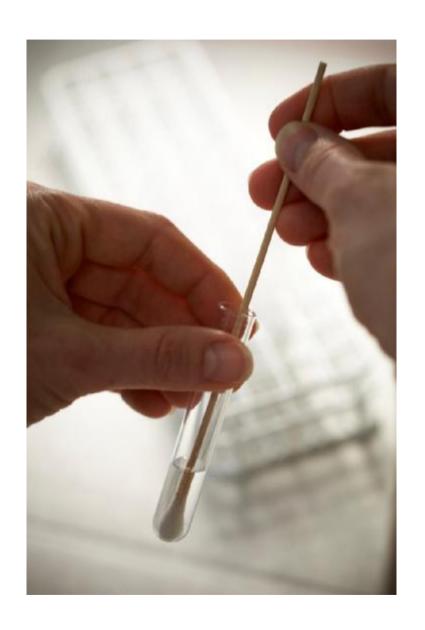
## Подсушивание и хранение чашек с агаром

- Перед инокуляцией чашек необходимо убедиться, что чашки с агаром имеют комнатную температуру.
- Поверхность агара должна быть сухой. Излишняя влажность может быть причиной формирования нечеткого края или вуалеобразного роста внутри зоны
  - На поверхности среды или внутренней поверхности крышки не должно быть видимых капель влаги, что может встречаться при хранении чашек в пластиковых пакетах или плотно закрытых контейнерах.
- При необходимости следует подсушить чашки при 20-25°С в течение 16-18 ч или при 35°С с открытой крышкой в течение 15 минут.
- Нельзя пересушивать агар.

### Инокулюм

 Для выполнения метода используется бактериальная суспензия плотностью 0,5 по стандарту МакФарланда\*.

<sup>\*</sup>Соответствует приблизительно  $1-2 \times 10^8$  КОЕ/мл для *E. coli*.



## Выберите изолированные колонии 18-24 часовой культуры бактерий, выросшей на неселективной среде



### Приготовление инокулюма

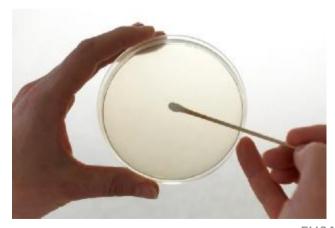
- Стерильной бактериологической петлей или ватным тампоном необходимо собрать несколько (если возможно) морфологически схожих колоний (чтобы избежать отбора атипичных вариантов) 18-24 часовой культуры, выращенной на неселективной питательной среде.
- Суспендировать полученный материал в стерильном изотоническом растворе и тщательно перемешать.
- Довести плотность суспензии до 0,5 по стандарту МакФарланда путем добавления физиологического раствора или бактериальной массы.
   Предпочтительно измерять плотность с помощью фотометрического устройства
  - Исключение: Плотность суспензии S. pneumoniae при использовании культуры, выросшей на кровяном агаре, должна быть 0,5 по стандарту МакФарланда, при использовании культуры, выросшей на шоколадном агаре, - 1 по стандарту МакФарланда.

### Инокуляция чашек

- Оптимальное время использования бактериальной суспензии в течение 15 минут после приготовления, но всегда не позже, чем через 60 минут после приготовления.
- Необходимо убедиться, что чашки с агаром достигли комнатной температуры.
- Погрузить стерильный ватный тампон в суспензию.
- При исследовании грамотрицательных бактерий необходимо удалить избыток суспензии, отжимая тампон о внутренние стенки пробирки, чтобы избежать нанесения избыточного количества инокулюма.
- При исследовании грамположительных бактерий отжимать тампон о внутренние стенки пробирки не следует.

### Инокуляция чашек

- Равномерно нанести инокулюм штриховыми движениями на всю поверхность агара в трех направлениях. Можно использовать автоматический инокулятор.
- При нанесении инокулюма грамположительных бактерий необходимо особенно тщательно следить за тем, чтобы между штрихами не оставалось свободного пространства.
- Если нужно инокулировать несколько чашек с агаром одной и той же суспензией, следует повторить предыдущие шаги для каждой чашки.



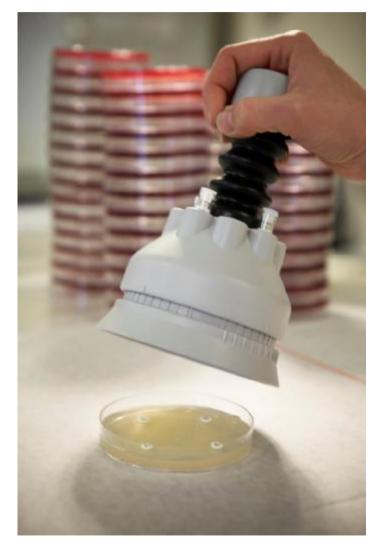


#### Хранение дисков с антибиотиками

- Дисков с антибиотиками должны храниться в соответствии с рекомендациями производителя.
  - В отдельных случаях рекомендации по хранению дисков могут отличаться из-за большей лабильности некоторых антибиотиков.
- Рабочие наборы дисков с антибиотиками следует хранить в защищенных от света и плотно закрывающихся сухих контейнерах С индикаторным влагопоглотителем.
- Чтобы избежать образования конденсата на дисках не следует открывать контейнеры с дисками до достижения ими комнатной температуры.
  - Лучше держать диски при комнатной температуре в течение рабочего дня, чем несколько раз перемещать их из холодильника и обратно.
- Нельзя использовать диски с антибиотиками после истечения срока годности, указанного производителем.

### Нанесение дисков с антибиотиками

- Диски должны быть нанесены в течение 15 минут после инокуляции.
- Контакт диска с поверхностью агара должен быть полным и плотным на всем протяжении.
- Не следует наносить много дисков на одну чашку Петри, чтобы избежать перекрывания зон подавления роста и взаимодействия между антибиотиками. Очень важно обеспечить возможность точного измерения диаметров зон подавления роста.



### Инкубация чашек

- Перевернуть чашки и убедиться, что диски не падают с поверхности агара.
- Начать инкубацию в течение 15 минут после нанесения дисков с антибиотиками.
- Расположение чашек Петри в термостате (в частности, количество чашек в одной стопке) может привести к их неравномерному нагреву. Степень точности работы термостатов может быть различной, но для большинства термостатов наиболее приемлемым количеством является пять чашек в одной стопке.
- Чашки с агаром МХ инкубируются при 35°С в обычной атмосфере.
- Чашки с агаром МХ-П инкубируются при 35°С в атмосфере, содержащей 4-6% СО<sub>2</sub>.

### Инкубация чашек

Микроорганизмы	Условия инкубации
Enterobacteriaceae	35+/-1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Pseudomonas spp.	35+/-1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Stenotrophomonas maltophilia	35+/-1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Acinetobacter spp.	35+/-1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Staphylococcus spp.	35+/-1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Enterococcus spp.	35+/-1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч (24 ч для гликопептидов)

### Инкубация чашек

Микроорганизмы	Условия инкубации
Streptococcus групп A, B, C и G	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч
Стрептококки группы Viridans	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч
Streptococcus pneumoniae	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч
Haemophilus spp.	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч
Moraxella catarrhalis	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч
Listeria monocytogenes	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч
Pasteurella multocida	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч
Campylobacter jejuni и coli	41+/-1°C, микроаэрофильные усл., 24 ч (40-48 ч)
Corynebacterium spp.	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч (40-44 ч)
Aerococcus sanguinicola и urinae	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч (40-44 ч)
Kingella kingae	35+/-1°С, атмосфера с 4-6% СО <sub>2</sub> , 16-20 ч (40-44 ч)
Другие привередливые микроорганизмы	В процессе валидации

### Правило 15-15-15 минут

В процессе приготовления чашек необходимо:

- Использовать инокулюм в течение 15 минут после приготовления но не позднее 60 минут
- Нанести диски с антибиотиками в течение 15 минут после инокуляции чашек.
- Начать инкубацию в течение 15 минут после нанесения дисков.

### Исследование чашек после инкубации

- При соблюдении правил подготовки инокулюма и инокуляции чашек с агаром должен сформироваться равномерный сплошной слой бактериального роста (газон).
- Газон должен быть равномерным на всей поверхности агара. Край зоны подавления роста вокруг дисков с антибиотиками должны иметь форму окружности. Края зон подавления роста должны быть ровными (см. следующий слайд).
- Формирование отдельных колоний вместо сплошного роста свидетельствует о недостаточной плотности инокулюма. В этом случае исследование необходимо повторить.

### Газон роста должен быть сплошным и равномерным на всей поверхности агара



EUCAST 2017 Версия 6.0

### Измерение зон подавления роста

• При измерении зон подавления роста следует учитывать зону полного подавления роста микроорганизмов, определяемую невооруженным глазом, при расположении чашки на расстоянии примерно 30 см от глаз.

#### Примеры:



*E. coli* Ципрофлоксацин



S. aureus Эритромицин



Коагулазонегативные стафилококки Триметоприм



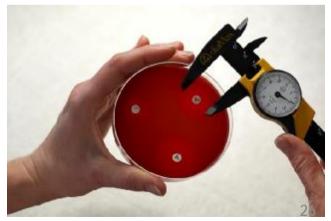
S. pneumoniae Рифампицин

### Измерение зон подавления роста

 Чашку Петри с агаром МХ располагают дном кверху с закрытой крышкой на темную поверхность, освещая ее отраженным светом.

 Чашку Петри с агаром МХ-П помещают дном книзу, освещая ее отраженным светом, крышку снимают.





### Измерение зон подавления роста

- Не следует учитывать результаты в проходящем свете (подносить чашку к источнику света) или использовать увеличительное стекло, если это не предусмотрено методикой (см. далее).
- Измерение зон подавления роста проводится при помощи линейки или штангенциркуля. При использовании автоматических приборов для учета результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом, результаты должны быть калиброваны по отношению к визуальному методу.
- При обнаружении двойной зоны подавления роста или отдельных колоний внутри зоны, необходимо проверить чистоту культуры и при необходимости повторить исследование. Если культура чистая, то отдельные колонии внутри зоны необходимо учитывать при измерении диаметра.

### Измерение зон подавления роста – исключения (1)

Микроорганизм	Антибиотик	Измерение зон подавления роста
Proteus spp.	Любой	Не учитывать роение
Streptococcus spp.	Любой	Учитывать зону подавления роста и не учитывать зону гемолиза.
Любой	Трметоприм Триметоприм-сульфаметоксазол	Не учитывать слабый рост до края диска внутри зоны, измерить диаметр по наиболее четкому краю.
Staphylococcus spp.	Линезолид	Учитывать результаты в проходящем свете (поднести чашку к источнику света).
Enterococcus spp.	Ванкомицин	Учитывать результаты в проходящем свете (поднести чашку к источнику света).
Enterobacteriaceae	Ампициллин Ампициллин-сульбактам Амоксициллин-клавулановая кислота  EUCAST 2017 Версия 6.0	Не учитывать нежный рост, который может появляться в виде внутренней зоны при использовании некоторых партий агара МХ.

### Измерение зон подавления роста – исключения (2)

Микроорганизм	Антибиотик	Измерение зон подавления роста
E. coli	Мециллинам	Не учитывать отдельные колонии внутри зоны подавления роста.
E. coli	Фосфомицин	Не учитывать отдельные колонии внутри зоны подавления роста. Диаметр измеряется по наружному краю зоны подавления роста.
S. aureus	Бензилпенициллин	Тщательно осмотреть край зоны подавления роста в проходящем свете.
Стафилококки	Цефокситин	Тщательно осмотреть зону подавления роста для выявления колоний внутри зоны.

#### Интерпретация результатов

- Необходимо проверить соответствие диаметров зон подавления роста контрольных штаммов допустимым диапазонам.
- Значения диаметров зон подавления роста следует интерпретировать для определения клинических категорий чувствительности (Ч, УР и Р) в соответствии с Таблицами пограничных значений EUCAST (www.eucast.org). В качестве альтернативы можно использовать шаблон с отмеченными на нем пограничными значениями EUCAST.

### Контроль качества определения чувствительности

- Для контроля качества выполнения исследования необходимо использовать рекомендованный набор контрольных штаммов для (рутинного) повседневного контроля (см. <u>EUCAST QC Tables</u>).
- Для контроля ингибирующего компонент дисков, содержащих комбинации β-лактамов с ингибиторами β-лактамаз, рекомендуется использовать штаммы, продуцирующие β-лактамазы, которые должны быть включены в повседневную программу. Активный компонент таких дисков контролируется с помощью стандартных контрольных штаммов.
- Контрольные штаммы, имеющие определенные механизмы резистентности, могут использоваться для подтверждения возможности выявления резистентности (см. <u>EUCAST QC Tables</u>).
- Контрольные штаммы могут быть получены из коллекций типовых культур или коммерческих источников.

### Перечень контрольных штаммов, рекомендованных EUCAST для рутинного контроля

Микроорганизм	Номер коллекции типовых культур	Характеристика
E. coli	ATCC 25922; NCTC 12241 CIP 7624; DSM 1103 CCUG 17620; CECT 434	Чувствительный, дикий тип
E. coli	ATCC 35218; NCTC 11954 CIP 102181; DSM 5923 CCUG 30600; CECT 943	Продуцент β-лактамазы ТЕМ-1
K. pneumoniae	ATCC 700603; NCTC 13368 CCUG 45421; CECT 7787	Продуцент ESBL (SHV-18)
P. aeruginosa	ATCC 27853; NCTC 12903 CIP 76110; DSM 1117 CCUG 17619; CECT 108	Чувствительный, дикий тип
S. aureus	ATCC 29213; NCTC 12973 CIP 103429; DSM 2569 CCUG 15915; CECT 794	Слабый продуцент β-лактамаз
E. faecalis	ATCC 29212; NCTC 12697 CIP 103214; DSM 2570 CCUG 9997; CECT 795	Чувствительный, дикий тип

### Перечень контрольных штаммов, рекомендованных EUCAST для рутинного контроля

Микроорганизм	Номер коллекции типовых культур	Характеристика
S. pneumoniae	ATCC 49619; NCTC 12977 CIP 104340; DSM 11967 CCUG 33638	Сниженная чувствительность к бензилпенициллину
H. influenzae	ATCC 49766; NCTC 12975 CIP 103570; DSM 11970 CCUG 29539	Чувствительный, дикий тип
Campylobacter jejuni	ATCC 33560; NCTC 11351; CIP 702; DSM 4688 CCUG 11284	Чувствительный, дикий тип

# Перечень контрольных штаммов, рекомендованных EUCAST для выявления отдельных механизмов резистентности (расширенный КК)

Микроорганизм	Номер коллекции типовых культур	Характеристика
K. pneumoniae	ATCC 700603; NCTC 13368 CCUG 45421; CECT 7787	Продуцент ESBL (SHV-18)
S. aureus	NCTC 12493	<i>mecA</i> -положительный, гетеро- резистентный к оксациллину
E. faecalis	ATCC 51299; NCTC 13379 CIP 104676; DSM 12956 CCUG 34289	Высокий уровень резистентности к аминогликозидам (HLAR), и резистентность к ванкомицину (vanB-положительный)
H. influenzae	ATCC 49247; NCTC 12699 CIP 104604; DSM 9999 CCUG 26214	β-лактамаза-отрицательный, ампициллин-резистентный (BLNAR)

### Коллекции типовых культур

ATCC, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

NCTC, National Collection of Type Cultures, Health Protection Agency Centre for Infections, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK.

CIP, Collection de Institut Pasteur, 25–28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 France.

DSMZ, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 16, D-38124 Braunschweig, Germany.

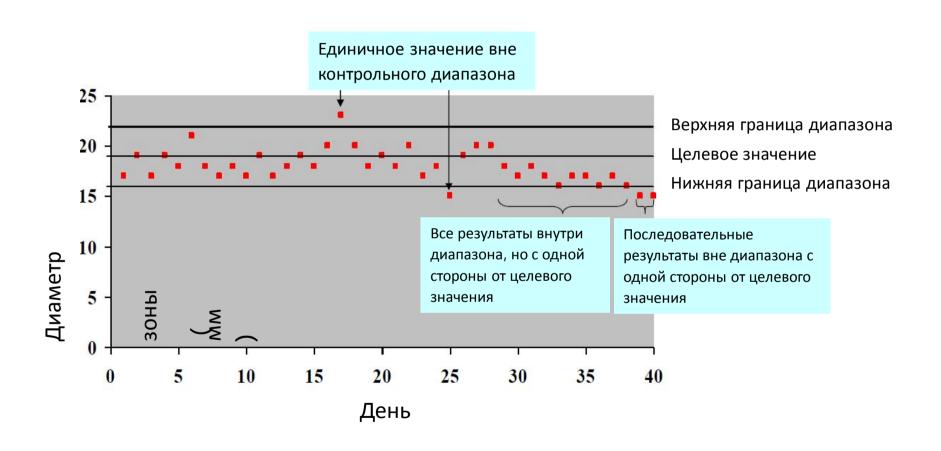
CCUG, The Culture Collection University of Gothenburg.

CECT. Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia. 46100. Burjassot. Valencia. Spain.

## Для общей оценки качества выполнения метода используются контрольные штаммы для рутинного контроля

- Контрольные исследования следует проводить ежедневно или, по крайней мере, 4 раза в неделю для тех антибиотиков, которые включены в стандартные панели (наборы).
- Результаты контрольных исследований необходимо всегда оценить до начала учета результатов исследования клинических изолятов.
- Результаты каждого исследования контрольного штамма следует сравнивать с результатами последних 20 последовательных исследований.
- Оценить результаты для выявления тенденции и стабильного отклонения диаметров зон от целевых значений.
- Если 2 и более из 20 значений находятся за пределами допустимого диапазона, необходимо выяснить причины получения нестабильных результатов.

#### Мониторинг качества исследований



### Мероприятия при неудовлетворительных результатах КК

- Если диаметры зон подавления роста контрольного штамма в 2 непоследовательных случаях из 20 находятся за пределами допустимого диапазона можно репортировать результаты определения чувствительности клинических изолятов; но необходимо выяснить причины неудовлетворительных результатов.
- Если диаметры зон подавления роста контрольного штамма в 2 последовательных случаях из 20 находятся за пределами допустимого диапазона выяснить причины до репортирования результатов определения чувствительности клинических изолятов. Может возникнуть необходимость в повторении исследований.
- Если зоны подавления роста вокруг >2 дисков находятся за пределами допустимого диапазона в один и тот же день выяснить причины до репортирования результатов. Может возникнуть необходимость в повторении исследований.
- Если при исследовании резистентных контрольных штаммов резистентность не выявляется – нельзя выдавать результаты определения чувствительности, следует выяснить причины и повторить исследования.

### Хранение и субкультивирование контрольных штаммов

- Контрольные штаммы следует хранит ь в бульоне с добавлением глицерина при температуре -70°С в двух экземплярах: одна пробирка для регулярного использования, другая в качестве «архива». Альтернативный вариант можно использовать замороженные лиофилизированные культуры или коммерческие системы хранения.
- Штамм из пробирки, предназначенной для регулярного использования, следует субкультивировать еженедельно на соответствующей неселективной среде; проверить чистоту культуры.
- Далее следует проводить пересевы с данной чистой субкультуры ежедневно в течение не более 7 дней.
- Привередливые микроорганизмы можно субкультивировать только периодически в течение 6 дней.
- Когда содержимое пробирки для регулярного использования будет практически израсходовано, следует субкультивировать культуру из архивной пробирки и из данной субкультуры приготовить другую пробирку для регулярного использования.

### Возможные источники ошибок (1)

Питательная среда	Хранение чашек
	Несоблюдение инструкции при приготовлении
	Вариации между различными партиями или смена поставщика агара
	Добавки (вариации между партиями, неправильное количество или истечение срока годности)
	рН
	Толщина слоя агара/Объем агара
	Срок годности
	Не соблюдение правила «15-15-15» (использование суспензии в течение 15 мин, нанесение дисков в течение 15 мин, начало инкубации в течение 15 мин)
Условия	Инкубация (температура, атмосфера и время)
тестирования	Неправильная инокуляция (слишком слабый, слишком тяжелый инокулюм, неравномерная инокуляция)
	Условия учета результатов
	Интерпретация края зоны подавления роста

### Возможные источники ошибок (2)

Диски с антибиотиками	Неправильный выбор диска (другой диск, или диск с другой нагрузкой)
	Активность антибиотика (неправильное хранение, лабильность антибиотика, истечение срока годности)
	Диски не достигли комнатной температуры до открытия контейнера
	Чрезмерное количество дисков на чашке (взаимодействие между антибиотиками)
Контрольные микроорганизмы	Неправильный выбор контрольного штамма
	Мутация
	Контаминация
	Возраст культуры

#### Вебсайт EUCAST

 Регулярно проверяйте информацию на вебсайте EUCAST для своевременного обновления методологии, контрольных диапазонов и пограничных значений.

### www.eucast.org

• Любые комментарии и предложения присылайте, пожалуйста, по адресу <u>erika.matuschek@escmid.org</u> или направляйте в секретариат EUCAST (см. вебсайт).



Европейское общество по клинической микробиологии и инфекционным болезням