|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| |  |  | | --- | --- | |  | ЄВРОПЕЙСЬКИЙ КОМІТЕТ  ІЗ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ  ДО АНТИБІОТИКІВ | | **Європейське товариство з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб** | | | | Диско-дифузійний метод для анаеробних бактерій  Версія 1.0, Січень 2022 |

Диско-дифузійний метод EUCAST та експериментальні критерії КЯ для обраних анаеробних бактерій, що швидко ростуть на агарі для вибагливих анаеробів (FAA)

\* 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.

**Поживне середовище**

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

1. Товщина агару повинна бути 4.0 ± 0.5 mm.
2. Для приготування середовища в лабораторії, охолодіть середовище до температури 42-45°C перед додаванням крові.
3. 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, що середовище буде придатне мінімум 14 днів.
4. Комерційно виготовлені середовища повинні зберігатись відповідно до рекомендацій виробника, захищеними від світла та до закінчення терміну придатності.
5. Чашки із середовищем 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:

1. Підсушіть при 20-25°C протягом ночі або
2. Підсушіть при 35°C, з піднятою кришкою протягом 15 хв. Перед цим чашки необхідно довести до кімнатної температури.
3. Для чашок, які зберігаються в пластикових пакетах, може знадобитися спочатку процедура відповідно до (1), а потім (2).
4. 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. Суспендуйте 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.

Диско-дифузійний метод для

анаеробних бактерій

Версія 1.0, Січень 2022

Інокуляція чашок з агаром

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

а. Для *Bacteroides* spp. 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 штрихами немає проміжків.

а. Це особливо важливо для видів, які утворюють невеликі колонії на агарі FAA, таких як *Cutibacterium acnes*.

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

Нанесення дисків з антибіотиками

1. Використовуйте рекомендований EUCAST вміст антибіотика у диску, як зазначено в таблицях контролю якості (КЯ) в кінці цього документа.

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 нанесення 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 повної затримки росту, дивлячись неозброєним оком, тримаючи чашку приблизно на 30 см від очей під кутом 45 градусів до робочого столу.

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

а. Якщо в зоні спостерігається димка, 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.

Диско-дифузійний метод для

анаеробних бактерій

Версія 1.0, Січень 2022

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

6. Зображення з прикладами обліку доступні в Керівництві з обліку диско-дифузійного методу для анаеробних бактерій на середовищі FAA.

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 нижче.

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. у таблиці нижче.

і. 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 підсушуються 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. Посів на чашки
5. Переконайтеся, що посівний матеріал рівномірно розподілений по всій поверхні агару, щоб не було проміжків між штрихами.

І. Це особливо важливо для видів, які ростуть невеликими колоніями на агарі FAA, таких як *Cutibacterium acnes*.

1. Для Bacteroides spp., 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 не гальмувати ріст і уникнути перекриття зон. Для більшості видів і протимікробних засобів можна використовувати три диски на круглій чашці діаметром 90 мм.
4. Перед відкриттям картриджів дайте дискам нагрітися до кімнатної температури та дотримуйтесь рекомендацій щодо зберігання дисків.

Диско-дифузійний метод для

анаеробних бактерій

Версія 1.0, Січень 2022

1. Інкубація
2. Регулярно перевіряйте анаеробну атмосферу (незалежно від того, як вона створена).
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 ємності 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 Керівництві з обліку для диско-дифузійного методу для анаеробних бактерій на агарі FAA.

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 диско-дифузійного методу EUCAST із використанням Агару для Вибагливих Анаеробів (FAA)

Clostridium perfringens **DSM 25589**

(CCUG 75076)

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

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)