

Европейское общество по клинической микробиологии и инфекционным болезням

Определение чувствительности к антимикробным препаратам Диско-диффузионный метод EUCAST

Версия 8.0 Январь 2020

Изменения по сравнению с предыдущей версией (в. 7.0)

Слайд	Изменения	
5 и 19	Добавлена информация о <i>Burkholderia pseudomallei.</i>	
26	Добавлены рекомендации по оценке зоны подавления роста в трудных случаях определения границы зоны подавления.	
27	Инструкции по учету результатов определения чувствительности к мециллинаму валидированы для всех <i>Enterobacterales</i> , имеющих пограничные значения.	
27	Добавлена специальная инструкция по учету результатов определения чувствительности Burkholderia pseudomallei к триметоприму-сульфаметоксазолу.	
28	Удалена специальная инструкция по учету результатов определения чувствительности стафилококков к линезолиду.	
28	Добавлена специальная инструкция по учету результатов определения чувствительности <i>H. influenzae</i> к β-лактамам.	
28	Добавлена специальная инструкция по учету результатов определения чувствительности <i>Aeromonas</i> spp. к триметоприму-сульфаметоксазолу.	
31	Добавлена информация о контрольном штамме <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-2814.	
34	Добавлены ссылки на веб-страницы коллекций типовых культур.	
38	Добавлена информация о субкультивировании штаммов для контроля качества.	

Питательные среды для определения чувствительности



Питательные среды для определения чувствительности

- Для определения чувствительности непривередливых бактерий используется агар Мюллера-Хинтон (МХ) без добавок.
- Для бактерий со сложными питательными потребностями используется агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5% механически дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД (МХ-П, Мюллера-Хинтон Привередливые).
- Следует использовать β-НАД со степенью чистоты ≥ 98%.

Питательная среда для непривередливых бактерий

Микроорганизмы	Питательная среда
Enterobacterales Pseudomonas spp. Stenotrophomonas maltophilia Acinetobacter spp. Staphylococcus spp. Enterococcus spp. Aeromonas spp. Burkholderia pseudomallei	Агар Мюллера-Хинтон

Питательная среда для привередливых бактерий

Микроорганизмы	Питательные среды
Streptococcus pneumoniae Стрептококки групп A, B, C и G Стрептококки группы Viridans Haemophilus spp. 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 бактерии	В процессе валидации

Приготовление питательных сред в лаборатории (in-house)

- Приготовить среду в соответствии с инструкцией производителя.
- Кровь и β-НАД можно добавлять только тогда, когда среда остынет до 42-45°С. После внесения добавок в охлаждённую среду следует тщательно перемешать все ингредиенты.
- Разлить агар по чашкам Петри на ровной поверхности таким образом, 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, даже если толщина агара находится в пределах 3,5-4,5 мм.

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.

Убедитесь, что объем среды рассчитан правильно, исходя их истинных размеров чашек Петри, находящихся в обращении.

Контроль качества агара Мюллера-Хинтон

Необходимо проверить каждую партию МХА на соответствие диаметров зон подавления роста всех комбинаций контрольный микроорганизм-антибиотик допустимым диапазонам значений.

Особые проблемы:

- О высокой или низкой концентрации двухвалентных катионов может свидетельствовать уменьшение/увеличение по сравнению с контрольными значениями диаметров зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг дисков с аминогликозидами соответственно.
- 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 триметопримомсульфаметоксазолом.

Подсушивание и хранение чашек с агаром

- Чашки, приготовленные в лаборатории:
 - Следует хранить при температуре 4-8°С.
 - Условия подсушивания и хранения чашек с агаром определяются непосредственно в лаборатории.
- Коммерчески приготовленные чашки с агаром:
 - Следует хранить в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя.
 - Использовать до истечения срока годности, указанного на упаковке.

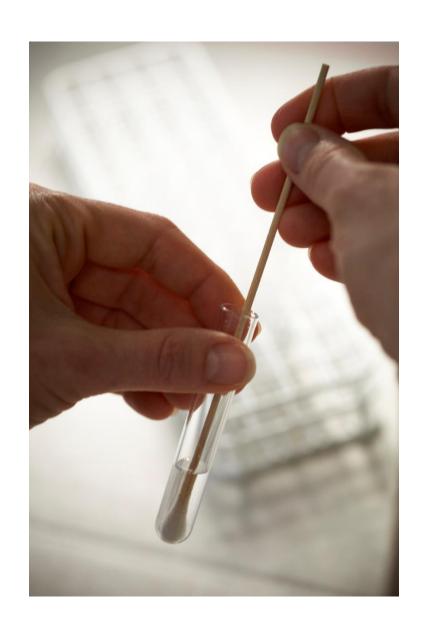
Подсушивание и хранение чашек с агаром

- До начала работы следует убедиться, что чашки с агаром достигли комнатной температуры.
- Поверхность агара должна быть сухой. Лишняя влага может вызвать формирование нечеткого края зоны подавления роста и вуалеобразного роста внутри зоны подавления.
 - На поверхности агара и внутренней поверхности крышки не должно быть видимых капель влаги. Это часто наблюдается при хранении чашек в пластиковых пакетах или запечатанных контейнерах.
 - Использовать до истечения срока годности, указанного на упаковке.
- При необходимости следует подсушить чашки при 20-25°C в течение 16-20 ч или при 35°C с открытой крышкой в течение 15 мин.
- Нельзя пересушивать чашки с агаром.

Инокулюм

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

*Соответствует приблизительно 1-2 х 10⁸ КОЕ/мл для *E. coli*.



Выберите изолированные колонии 16-24 часовой культуры бактерий, выросшей на неселективной среде



Приготовление инокулюма

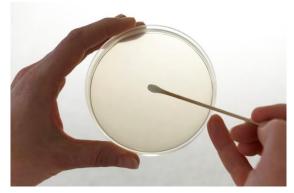
- Стерильной бактериологической петлей или хлопковым тампоном необходимо собрать колонии, выросшие на неселективном агаре в течение 16-20 ч. Если возможно следует собирать несколько морфологически схожих колоний, чтобы избежать отбора атипичных вариантов.
- Суспендировать полученный материал в стерильном изотоническом растворе и тщательно перемешать до однородной мутности.
- Довести плотность суспензии до 0,5 по стандарту МакФарланда путем добавления в суспензию микробной массы или разбавления ее стерильным изотоническим раствором. Для измерения плотности суспензии предпочтительно использовать фотометрические устройства.
 - Исключение: плотность суспензии Streptococcus pneumoniae при использовании культуры, выросшей на кровяном агаре, должна быть 0,5, а при использовании культуры, выросшей на шоколадном агаре - 1 по стандарту МакФарланда.

Инокуляция чашек

- Оптимально бактериальную суспензию следует инокулировать на агар в течение 15 минут, но не позже, чем через 60 минут после приготовления.
- Перед инокуляцией следует убедиться, что чашки с агаром достигли комнатной температуры.
- Погрузить стерильный хлопковый тампон в суспензию.
- Для грамотрицательных бактерий, чтобы избежать нанесения избыточного количества инокулюма, следует удалить излишки суспензии, тщательно отжимая тампон вращательными движениями о внутренние стенки пробирки.
- При работе с грамположительными бактериями не следует отжимать тампон о внутренние стенки пробирки.

Инокуляция чашек

- Равномерно нанести инокулюм штриховыми движениями на всю поверхность агара в трех направлениях. Можно использовать автоматическое вращающее устройство для инокуляции.
- При работе с грамположительными бактериями особенно важно следить за тем, чтобы между штрихами не оставалось промежутков.
- При нанесении одной и той же суспензии на несколько чашек с агаром, следует погружать тампон в суспензию перед инокуляцией каждой чашки.





Хранение дисков с антибиотиками

- Основное количество дисков с антибиотиками должны храниться в соответствии с рекомендациями производителя.
 - Некоторые препараты являются менее стабильными и могут требовать специальных условий хранения.
- 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 не позже, чем в течение 15 минут после нанесения дисков с антибиотиками.
- Количество чашек Петри в стопке может оказывать влияние на размер зон подавления роста вследствие неравномерного нагревания. Точность работы термостатов может варьировать, но для большинства термостатов целесообразно не собирать более пяти чашек в одну стопку.
- Чашки с МХА инкубируются при 35±1°С в обычной атмосфере.
- Чашки с агаром МХ-П при 35±1°С в атмосфере, содержащей 4-6% СО₂ (кроме Campylobacter).

Инкубация чашек

Микроорганизмы	Питательные среды
Enterobacterales	35±1°С, обычная атмосфера, 18±2 ч
Pseudomonas spp.	35±1°С, обычная атмосфера, 18±2 ч
Stenotrophomonas maltophilia	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
Acinetobacter spp.	35±1°С, обычная атмосфера, 18±2 ч
Staphylococcus spp.	35±1°С, обычная атмосфера, 18±2 ч
Enterococcus spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 8±2 ч (24 ч для гликопептидов)
Aeromonas spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
Burkholderia pseudomallei	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч

Инкубация чашек

Микроорганизмы	Питательные среды
Стрептококки групп A, B, C и G	35±1°С, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
Стрептококки группы Viridans	35±1°С, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
Streptococcus pneumoniae	35±1°С, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
Haemophilus influenzae	35±1°С, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
Moraxella catarrhalis	35±1°С, атмосфера с 4-6% СО ₂ , 18±2 ч
Listeria monocytogenes	35±1°С, атмосфера с 4-6% СО ₂ , 18±2 ч
Pasteurella multocida	35±1°С, атмосфера с 4-6% СО ₂ , 18±2 ч
Campylobacter jejuni и coli	41±1°C, микроаэрофильные усл., 24 ч (40-48ч)
Corynebacterium spp.	35±1°С, атмосфера с 4-6% СО ₂ , 18±2 ч (40-44 ч)
Aerococcus sanguinicola и urinae	35±1°С, атмосфера с 4-6% СО ₂ , 18±2 ч (40-44 ч)
Kingella kingae	35±1°С, атмосфера с 4-6% СО ₂ , 18±2 ч (40-44 ч)
Другие привередливые бактерии	В процессе валидации

Правило 15-15-15 минут

Соблюдайте следующее правило при выполнении дискодиффузионного метода:

- Оптимально используйте инокулюм не позднее, чем через **15 минут** после приготовления и всегда не позднее 60 минут.
- Нанесите диски с антибиотиками не позднее, чем через
 15 минут после инокуляции чашек.
- Начните инкубацию не позднее, чем через 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 должен иметь форму окружности. Края зон подавления роста должны быть ровными (не зубчатыми) (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



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



КНС Триметоприм



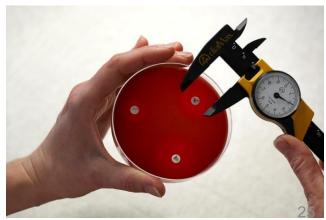
S. pneumoniae Рифампицин

Измерение зон подавления роста

 Чашку Петри с агаром МХ располагают дном кверху с закрытой крышкой над темной поверхностью, 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.
- Поворот чашки под углом 45° к рабочему столу может облегчить учет результатов при затруднительном определении края зоны.
- Измерение зон подавления роста проводится при помощи линейки, штангенциркуля или автоматических приборов для измерения зон подавления роста. Автоматические устройства должны быть калиброваны по отношению к визуальному учету.
- При формировании двойной зоны подавления роста или отдельных колоний внутри зоны следует убедиться в чистоте культуры и при необходимости повторить исследование. Если культура чистая, колонии внутри зоны следует учитывать при измерении диаметра зоны подавления роста.

Измерение зон подавления роста – исключения (1)

Микроорганизм	Антибиотик	Измерение зон подавления роста
Enterobacterales	Ампициллин Ампициллин-сульбактам Амоксициллин- клавулановая кислота	Не учитывать нежный рост в виде внутренней зоны при использовании некоторых партий агара МХ.
Enterobacterales	Мециллинам	Не учитывать изолированные колонии внутри зоны подавления роста.
E. coli	Фосфомицин	Не учитывать изолированные колонии внутри зоны подавления, измерить диаметр по наружному краю.
Proteus spp.	Любой	Не учитывать роение.
S. maltophilia и B. pseudomallei	Триметоприм- сульфаметоксазол	Если край зоны можно определить, следует игнорировать рост внутри зоны подавления и измерить диаметр зоны по идентифицируемому краю.
S. aureus	Бензилпенициллин	Тщательно осмотреть край зоны подавления роста в проходящем свете (поднести чашку к источнику света).

Измерение зон подавления роста – исключения (2)

Микроорганизм	Антибиотик	Измерение зон подавления роста
Staphylococcus spp.	Цефокситин	Тщательно осмотреть зону подавления роста для выявления колоний внутри зоны.
Enterococcus spp.	Ванкомицин	Чашку разместить дном книзу; результаты учитывать в проходящем свете (поднести чашку к источнику света).
Streptococcus spp.	Любой	Учитывать зону подавления роста и не учитывать зону гемолиза.
H. influenzae	β-лактамы	Если в зоне полного подавления роста наблюдается область роста вокруг диска, учет результатов проводится по внешнему краю зоны подавления роста.
Aeromonas spp.	Триметоприм- сульфаметоксазол	Учитывать по четкому краю зоны подавления роста и игнорировать тонкий рост внутри зоны.
Любой	Трметоприм Триметоприм- сульфаметоксазол	Не учитывать слабый рост до края диска внутри зоны с четким краем.

Интерпретация результатов

- Перед началом интерпретации результатов необходимо проверить соответствие диаметров зон подавления роста контрольных штаммов допустимым диапазонам.
- Определить клиническую категорию чувствительности (Ч, У или Р) в соответствии с Таблицами пограничных значений EUCAST (<u>www.eucast.org</u>). В качестве альтернативы можно использовать шаблон с отмеченными на нем пограничными значениями EUCAST.

Контроль качества определения чувствительности

- Мониторинг качества выполнения исследований проводится с использованием рекомендованного набора контрольных штаммов (см. <u>EUCAST QC Tables</u>).
- Для контроля ингибирующего компонента в дисках, содержащих комбинации β-лактамов и ингибиторов β-латкмаз, рекомендуется использовать специальные штаммы, продуцирующие β-лактамазы. Это должно быть частью повседневного КК. Активный компонент контролируется чувствительными контрольными штаммами.
- Контрольные штаммы с известными механизмами резистентности могут использоваться для подтверждения возможности выявления резистентности (расширенный КК, см. <u>EUCAST QC Tables</u>).
- Контрольные штаммы могут быть получены из коллекций типовых культур или коммерческих источников.

Контрольные штаммы EUCAST для повседневного контроля

Микроорганизм	Номер коллекции типовых культур	Характеристика
E. coli	ATCC 25922; NCTC 12241; CIP 76.24 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)
K. pneumoniae	ATCC BAA-2814	КРС-3, SHV-11 и TEM-1
P. aeruginosa	ATCC 27853; NCTC 12903; CIP 76.110; 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

Контрольные штаммы EUCAST для повседневного 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 70.2T; DSM 4688 CCUG 11284	Чувствительный, дикий тип

Контрольные штаммы 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; CCUG 67181	<i>mecA</i> -положительный, метициллинорезистентный (MRSA)
E. faecalis	ATCC 51299; NCTC 13379 CIP 104676; DSM 12956 CCUG 34289	Высокий уровень резистентности к аминогликозидам (HLAR), и резистентность к ванкомицину (<i>vanB</i> -положительный)
H. influenzae	ATCC 49247; NCTC 12699 CIP 104604; DSM 9999 CCUG 26214	Пониженная чувствительность к β-лактамам вследствие мутации ПСБ

Коллекции типовых культур

- ATCC American Type Culture Collection, USA
 http://www.atcc.org

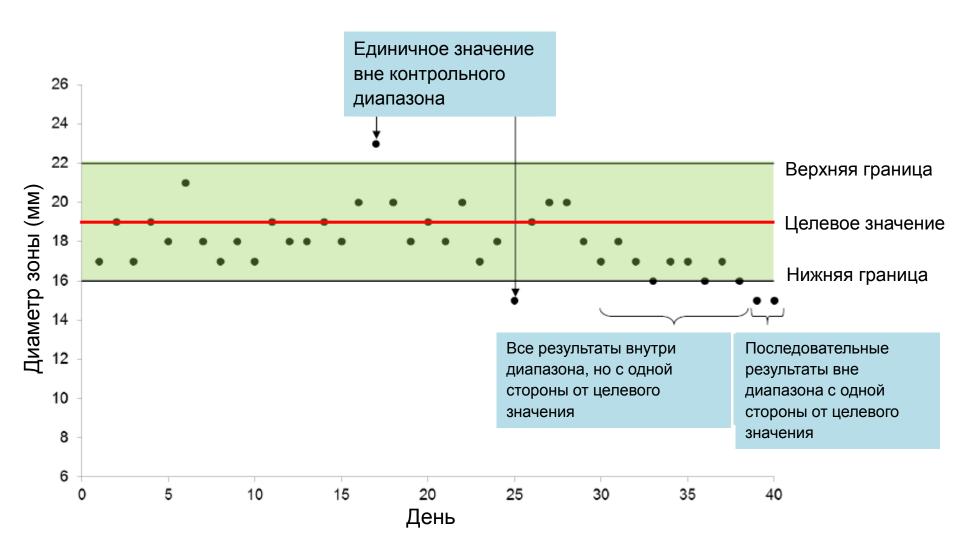
 NCTC National Collection of Type Cultures, Public Health England UK
 https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc

 CIP Collection de Institut Pasteur, France
- CIP Collection de Institut Pasteur, France
 https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collection-institut-pasteur-cip
- DSMZ Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) https://www.dsmz.de
- CCUG The Culture Collection University of Gothenburg, Sweden http://www.ccug.se
- CECT Colección Española de Cultivos Tipo, Spain http://www.cect.org

Для общей оценки качества выполнения метода используются контрольные штаммы для повседневного контроля

- Контрольные исследования следует проводить ежедневно, как минимум 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 проводится с целью выявления тенденций и стабильного отклонения диаметров зон от целевых значений.
- Если 2 и более из 20 значений находятся за пределами допустимого диапазона, необходимо выяснить причины таких 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 сообщать результаты определения чувствительности, 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 сообщения результатов определения чувствительности. 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 сообщения результатов. Может возникнуть необходимость в повторении исследований.
- Если при исследовании резистентных контрольных штаммов резистентность не выявляется нельзя сообщать результаты определения чувствительности, следует выяснить причины и повторить исследование.

Хранение и субкультивирование контрольных штаммов

- Контрольные штаммы следует хранить при температуре -70°С в бульоне с добавлением глицерина (или используя коммерческие эквиваленты) в двух экземплярах: одна пробирка для регулярного использования, другая в качестве «архива».
- Штамм из пробирки, предназначенной для регулярного использования, следует субкультивировать еженедельно на соответствующей неселективной среде; проверить чистоту культуры.
- Далее ежедневно следует делать пересевы с первой чистой субкультуры, собирая несколько колоний, чтобы избежать селекции мутантных вариантов. Только привередливые бактерии можно субкультиваровать последовательно, используя для ежедневных пересевов суточную культуру.
- Контрольные штаммы можно субкультивировать максимально в течение 6 дней. Затем следует утилизировать чашки и приготовить новую чистую чашку, взяв культуру из пробирки, хранящейся в заморозке.
- Когда содержимое пробирки для регулярного использования будет практически израсходовано, следует субкультивировать контрольный штамм из архивной пробирки и из данной субкультуры приготовить другую пробирку для регулярного использования.

Возможные источники ошибок (1)

	Хранение чашек
	Несоблюдение инструкции при приготовлении
	Вариации между различными партиями или смена поставщика агара
Питательная среда	Добавки (вариации между партиями, неправильное количество или истечение срока годности)
	рН
	Толщина слоя агара / Объем агара
	Истекший срок годности
	Не соблюдение правила «15-15-15 минут» (нанесение 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 (фон, освещение)
	Определение края зоны подавления роста

Возможные источники ошибок (2)

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

Вебсайт EUCAST

• Регулярно проверяйте вебсайт EUCAST для своевременного обновления методологии, контрольных диапазонов и пограничных значений.

www.eucast.org

 Любые комментарии и предложения присылайте, пожалуйста, по адресу erika.matuschek@escmid.org или направляйте в секретариат EUCAST (см. веб-сайт).



Европейское общество по клинической микробиологии и инфекционным болезням