|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| |  |  | | --- | --- | |  | ЄВРОПЕЙСЬКИЙ КОМІТЕТ  ІЗ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ  ДО АНТИБІОТИКІВ | | **Європейське товариство з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб** | | | Диско-дифузійний метод для анаеробних бактерій  Версія 2.0, Січень 2023 |

Диско-дифузійний метод EUCAST для обраних анаеробних бактерій\*, що швидко ростуть на агарі для вибагливих анаеробів з додаванням дефібринованої кінської крові (FAA-НВ)

\* Цей метод валідований для інкубації протягом 16-20 год **Bacteroides spp., Prevotella spp., Fusobacterium necrophorum, Clostridium perfringens та Cutibacterium acnes.** Він не може бути використаний для інших видів анаеробних бактерій чи інкубації понад 20 год.

**Зміни порівняно із попередньою версією (1.0)**

|  |  |
| --- | --- |
| **Розділ** | **Зміни** |
| Загальні | Абревіатура поживного середовища змінена з FAA на FAA-HB |
| Поживні середовища, 1с | Очікуваний термін придатності FAA-HB власного виробництва змінено з 14 до 21 дня |
| Інокуляція, 1а  Невідповідності, 1b | Нова рекомендація щодо видалення зайвої рідини з ватного тампона перед інокуляцією для *Clostridium perfringens* |
| Інокуляція, 2а  Невідповідності, 1b | Додано інформацію про те, що також особливо важливо ретельно робити посів на чашки для деяких видів *Prevotella,* які ростуть невеликими колоніями на FAA-HB |
| Невідповідності, 1а | Додано інформацію про склад комерційних чашок з FAA-HB |
| Невідповідності, 1с | Додаткова інформація про кількість доданих дисків на додану чашку |
| Таблиці КЯ | Критерії контролю якості для анаеробних штамів КЯ перенесено з цього документа до Таблиць КЯ EUCAST в. 13.0 |

Диско-дифузійний метод для

анаеробних бактерій

Версія 2.0, Січень 2023

**Поживне середовище**

1. Використовуйте Агар для Вибагливих анаеробів (FAA) із 5% механічно дефібринованої крові коней і без будь-яких інших

а. Товщина агару повинна бути 4.0 ± 0.5 mm.

1. Для приготування середовища в лабораторії, охолодіть середовище до температури 42-45°C перед додаванням крові.
2. Виготовлені у лабораторії середовища повинні зберігатись при 4-8°C на вентильованих стелажах і захищені від світла. Термін придатності повинен бути визначений як частина лабораторної програми забезпечення якості, але можна очікувати мінімальний термін зберігання 21 день.
3. Комерційно виготовлені середовища повинні зберігатись відповідно до рекомендацій виробника, захищеними від світла та до закінчення терміну придатності.
4. Чашки із середовище FAA необхідно підсушити перед інокуляцією щоб уникнути надлишку вологи, що може призвести до нечітких країв зон, роїння та/або імли всередині зон. Може бути застосована одна із наступних процедур:
5. Підсушіть при 20-25°C протягом ночі або
6. Підсушіть при 35°C, з піднятою кришкою протягом 15 хв. Перед цим чашки необхідно довести до кімнатної температури.
7. Для чашок, які зберігаються в пластикових пакетах, може знадобитися спочатку процедура відповідно до (1), а потім (2).
8. Непотрібно відновлювати чашки із середовищем FAA в анаеробних умовах перед використанням.

**Приготування інокулюму**

1. Використовуйте стерильну петлю або ватний тампон, щоб відібрати колонії з нічної анаеробної культури на неселективних середовищах. Використовуйте кілька морфологічно схожих колоній.

2. Суспендують колонії в 0,85% фізіологічному розчині та перемішуйте до рівномірного помутніння.

3. Відрегулюйте щільність суспензії посівного матеріалу до 1,0 (0,9-1,1) за McFarland, додавши фізіологічний розчин або більше бактерій. Рекомендується використовувати фотометричний прилад.

4. Використовуйте суспензію посівного матеріалу **протягом 15 хвилин** після приготування.

Інокуляція чашок з агаром

1. Змочіть стерильний ватний тампон у суспензії 1.0 за McFarland.

а. Для *Bacteroides* spp. та *Clostridium perfringens* видаліть надлишок рідини, повернувши тампон по внутрішній стороні пробірки, щоб уникнути надмірної інокуляції.

2. Рівномірно розподіліть посівний матеріал по всій поверхні агару, переконавшись, що між смугами немає проміжків.

а. Це особливо важливо для видів, які утворюють невеликі колонії на агарі FAA-НВ, таких як *Cutibacterium acnes* та деяких видів *Prevotella* spp.

Правильно засіяна чашка матиме на поверхні зливний газон із рівномірно круглими зонами інгібування.

Диско-дифузійний метод для

анаеробних бактерій

Версія 2.0, Січень 2023

Нанесення дисків з антибіотиками

1. Використовуйте рекомендований EUCAST **щодо** вміст**у** антибіотика у диску, як зазначено в [Таблицях граничнх значень](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints)  чи [Таблицях контролю якості](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/quality_control/).

2. Перш ніж відкривати картриджі або контейнери, дайте дискам нагрітися до кімнатної температури.

3. Нанесіть диски протягом 15 хвилин після інокуляції.

а. Диски повинні тісно та міцно прилягати до поверхні агару і не можна переміщати диски після їх нанесення.

б. Щоб уникнути перекриття зон, кількість дисків на чашці має бути обмежена. Оптимально використовувати не більше трьох дисків на круглій чашці діаметром 90 мм (чотири диска можна використовувати для *Bacteroides* spp.).

Інкубація чашок

1. Переверніть чашки та переконайтеся, що диски не впали з поверхні агару. Поставте у термостат протягом 15 хвилин після заснанесення тосування дисків.

2. Інкубуйте чашки з агаром FAA в анаеробному середовищі при 35-37°C протягом 16-20 год.

а. Анаеробні умови можуть бути досягнуті або у анаеробній робочій станції, або в ємностях з анаеробними газогенеруючими пакетами або газогенеруючою системою, як от Anoxomat.

б. Тривала інкубація (понад 20 год) не допускається, оскільки це вплине на розміри зони та призведе до недійсності критеріїв інтерпретації.

Облік зон затримки росту

1. Правильний інокулят повинен привести до утворення росту у вигляді зливного газону, рівномірно розподіленого по поверхні агару. Якщо ріст незливний, дослідження необхідно повторити, або можна використовувати метод MIК.

2. Огляд чашок проводьте спереду зі знятою кришкою та у відбитому світлі.

3. Зчитуйте краї зони в точці повного гальмування, дивлячись з неозброєним оком, тримаючи чашку приблизно на 30 см від очей під кутом 45 градусів до робочого столу.

4. Виміряйте діаметри зони гальмування з точністю до міліметра за допомогою лінійки або штангенциркуля.

а. Якщо в зоні спостерігається імла, врахуйте найбільш очевидний край зони. Нахиліть чашку до себе, щоб краще визначити очевидний край зони.

б. У разі подвійних зон врахуйте край внутрішньої зони.

c. Ігноруйте гемоліз і роїння під час обліку зон.

5. Слід враховувати ізольовані колонії в межах зони інгібування. Для кліндаміцину особливо важливо ретельно досліджувати зони на наявність колоній, що ростуть всередині зони.

6. Зображення з прикладами обліку доступні в [Посібнику щодо диско-дифузійного методу для анаеробних бактерій на FAA-HB](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Disk_diffusion_Anaerobes_Reading_Guide_v_2.0_2023.pdf)

Диско-дифузійний метод для

анаеробних бактерій

Версія 2.0, Січень 2023

Контроль якості

1. Виконуйте контроль якості (КЯ) під час кожного дослідження. Використовуйте нічну культуру штаму для КЯ та дотримуйтесь тієї ж процедури дослідження, що й для клінічних ізолятів.

а. Використовуйте *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 і *Clostridium perfringens* ATCC 13124 для контролю ефективності дослідження. Щоб дізнатися про діапазони та цільові значення КЯ, див. таблицю КЯ EUCAST.

б. Використовуйте *Clostridium perfringens* DSM 25589 з диском метронідазолу 5 мкг, щоб контролювати анаеробну атмосферу. Було показано, що ця комбінація є чутливим індикатором анаеробної атмосфери. Недостатня анаеробність може вплинути на ріст і результати дослідження щодо визначення чутливості анаеробних бактерій. Критерії інтерпретації див. таблицю КЯ EUCAST.

i Особливої уваги вимагає анаеробна атмосфера робочих місць. Потрібне регулярне обслуговування та технічний контроль.

Можливі невідповідності та їх усунення

1. Може бути одна або кілька причин, чому результати контролю якості виходять за межі діапазону. Для забезпечення достовірних результатів потрібне суворе дотримання протоколу. Інструкція з усунення невідповідностей:

1. Поживне середовище
2. Чи зберігаються та сушать чашки з агаром FAA згідно з наведеними вище інструкціями?
3. Чи є товщина агару 4.0 ± 0.5 мм? Цільова товщина агару 4.0 мм та ± 0.5 мм дозволяє врахувати випадкові, але не систематичні відхилення.
4. Чи готові комерційні чашки із FAA-HB відповідно до рекомендацій EUCAST із 5% механічно дефібринованої кінської крові як єдиної добавки?
5. Посів чашки
6. Переконайтеся, що посівний матеріал рівномірно розподілений по всій поверхні агару, щоб не було проміжків між смугами.

1. Це особливо важливо для видів, які ростуть невеликими колоніями на агарі FAA-НВ, таких як *Cutibacterium acnes* та *Prevotella* spp.

1. Для Bacteroides spp. та *Clostridium perfringes*, переконайтеся, що ви видалили зайву рідину, повернувши тампон по внутрішній стороні пробірки, щоб уникнути надмірної інокуляції.
2. Диски з антибіотиками
3. Обмежте кількість дисків на поверхні агару, щоб забезпечити негальмований ріст і уникнути перекриття зон. Для більшості видів і протимікробних засобів три диски можна використовувати на 90-мм круглій чашці, але для деяких ізолятів це може бути лише два диски на чашку.

Диско-дифузійний метод для

анаеробних бактерій

Версія 2.0, Січень 2023

1. Перед відкриттям картриджів дайте дискам нагрітися до кімнатної температури та дотримуйтесь рекомендацій щодо

зберігання дисків.

1. Інкубація
2. Регулярно перевіряйте анаеробну атмосферу (незалежно від того, як вона створений).
3. Анаеробна атмосфера робочих місць вимагає регулярного обслуговування та технічного контролю. На атмосферу та температуру може впливати частота відкриття системи для завантаження та вивантаження чашок, а також кількість чашок на робочому місці..
4. Використовуючи спеціальні ємночті для анаеробної інкубації, переконайтеся, що вони цілі.
5. Граничні значення EUCAST та критерії КЯ для диско-дифузійного методу для анаеробних бактерій на агарі FAA валідовані тільки для інкубації протягом 16-20 год.

1. Тривала інкубація не допускається, оскільки це значно вплине на розміри зони.

1. Облік зон
2. Обов’язково дотримуйтесь інструкцій щодо анаеробів, перерахованих вище. Зображення з прикладами доступні в Посібнику з обліку для диско-дифузійного методу для анаеробних бактерій на агарі FAA-НВ.

Диско-дифузійний метод для

анаеробних бактерій

Версія 1.0, Січень 2022

**Експериментальні критерії КЯ EUCAST для диско-дифузійного методу EUCAST на Агарі для Вибагливих Анаеробів (FAA)**

Bacteroides fragilis **ATCC 25285**

(NCTC 9343, DSM 2151, CCUG 4856T)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Антимікробний препарат | Вміст у диску  (мкг) | Діаметр зони затримки росту (мм) | |
| Цільове значення[[1]](#footnote-1) | Діапазон1 |
| Піперацилін-тазобактам[[2]](#footnote-2) | 30-6 | 32 | 29-35 |
| Меропенем | 10 | 35-36 | 32-39 |
| Кліндаміцин | 2 | 26 | 23-29 |
| Метронідазол | 5 | 32-33 | 29-36 |

Clostridium perfringens **ATCC 13124**

(NCTC 8237, CIP 103409, DSM 756, CCUG 1795T, CECT 376 T)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Антимікробний препарат | Вміст у диску  (мкг) | Діаметр зони затримки росту (мм) | |
| Цільове значення[[3]](#footnote-3) | Діапазон1 |
| Бензилпеніцилін | 1 одиниця | 26 | 23-29 |
| Піперацилін-тазобактам[[4]](#footnote-4) | 30-6 | 33 | 30-36 |
| Меропенем | 10 | 37 | 34-40 |
| Ванкоміцин | 5 | 17 | 14-20 |
| Кліндаміцин | 2 | 23 | 20-26 |
| Метронідазол | 5 | 23 | 20-26 |

1. В таблиця КЯ EUCAST, перераховані як діапазони, так і цільові значення. Повторне тестування штамів контролю якості EUCAST повинно давати значення діаметра окремих зон, випадковим чином розподілених у межах рекомендованих діапазонів. Якщо кількість тестів >10, середній діаметр зони повинен бути близьким до цільового значення (оптимально ± 1 мм від цілі).
2. Для контролю інгібуючого компонента див. Рутинний контроль якості комбінацій інгібіторів з бета-лактамами у таблицях контролю якості EUCAST (https://www.eucast.org/ast\_of\_bacteria/quality\_control/).

Тест за методикою для невибагливі організмів.

Контроль анаеробних умов для дискодифузійного методу EUCAST із використанням Агару для Вибагливих Анаеробів (FAA)

Clostridium perfringens **DSM 25589**

(CCUG 75076)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Антимікробний препарат | Вміст у диску  (мкг) | Граничне значення1 (мм) |
| Metronidazole | 5 | <25 |

Діаметр зони <25 мм свідчить про недостатню анаеробність. Це може вплинути на ріст

і результати тесту на чутливість анаеробних бактерій

1. Діаметр зони <25 мм свідчить про недостатню анаеробність. Це може вплинути на ріст

   і результати визначення чутливості анаеробних бактерій [↑](#footnote-ref-1)
2. [↑](#footnote-ref-2)
3. [↑](#footnote-ref-3)
4. [↑](#footnote-ref-4)