|  |  |
| --- | --- |
|  | ЄВРОПЕЙСЬКИЙ КОМІТЕТ ІЗ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ |
| **Європейське товариство з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб** | |

**Визначення чутливості до антибіотиків**

**Диско-дифузійний метод EUCAST**

**Версія 13.0**

**Січень 2025**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Зміст** | | **Сторінка** | |
|  | Зміни у порівнянні із попередньою версією | | 3 |
|  | Абревіатури і термінологія | | 4 |
|  |  | |  |
| 1 | Введення | | 5 |
| 2 | Приготування і зберігання поживних середовищ | | 6 |
| 3 | Приготування бактеріальної суспензії | | 8 |
| 4 | Посів на чашки | | 10 |
| 5 | Укладання дисків з антибіотиками | | 11 |
| 6 | Інкубація чашок | | 12 |
| 7 | Огляд чашок після інкубації | | 14 |
| 8 | Вимірювання зон затримки росту та інтерпретація результатів | | 15 |
| 9 | Контроль якості | | 17 |
|  | Додаток А | | 21 |

**Зміни у порівнянні із попередньою версією ( в. 12.0)**

|  |  |
| --- | --- |
| **Розділ** | **Зміни** |
| **8.9.10** | Пояснення, що спеціальні інструкції щодо обліку ванкоміцину стосуються *Enterococcus faecalis* і *Enterococcus faecium* |
| **Таблиця 4** | Додано *Escherichia coli* NCTC 13353 |

|  |  |
| --- | --- |
| **Абревіатури та термінологія** | |
| АТСС | Американська колекція типових культур  <http://www.attc.org> |
| CCUG | Колекція культур університету Готенбурга  <http://www.ccug.se> |
| CECT | Іспанська колекція типових культур  <http://www.cect.org> |
| CFU | Колоніє утворююча одиниця |
| CIP | Колекція інституту Пастера  <http://www.pasteur.fr/public-health/crbip/collections/collection-institut-pasteur-cip>  НОВА АДРЕСА |
| DSM | Бактеріальні культури з німецької колекції мікроорганізмів та клітинних культур (DSMZ)  <https://www.dsmz.de> |
| БЛРС | Бета лактамази розширеного спектру |
| EUCAST | Європейський комітетіз визначення чутливості до антибіотиків  <http://www.eucast.org> |
| МХА | Агар Мюллера-Хінтона |
| МХА-В | Агар Мюллера-Хінтона для вибагливих мікроорганізмів (агар МХА із додаванням 5% дефібринованої конячої крові та 20 мг/д β-НАД |
| МІК | Мінімальна інгібуюча концентрація |
| MRSA | Метицилін резистентний *Staphylococcus aureus* (з генами *mecA* та *mecC*) |
| NCTC | Національна колекція типових культур  <http://phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc> НОВА АДРЕСА |
| β-НАД | β-никотинамід Аденін Динуклеотид |
| КЯ | Контроль якості |
| Фіз.розчин | 0,85% розчин натрію хлориду у воді (8,5 г/л) |
| Нічна культура | Культура бактерій інкубована протягом 16-24 год. |

**1 Введення**

Диско-дифузійний метод є одним з найстаріших і залишається найбільш поширеним методом оцінки чутливості до антибіотиків в звичайних бактеріологічних лабораторіях. Він підходить для дослідження більшості бактеріальних патогенів, в тому числі і для найбільш поширених бактерій зі складними поживними потребами. Метод є універсальним для широкого кола антимікробних препаратів і не вимагає обов'язкового використання спеціального обладнання.

Разом з кількома іншими диско-дифузійними методиками, метод EUCAST являє собою стандартизований метод, заснований на принципах, визначених у доповіді Міжнародного Колективного Дослідження Чутливості до Антибіотиків 19711 року і досвід експертних груп по всьому світу.

Граничні значення діаметра зони затримки росту у диско-дифузійному методі EUCAST відкалібровані за узгодженням із європейськими граничними значеннями, які опубліковані EUCAST і є у вільному доступі на веб-сайті EUCAST (<http://www.eucast.org>).

Як і усі методи, описана методика повинна бути точно відтворена без відхилень  
для отримання достовірних результатів.

Методологія диско-дифузійного методу EUCAST для анаеробних бактерій описана в окремому документі

(https://www.eucast.org/ast\_of\_bacteria/disk\_diffusion\_methodology).

1 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 Приготування та зберігання середовищ**

2.1 Приготуйте агар Мюлер-Хінтона (МХА) відповідно до інструкції виробника, із додатками для вибагливих мікроорганізмів як вказано у **Таблиці 1**. Приготуйте і внесіть додатки як описано в деталях на <http://www.eucast.org>.

2.2 Середовище необхідно розлить товщиною 4.0 ± 0.5 мм (приблизно 25 мл для круглої чашки діаметром 90 мм, 31 мл для круглої чашки 100 мм, 71 мл для круглої чашки 150 мм, 40 мл для квадратної чашки 100 мм). Переконайтеся, що об'єм правильний і заснований на справжніх розмірах чашки Петрі, що використовується. Розміри чашок можуть відрізнятися між виробниками.

2.3 Поверхня агару перед використанням повинна бути сухою. На поверхні агару або всередині кришки не повинно бути крапель води. При необхідності підсушить чашки або при 20-25 °C протягом ночі, або при 35 °C із знятою кришкою протягом 15 хв. Не пересушуйте чашки.

2.4 Зберігайте чашки, приготовані самостійно при 4-8 0С .

2.5 Для чашок, виготовлених самостійно, умови сушіння, зберігання та термін зберігання слід визначати як частину програми забезпечення якості лабораторії

2.6 Чашки комерційного виробництва слід зберігати відповідно до рекомендацій виробника та використовувати їх у вказаний термін придатності.

2.7 Чашки з агаром (комерційні чи виготовлені самостійно), що зберігаються в поліетиленових пакетах або герметичних контейнерах, можливо, необхідно буде просушити перед використанням (див. Розділ 2.3). Це дозволить уникнути зайвої вологи, що може спричинити проблеми з нечіткими краями зони та/або імли в межах зон.

**Таблиця 1. Поживні середовища для визначення чутливості до антибіотиків**

|  |  |
| --- | --- |
| **Організм** | **Поживне середовище** |
| *Enterobacterales* | МХА |
| *Pseudomonas* spp. | МХА |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | МХА |
| *Acinetobacter* spp. | МХА |
| *Staphylococcus* spp. | МХА |
| *Enterococcus* spp. | МХА |
| Стрептококи груп *A, B, C* та *G* | МХА-В1 |
| *Streptococcus pneumoniae* | МХА-В1 |
| Стрептококи групи Viridans | МХА-В1 |
| *Haemophilus influenzae* | МХА-В1 |
| *Moraxella catarrhalis* | МХА-В1 |
| *Listeria monocytogenes* | МХА-В1 |
| *Pasteurella multocida* | МХА-В1 |
| *Campylobacter jejuni* та *coli* | МХА-В1 (див. Додаток А) |
| *Corynebacterium* spp. | МХА-В1 |
| *Aerococcus sanguinicola* та *urinae* | МХА-В1 |
| *Kingella kingae* | МХА-В1 |
| *Aeromonas* spp. | МХА |
| *Achromobacter xylosoxidans* | МХА |
| *Vibrio* spp. | МХА |
| *Bacillus* spp. | МХА |
| *Brucella melitensis* | МХА-В1 |
| *Burkholderia pseudomallei* | МХА |

1  МХА + 5% механічно дефібринованої крові коней + 20 мг/л β-NAD

**3. Приготування інокулюму**

3.1. Використовуйте прямий метод приготування суспензії мікроорганізму із колонії у фізіологічному розчині щільністю 0,5 за стандартом мутності МакФарланд (**Таблиця 2**), що відповідає, приблизно, 1-2 x108 КУО/мл для *Escherichia coli*.

Прямий метод приготування суспензії мікроорганізму із колонії підходить для всіх організмів, в тому числі для вибагливих організмів із **Таблиці 1**.

3.2 Використовуйте стерильну петлю або ватний тампон для відбору колоній нічної культури мікроорганізму, вирощеної на неселективному середовищі. Використовуйте кілька морфологічно схожих колоній (коли це можливо) та уникайте вибору нетипового варіанту. Суспендуйте колонії у фізіологічному розчині і перемішайте до рівномірного помутніння.

3.3 Доведіть суспензію до щільності 0,5 за стандартом МакФарландом (допустима варіація 0,4-0,6) шляхом додаванням фізіологічного розчину або культури. Більш щільний інокулюм призведе до зменшення зон пригнічення, а зменшення щільності посівного матеріалу матиме протилежний ефект.

3.3.1 Рекомендується використовувати фотометричні пристрій для регулювання щільності суспензії. Фотометричний пристрій повинен бути відкалібрований за стандартом 0,5 за Мак Фарландом відповідно до інструкції заводу-виробника.

3.3.2 В якості альтернативи, щільність суспензії можна порівняти візуально із стандартом каламутності 0,5 за МакФарландом. Для полегшення порівняння, порівнюйте виготовлений зразок і стандарт на білому тлі з чорними лініями.

3.3.3 Суспензію *Streptococcus pneumoniae* готують, переважно, із кров'яного агару щільністю 0,5 за МакФарландом. Коли суспензію *Streptococcus pneumoniae* готують із шоколадного агару, щільність повинна бути 1,0 (допустима варіація 0,9-1,1) за МакФарландом.

3.4 Суспензія повинна бути оптимально використана протягом 15 хв1, але не пізніше 60 хв. від моменту приготування.

1Частина правила 15-15-15 хвилин: використовуйте суспензію інокулюму протягом 15 хвилин після приготування, нанесіть диски протягом 15 хвилин після нанесення інокулюму та поставте чашки для інкубування протягом 15 хвилин після нанесення дисків.

**Таблиця 2. Приготування стандарту щільності 0.5 за МакФарланд**

1. Додати 0,5 мл розчину ВаCl2 з концентрацією 0,048 моль/л (1,175% вага/об’єм BaCl2 х 2Н2О) до 99,5 мл розчину H2SO4 з концентрацією 0,18 моль/л (0,36 N) (1% об’єм/об’єм) і ретельно перемішати до отримання гомогенної суспензії.
2. Правильність приготування суспензії необхідно перевірити на спектрофотометрі. Поглинання при використанні кювети 1 см повинне скласти 0,08 - 0,13 при довжині хвилі 625 нм.
3. Приготовану суспензію розливають в пробірки, такого ж діаметру, як і для приготування бактеріальної суспензії. Герметично закрийте пробірки.
4. Зберігати приготовлений стандарт в темному місці при кімнатній температурі.
5. Перемішуйте стандарт мутності за допомогою вортекса безпосередньо перед використанням.
6. Поновлюйте стандарт або перевіряйте його ступінь поглинання через 6 місяців зберігання.

**4. Інокуляція чашок з агаром**

4.1. Доведіть чашки з агаром до кімнатної температури перед інокуляцією.

4.2. Оптимально використовувати приготовлену суспензію інокулюму протягом 15 хв1 після приготування. Суспензію потрібно завжди використовувати протягом 60 хв після приготування.

4.3. Занурте стерильний ватний тампон в суспензію

4.3.1 Щоб уникнути зайвої інокуляції грамнегативних бактерій, видаліть надлишки рідини, натискаючи і повертаючи тампон по внутрішній стінці пробірки.

4.3.2 Для грам позитивних бактерій не натискайте і не повертайте тампон по внутрішній стінці пробірки

4.4 Коли інокулюють кілька чашок з агаром однією і тією ж суспензією інокулюму, повторіть процедуру з розділу 4.3 для кожної чашки з агаром.

4.5 Чашки можна інокулювати тампонами в трьох напрямках або за допомогою автоматичного приладу для кругового посіву. Рівномірно розподіліть посівний матеріал по всій поверхні агару, щоб не було проміжків між штрихами.

4.5.1 Для грампозитивних бактерій слід особливо уважно стежити за тим, щоб не було розривів між штрихами

4.6 Диски на поверхню агару необхідно нанести протягом 15 хвилин1 після інокуляції агару.

Якщо засіяні чашки залишити при кімнатній температурі протягом більшого періоду часу перед застосуванням дисків, мікроорганізм може почати рости, що призведе до помилкового зменшення розмірів зон пригнічення росту.

1 Частина правила 15-15-15 хвилин: використовуйте суспензію інокулюму протягом 15 хвилин після приготування, нанесіть диски протягом 15 хвилин після нанесення інокулюму та поставте чашки для інкубування протягом 15 хвилин після нанесення диска.

**5. Нанесення дисків із антибіотиками**

5.1. Необхідні концентрації антибіотиків в дисках представлені в таблицях граничних значень та контролю якості <http://www.eucast.org/>.

5.1.1 Граничні значення діаметра зони EUCAST і критерії контролю якості дисків перевірені для 6-мм паперових дисків.

* 1. Доведіть диски до кімнатної температури перед відкриттям картриджів або контейнерів, у яких зберігаються диски. Це попередить утворення конденсату, який може призвести до швидкого псування деяких препаратів.
  2. Нанесіть диски щільно на поверхню інокульованої чашки з агаром протягом 15 хвилин після інокуляції1. Диски повинні знаходитися в тісному і рівномірному контакті з поверхнею агару і не повинні переміщуватися після їх застосування, оскільки початкова дифузія антимікробних засобів з дисків відбувається дуже швидко.
  3. Кількість дисків на одній чашці має бути обмежена, для запобігання перекривання зон пригнічення росту, а також взаємодії між антибіотиками. Дуже важливо щоб діаметр зон затримки росту міг бути виміряний. Максимальна кількість дисків на одній чашці залежить від виду мікроорганізму і обраних антибіотиків. Зазвичай 6 та 12 дисків це найбільше число на одну круглу чашку діаметром 90 та 150 мм відповідно.
     1. Для детекції індуцібельної стійкості до кліндаміцину у стафілококів і стрептококів, диски з еритроміцином і кліндаміцином слід розташувати на відстані 12-20 мм між краями дисків для стафілококів, і 12-16 мм - для стрептококів.
  4. Втрата ефективності антимікробних речовин у дисках призводить до зменшення діаметра зони інгібування та є поширеним джерелом помилок. Важливими є наступне:

5.5.1. Зберігайте диски, в тому числі в диспенсерах, в герметичних ємностях з вологостійким осушувачем і захищеними від світла (деякі агенти, включаючи метронідазол, хлорамфенікол і фторхінолони інактивуються при тривалому впливі світла).

5.5.2 Зберігайте запаси дисків відповідно до інструкцій виробника. Деякі агенти більш лабільні, ніж інші (наприклад, амоксицилін-клавуланова кислота, цефаклор та карбапенеми) і конкретні рекомендації можуть бути доступні від виробників.

5.5.3 Зберігайте робочі запаси дисків відповідно до інструкцій виробника. Після відкриття контейнерів для дисків слід використовувати диски протягом визначеного виробником часу.

5.5.4 Не допускається використання дисків після закінчення терміну придатності, зазначеного виробником.

5.5.5 Виконуйте частий контроль якості (див. Розділ 9) робочих матеріалів, щоб контролювати, що антимікробні диски не втратили потенцію під час зберігання.

1 Частина правила 15-15-15 хвилин: використовуйте суспензію інокулюму протягом 15 хвилин після приготування, нанесіть диски протягом 15 хвилин після нанесення інокулюму та поставте чашки для інкубування протягом 15 хвилин після нанесення диска.

**6. Інкубація чашок**

6.1. Переверніть чашки з агаром і переконайтесь, що диски не падають з поверхні агару. Поставте чашки інкубуватись протягом 15 хв1 після нанесення диска. Якщо чашки залишати при кімнатній температурі після нанесення дисків, попередня дифузія може призвести до помилково великих зон пригнічення росту.

6.2. Розташування чашок в термостаті може вплинути на результат через їх нерівномірне нагрівання. Ефективність термостатів відрізняється, тому контроль інкубації, включаючи відповідну кількість чашок, що інкубуються в будь-якій одній стопці, повинна бути частиною програми внутрішньо-лабораторного контролю якості. Для більшості термостатів стопка із п’яти чашок найбільш підходяща.

6.3. Інкубуйте чашки в умовах представлених в **Таблиці 3**.

6.3.1 Інкубація понад рекомендовані часові межі не повинна проводитися, оскільки це може призвести до росту в зонах пригнічення та повідомлення про ізоляти як хибно стійкі.

6.3.2 При визначенні чутливості *Enterococcus* spp до глікопептидів стійкість деяких штамів може бути невиявлена, раніше 24 год інкубації. Проте результати можна обліковувати через 16-20 год і повідомляти про будь-яку стійкість, але чашки із ізолятами, які виявляються чутливими, необхідно повторно інкубувати та повторити облік через 24 години.

1 Частина правила 15-15-15 хвилин: використовуйте суспензію інокулюму протягом 15 хвилин після приготування, нанесіть диски протягом 15 хвилин після нанесення інокулюму та поставте чашки для інкубування протягом 15 хвилин після нанесення диска.

**Таблиця 3. Умови інкубації чашок при визначення чутливості до антибіотиків**

|  |  |
| --- | --- |
| **Мікроорганізми** | **Умови інкубації** |
| *Enterobacterales* | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Pseudomonas* spp. | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Stenotrophomonas maltophilia* | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Acinetobacter* spp. | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Staphylococcus* spp. | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Enterococcus* spp. | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год (24 год для глікопептидів) |
| *Aeromonas* spp*.* | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Achromobacter xylosoxidans* | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Vibrio* spp. | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Bacillus* spp*.* | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
| *Burkholderia pseudomallei* | 35±1°С, звичайна атмосфера, 18±2 год |
|  |  |
| *Bacillus anthracis* | 35 ± 1°C звичайна атмосфера **17 ± 1 год** |
|  |  |
| Стрептококи груп A, B, C та G | 35±1°С, атмосфера із 4-6% СО2, 18±2 год |
| *Streptococcus pneumonia* | 35±1°С, атмосфера із 4-6% СО2, 18±2 год |
| Стрептококи групи Viridans | 35±1°С, атмосфера із 4-6% СО2, 18±2 год |
| *Haemophilus influenzae* | 35±1°С, атмосфера із 4-6% СО2, 18±2 год |
| *Moraxella catarrhalis* | 35±1°С, атмосфера із 4-6% СО2, 18±2 год |
| *Listeria monocytogenes* | 35±1°С, атмосфера із 4-6% СО2, 18±2 год |
| *Pasteurella multocida* | 35±1°С, атмосфера із 4-6% СО2, 18±2 год |
|  |  |
| *Brucella melitensis* | 35±1°C, атмосфера із 4-6% СО2, **48 ± 2 год** |
|  |  |
| *Campylobacter jejuni* і *С. coli* | Див. **Додаток А** |
|  |  |
| *Corynebacterium* spp. | 35±1°С, у 4-6% СО2, протягом 18±2 год. При слабкому рості ізоляту після 16-20 год інкубації слід негайно продовжити інкубацію і провести облік результатів загалом через 40-44 год |
| *Aerococcus sanguinicola* та *urinae* | 35±1°С, у 4-6% СО2, протягом 18±2 год. При слабкому рості ізоляту після 16-20 год інкубації слід негайно продовжити інкубацію і провести облік результатів загалом через 40-44 год |
| *Kingella kingae* | 35±1°С, у 4-6% СО2, протягом 18±2 год. При слабкому рості ізоляту після 16-20 год інкубації слід негайно продовжити інкубацію і провести облік результатів загалом через 40-44 год |

**7. Перегляд чашок після інкубації**.

7.1 Правильно приготовлений і посіяний штрихом інокулюм повинен привести до зливного росту.

7.1.1 Якщо можна побачити окремі колонії, то інокулюм недостатньо густий і тест повинен бути повторений

7.2. Ріст повинен бути рівномірно розподілений по чашці для отримання рівномірних круглих (не зубчастих) зон затримки росту.

7.3 Переконайтеся, що зони інгібування знаходяться в межах контролю якості (http://www.eucast.org).

**8. Вимірювання зон затримки росту та інтерпретація результатів**

8.1 Для всіх препаратів (якщо інше не вказано в розділі 8.9) край зони слід враховувати в точці повного пригнічення росту неозброєним оком тримаючи чашку приблизно на 30 см від очей. Тримати чашку слід під кутом 45 градусів до робочої поверхні, що може полегшити облік, коли краї зони важко визначити.

8.2 Облік результатів на чашках без добавок проводять через задню частину у відбитому світлі, утримуючи її над темною поверхнею

8.3. Облік результатів на чашках із добавками проводять через передню поверхню із знятою кришкою у відбитому світлі.

8.4 Не використовуйте світло, що проходить (утримання чашки над джерелом світла) або збільшувальне скло, якщо не вказано інше (див розділ 8.9).

8.5 Вимірюйте діаметри зон пригнічення з точністю до міліметра лінійкою або штангенциркулем.

8.5.1 Якщо використовується автоматичний зчитувач зон, він повинен бути відкалібрований відносно ручного методу.

8.6 Інтерпретувати діаметри зони пригнічення росту за категоріями чутливості слід за граничними значеннями у таблицях <http://www.eucast.org/>

8.7 Якщо для інтерпретації діаметрів зон використовуються шаблони, чашка поміщається поверх шаблону і зони інтерпретуються відповідно до граничних значень EUCAST, позначених на шаблоні. Переконайтеся в тому, що граничні значення, які використовуються, відповідають останній версії EUCAST. Програма для підготовки шаблонів є у вільному доступні за посиланням <http://bsac.org.uk/usceptibility/template-program>.

8.8 Кілька прикладів малюнків, на яких показано зчитування діаметрів зони затримки росту, доступні у керівництві з обліку результатів за адресою http://www.eucast.org. Цей документ також включає інструкції з обліку конкретних комбінацій організм-антимікробний засіб.

8.9. Конкретні інструкції для врахування результатів:

8.9.1 У разі подвійних зон або видимих колоній всередині зон перевіряють чистоту та, якщо необхідно, повторюють дослідження. Якщо культури чисті, колонії в зонах повинні враховуватися при вимірюванні діаметра.

8.9.2 Для триметоприму та триметоприму-сульфаметоксазолу може спостерігатися слабкий ріст біля диска за рахунок антагоністів у середовищі. Такий ріст слід ігнорувати, а діаметр зони вимірювати в більш очевидних краях зони.

Для *Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter xylosoxidans* та *Burkholderia pseudomallei* та триметоприм-сульфаметоксазолу ізолят, що демонструє будь-яку зону пригнічення ≥ граничного значення для чутливого, повинен повідомлятись як чутливий. Зауважте, що в зонах може спостерігатися значний ріст. Враховуйте відсутність зони лише якщо спостерігається ріст до диска і немає ознак зони пригнічення.

Для *Aeromonas* spp. і *Brucella melitensis* та триметоприм-сульфаметоксазолу враховуйте видимий край зони та ігноруйте помутніння або ріст у зоні інгібування. Якщо є видимий край внутрішньої зони, врахуйте зону інгібування як внутрішню зону.

8.9.3 Для *Enterobacterales* та ампіциліну, ампіцилін-сульбактаму та амоксицилін-клавуланової кислоти ігноруйте ріст, який може з’являтися у вигляді тонкої плівки, що створює внутрішню зону на деяких партіях агару Мюлера-Хінтона.

8.9.4 Для *Enterobacterales* з темоциліном, ігноруйте поодинокі колонії в зоні затримки росту.

8.9.5 Для *Enterobacterales* з мецилінамом, ігноруйте поодинокі колонії в зоні затримки росту.

8.9.6. Для *Escherichia coli* з фосфоміцином ігноруйте ізольовані колонії в зоні пригнічення росту і враховуйте зовнішній край зони

8.9.7. Для *Proteus* spp. слід ігнорувати роїння і враховувати зону пригнічення росту.

8.9.8. Для *Staphylococcus aureus* із діаметром зони затримки росту навколо бензилпеніциліну ≥ 26 мм огляньте край зони уважно через передню частини чашки, підносячи чашку до світла (прохідне світло). Ізоляти з діаметром зони інгібування яка ≥ граничного значення для «чутливий», але з гострими краями зони, слід повідомити як стійкі.

8.9.9. При використанні цефокситину для виявлення стійкості до метициліну у  
*Staphylococcus* spp., виміряйте видиму зону, і ретельно перегляньте зону при хорошому освітленні, щоб виявити колонії в межах зони пригнічення. Це може бути або контамінація або прояв гетерогенної стійкості до метициліну.

8.9.10. Для *Enterococcus faecalis* та *Enterococcus faecium* з діаметром зони затримки росту навколо ванкоміцину ≥ 12 мм, огляньте край зони через передню частину чашки розміщеної над джерелом світла (в світлі, що проходить). Нечіткі краї зони і колонії в межах зони вказують на резистентність до ванкоміцину і повинні бути досліджені додатково. Про чутливі ізоляти потрібно повідомляти через 24 год інкубації.

8.9.11. У гемолітичних стрептококів враховуйте зону затримки росту, а не гемолізу. β-гемоліз, як правило, вільний від росту, в той час як ɑ-гемоліз і ріст, як правило, збігаються. Нахиляйте чашку вперед і назад, щоб краще відрізнити гемоліз і ріст.

8.9.12. Для *H. influenzae* та бета-лактамних агентів враховуйте зовнішній край зони, де в іншому випадку чиста зона інгібування містить область росту навколо диска.

8.9.13. Для *Brucella melitensis* і рифампіцину уважно огляньте зони на наявність колоній поблизу краю зони. При обліку результатів слід враховувати колонії.

**9. Контроль якості**

9.1 Використовуйте контрольні штами **(Таблиця 4)** для моніторингу виконання тесту. Основні рекомендовані контрольні штами є типовими чутливими штамами, але стійкі штами також можуть бути використані для підтвердження того, що цей метод буде виявляти стійкість, спричинену відомим механізмом резистентності **(Розширений КЯ, Таблиця 5).** Контрольні штами можуть бути придбані з колекції культур або з комерційних джерел.

9.1.1 Для контролю інгібуючого компоненту комбінацій β-лактамів з інгібіторами рекомендуються специфічні штами, що продукують β-лактамази (**Таблиця 4**). Це має бути частиною рутинного контролю якості. Активний компонент перевіряють на чутливих штамах для контролю якості

9.2 Зберігати контрольні штами необхідно в умовах, які будуть підтримувати життєздатність мікроорганізму та його характеристики. Зберігання на кульках при -70 °С в гліцериновому бульйоні (або з використанням комерційних аналогів) є зручним методом. Необхідно зберігати по два флакони кожного контрольного штаму, один для щоденного рутинного використання, а інший як архів.

9.3 Щотижня субкультивуйте кульку з ємності для щоденного використання на відповідних неселективних середовищах і перевіряйте на чистоту. З цієї чистої культури, підготуйте по одній субкультурі на кожен день тижня. Для вибагливих організмів, які не виживають на чашках протягом п'яти-шести днів, субкультивуйте їх щодня. Контрольний штам можна культивувати протягом максимум шести днів, потім викиньте чашку та приготуйте нову чашку з замороженого флакона для щоденного використання. Коли флакон для щоденного використання вичерпаний, субкультивуйте культуру з архівного флакона та підготуйте інший флакон, для щоденного використання і субкультури.

При субкультивуванні контрольного штаму використовуйте кілька колоній, щоб уникнути селекції мутантного варіанту.

9.4 Переконайтесь, що результати контрольних штамів знаходяться в допустимих межах у таблицях КЯ EUCAST на веб-сайті <http://www.eucast.org>.

9.4.1 У таблицях КЯ EUCAST вказані діапазони та цільові значення. Повторне дослідження штамів повинно дати значення діаметру зони, випадковим чином розподілених у рекомендованих межах. Якщо кількість досліджень становить ≥10, середній діаметр зони повинен бути близьким до цільового значення (оптимально ± 1 мм від цільового значення).

9.5 Використовуйте рекомендовані звичайні контрольні штами для моніторингу якості досліджень. Використовуйте нічну культуру контрольних штамів та досліджуйте їх так само як клінічні ізоляти

Контрольні дослідження повинні проводитись і перевірятись щодня або не рідше чотирьох разів на тиждень, принаймні для антибіотиків, які є частиною рутинних наборів. Контрольні дослідження повинні бути враховані і проаналізовані перед повідомленням результатів визначення чутливості клінічних ізолятів.

9.5.1 Кожен день, коли проводяться дослідження, перевіряйте результати останніх 20 послідовних досліджень. Вивчайте результати для виявлення тенденцій до зменшення або збільшення зон вище або нижче цільового показника.

9.5.2 Якщо результати двох непослідовних досліджень знаходяться поза межами діапазону по одну сторону від цільового значення, можуть бути повідомлені результати досліджень чутливості для клінічних ізолятів, однак потрібні додаткові дослідження.

9.5.3 Якщо результати двох послідовних досліджень знаходяться поза діапазоном або якщо декілька дисків виходять за межі діапазону за один день, проведіть вивчення, перш ніж повідомити про результати визначення чутливості клінічних ізолятів. Дослідження, можливо, доведеться повторити.

9.5.4 Якщо резистентність у стійкому контрольному штамі не розпізнається, притримують результати визначення чутливості для клінічних ізолятів, вивчають випадок та повторно проводять дослідження

9.5.5 Під час вивчення можливих джерел помилок диско-дифузійного методу враховуйте проблеми пов'язані з антимікробними дисками, поживними середовищами, умовами тестування та якістю контрольних штамів.

9.6 На додаток до рутинного КЯ, необхідно перевіряти кожну нову партію агару Мюллера-Хінтон, щоб гарантувати, що всі зони знаходяться в межах діапазону. Для кожної нової партії агару також вимірюйте глибину агару, щоб переконатися, що вона знаходиться в допустимих межах.

Аміноглікозиди можуть давати неприйнятні зміни у присутності двовалентних катіонів в середовищі, тигециклін може виявити зміни вмісту магнію, триметоприм-сульфаметоксазол виявить проблеми з вмістом тиміну і тимідину, еритроміцин може виявити неприйнятний рН. Глибина агару вище або нижче допустимих меж призведе до меншого або більшого діаметра зони відповідно.

9.6.1 Високі або низькі концентрації двовалентних катіонів (Са2 +, Mg2 +) можуть бути визначені зонами інгібування аміноглікозидів з *P. aeruginosa* ATCC 27853 нижче або вище меж контролю якості відповідно.

9.6.2 Надлишок тиміну та тимідину може проявлятись через зони пригнічення триметоприму-сульфаметоксазолу та *E. faecalis* ATCC 29212 нижче меж контролю якості.

**Таблиця 4. Контрольні штамів мікроорганізмів для поточного контролю**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Організм** | **Штам** | **Характеристика** |
| *Escherichia coli* | ATCC 25922  NCTC 12241  CIP 7624  DSM 1103  CCUG 17620  CECT 434 | Чутливий, дикий тип |
| *Escherichia coli* | ATCC 35218  NCTC 11954  CIP 102181  DSM 5923  CCUG 30600  CECT 943 | TEM-1 бета-лактамаза, стійкий до ампіциліну (для контролю інгібуючого компоненту комбінованиих дисків з інгібіторами бета-лактамаз) |
| *Escherichia coli* | NCTC 13353 | CTX-M-15 та OXA-1  (для контролю інгібуючого компоненту комбінованих дисків бета лактам-інгібітор) |
| *Klebsiella pneumoniae* | ATCC 700603  NCTC 13368  CCUG 45421  CECT 7787 | Продуцент ESBL (SHV-18) (для контролю інгібуючого компоненту комбінованиих дисків з інгібіторами бета-лактамаз) |
| *Klebsiella pneumoniae* | ATCC BAA-2814 | KPC-3, SHV-11 та TEM-1 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | ATCC 27853  NCTC 12934  CIP 76110  DSM 1117  CCUG 17619  CECT 108 | Чутливий, дикий тип |
| *Staphylococcus aureus* | ATCC 29213  NCTC 12973  CIP 103429  DSM 2569  CCUG 15915  CECT 794 | Слабкий продуцент β-лактамаз |
| *Enterococcus faecalis* | ATCC 29212  NCTC 12697  CIP 103214  DSM 2570  CCUG 9997  CECT 795 | Чутливий, дикий тип |
| *Streptococcus pneumoniae* | ATCC 49619  NCTC 12977  CIP 104340  DSM 11967  CCUG 33638 | Низька стійкість до пеніциліну |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *Haemophilus influenzae* | ATCC 49766  NCTC 12975  CIP 103570  DSM 11970  CCUG 29539 | Чутливий, дикий тип |
| *Campylobacter jejuni* | ATCC 33560  NCTC 11351  CIP 702  DSM 4688  CCUG 11284 | Чутливий, дикий тип.  Для дослідження умов, див. Додаток А |

**Таблиця 5. Додатковий перелік контрольних штамів для детекції специфічних механізмів резистентності (розширений КЯ)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Організм** | **Штам** | **Характеристика** |
| *Klebsiella pneumoniae* | ATCC 700603  NCTC 13368  CCUG 45421  CECT 7787 | Продуцент ESBL (SHV-18) |
| *Staphylococcus aureus* | NCTC 12493 | *mecA*-позитивний, метицилін резистентний (MRSA) |
| *Enterococcus faecalis* | ATCC 51299  NCTC 13379  CIP 104676  DSM 12956  CCUG 34289 | Високий рівень стійкості до аміноглікозидів (HLAR) та ванкоміцину (*vanB*-позитивний) |
| *Haemophilus influenzae* | ATCC 49247  NCTC 12699  CIP 104604  DSM 9999  CCUG 26214 | Знижена чутливість до β-лактамних агентів через мутації ПЗБ |

**Додаток А**

**Диско-дифузійний метод визначення чутливості до антибіотиків *Campylobacter jejuni* та *сoli***

Необхідно дотримуватись методики (Таблиця А1) визначення чутливості *Campylobacter jejuni* та *сoli* диско-дифузійним методом відповідно до EUCAST

|  |  |
| --- | --- |
| **Таблиця А1** | **Диско дифузійний метод для *Campylobacter jejuni* та *сoli*** |
| **Поживне середовище** | Мюллер-Хінтон агар із додаванням 5% дефібринованої крові коней та 20 мг/л β-NAD (МХА-В).  Для того щоб зменшити роїння чашки із МХА-В необхідно підсушити перед інокуляцією (при 20-25°C протягом ночі або при 35°C із знятою кришкою протягом 15 хв). |
| **Інокулюм** | 0,5 за МакФарландом |
| **Інкубація** | Мікроаерофільне середовище  41 ±1 0С  24 год.  Інкубація повинна привести до зливного росту. Деякі штами *C. сoli* можуть дати недостатній ріст через 24 год. Потрібна додаткова негайна інкубація і врахування зон затримки росту проводиться через 40-48 год.  Температура інкубації 41±1 °C була обрана для створення сприятливих умови для росту *Campylobacter* spp. |
| **Облік результатів** | Враховуйте результати на чашці МХА-В через передню частину чашки із знятою кришкою у відбитому світлі. Краї повинні бути враховані у точці повної інгібіції, про що судять неозброєним оком на відстані близько 30 см від очей і під кутом 45 градусів до робочого столу |
| **Контроль якості** | *Campylobacter jejuni* АТСС 33560 |

|  |  |
| --- | --- |
|  | ЄВРОПЕЙСЬКИЙ КОМІТЕТ ІЗ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ |
| **Європейське товариство з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб** | |