

EUCAST

ЕВРОПЕЙСКИЙ КОМИТЕТ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Европейское общество по клинической микробиологии и инфекционным болезням

Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Диско-диффузионный метод EUCAST

Версия 6.0

Январь 2017

Содержание		Страница
	Изменения и дополнения	
	Список сокращений и терминология	
1	Введение	6
2	Приготовление и хранение питательной среды	7
3	Приготовление инокулюма	9
4	Инокуляция чашек с агаром	11
5	Нанесение дисков с антибиотиками	12
6	Инкубация чашек	13
7	Осмотр чашек после инкубации	14
8	Измерение зон подавления роста и интерпретация результатов	15
9	Контроль качества	17
	Приложение А	

Изменения и по сравнению с предыдущей версией (5.0)

Версия	Изменения и дополнения
2.2	Добавлена информация о размерах чашек Петри.
2.3	Добавлена информация о подсушивании чашек с агаром.
2.4	Изменены рекомендации по условиям хранения чашек с агаром, приготовленным в лаборатории.
2.7	Внесены уточнения, касающиеся подсушивания чашек с агаром.
Таблица 1	Добавлены рекомендации по определению чувствительности <i>Aerococcus sanguinicola</i> и <i>urinae</i> , <i>Kingella kingae</i> .
3.2, 3.3	Добавлена информация по приготовлению инокулюма.
3.3.2	Разъяснения по использованию стандарта 0,5 по МакФарланду
3.4	Добавлено резюме по использованию правила 15-15-15 минут (см. Примечание 1).
Таблица 2	Удалена информация о стандартах МакФарланда коммерческого производства.
4.1	Добавлена информация по обращению с чашками со средой перед инокуляцией.
4.3, 4.3.1, 4.3.2	Добавлены рекомендации по инокуляции чашек при исследовании грамотрицательных и грамположительных бактерий.
4.4	Добавлены рекомендации по инокуляции нескольких чашек одной суспензией.
4.5, 4.5.1	Добавлены рекомендации по технике инокуляции.
4.6	Добавлено резюме по использованию правила 15-15-15 минут (см. Примечание 1).
5.3	Добавлено уточнение по ограничению времени на этапе аппликации дисков с антибиотиками. Добавлено резюме по использованию правила 15-15-15 минут (см. Примечание 2).
5.5.2, 5.5.3, 5.5.5	Добавлена информация по обращению и хранению дисков с антибиотиками.
6.1	Добавлено резюме по использованию правила 15-15-15 минут (см. Примечание 1) и рекомендации по переворачиванию чашек Петри.
6.2	Добавлена информация по расположению чашек Петри в термостате.
6.3.1	Дано разъяснение по времени инкубации.
Таблица 3	Уточнено время продолженной инкубации при исследовании <i>Corynebacterium</i> spp.
Таблица 3	Добавлены рекомендации по определению чувствительности <i>Aerococcus sanguinicola</i> и <i>urinae</i> , <i>Kingella kingae</i> .
8.5, 8.5.1	Дано разъяснение по учету зон подавления роста и использованию автоматических систем для учета зон подавления роста.
8.8	Добавлена информация о Руководстве EUCAST по учету результатов.
8.9.1	Дано разъяснение по учету зон подавления роста при образовании двойных зон или наличия изолированных колоний внутри зоны.
8.9.2	Дано разъяснение по учету зоны подавления роста при определении чувствительности <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> к триметоприму-сульфаметоксазолу.
8.9.3	Добавлены инструкции по учету результатов определения чувствительности Enterobacteriaceae к ампициллину-сульбактаму и амоксициллину-клавулановой кислоте.
8.9.6	Обновлены инструкции по учету результатов определения чувствительности к бензилпенициллину.

Список сокращений

ATCC	American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур) http://www.atcc.org
CCUG	Culture Collection University of Göteborg (Коллекция Культур Университета Гетеборга) http://www.ccug.se
CECT	Colecti3n Espa1ola de Cultivos Tipo (Коллекция Испанских Типовых Культур) http://www.cect.org
CIP	Collection de Institut Pasteur (Коллекция Института Пастера) http://www.cabri.org/CABRI/srs-doc/cip_bact.info.html
DSM	Bacterial cultures from Deutsche Stammsammlung f3r Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) have DSM numbers (Бактериальные культуры из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) имеют номера DSM) http://www.dsmz.de/index.htm
ESBL	Extended spectrum β -lactamase (β -лактамаза расширенного спектра)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам) http://www.eucast.org
MRSA	Methicillin resistant Staphylococcus aureus (with <i>mecA</i> or <i>mecC</i> gene) (Метициллинорезистентный золотистый стафилококк (вследствие наличия генов <i>mecA</i> или <i>mecC</i>))
NCTC	National Collection of Type Cultures (Национальная коллекция типовых культур) http://www.hpacultures.org.uk
β -НАД	β -никотинамидадениндинуклеотид
Изотонический раствор	Раствор 0,85% NaCl в воде (8,5 г/л)
МХ	Агар Мюллера-Хинтон
МХ-П	Агар Мюллера-Хинтон для микроорганизмов со сложными питательными потребностями (МХА с добавлением 5% дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β -NAD)

Диско-диффузионный метод определения чувствительности к антибиотикам, будучи одним из старейших, до настоящего времени остается наиболее распространенным методом в обычных бактериологических лабораториях. Метод подходит для исследования большинства бактериальных патогенов, в том числе наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями. Метод является универсальным для широкого круга антимикробных препаратов и не требует использования специального оборудования. Предлагаемый ниже вариант диско-диффузионного метода стандартизирован EUCAST.

Наряду с некоторыми другими технологиями выполнения диско-диффузионного метода, метод EUCAST является стандартизированным методом, основанным на принципах, изложенных в отчете о Международном совместном исследовании по определению чувствительности к антибиотикам, 1972 (International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing, 1972), и на опыте работы экспертных групп во всем мире.

Пограничные значения диаметров зон подавления роста калиброваны по отношению к гармонизированным европейским пограничным значениям, которые опубликованы EUCAST и расположены в свободном доступе на сайте <http://www.eucast.org>.

Для получения достоверных результатов, необходимо четко следовать описанной методике без каких-либо отступлений.

2	Приготовление и хранение питательной среды
2.1	Приготовить агар Мюллера-Хинтон в соответствии с инструкцией производителя, для привередливых микроорганизмов – с добавками, указанными в таблице 1 . Детальное описание приготовления МХ-П (с добавлением лошадиной крови и β-НАД) находится на сайте http://www.eucast.org .
2.2	Толщина агара должна составлять 4±0,5 мм (что приблизительно соответствует 25 мл среды на круглую чашку Петри диаметром 90 мм, 31 мл на круглую чашку Петри диаметром 100 мм, 71 мл на круглую чашку Петри диаметром 150 мм, 40 мл на квадратную чашку Петри размером 100x100 мм). Так как размеры чашек Петри у разных производителей могут варьировать, необходимо рассчитать требуемый объем среды, исходя из истинных размеров используемых чашек Петри.
2.3	Поверхность агара перед использованием должна быть сухой. На поверхности среды или внутренней поверхности крышки не должно быть видимых капель влаги. При необходимости следует подсушить чашки при 20-25°C в течение 16-18 ч или при 35°C с открытой крышкой в течение 15 минут. Нельзя пересушивать агар.
2.4	Хранить среды, приготовленные в лаборатории, необходимо при 4-8°C.
2.5	Если среды готовятся непосредственно в лаборатории, время подсушивания агара, условия хранения и срок годности должны быть описаны в программе внутрилабораторного контроля качества.
2.6	Коммерческие готовые среды должны храниться в соответствии с условиями, указанными в прилагаемой инструкции и использованы в течение указанного срока годности.
2.7	Чашки с агаром (приготовленные, как в коммерческих условиях, так и непосредственно в лаборатории), которые хранятся в плотно закрытых контейнерах или пластиковых пакетах, необходимо подсушить перед использованием (см. раздел 2.3), так как при высокой влажности поверхности среды возможно формирование нечеткого края зоны подавления роста.

Таблица 1		Питательные среды для определения чувствительности к антибиотикам	
Микроорганизм		Питательная среда	
Enterobacteriaceae		МХА	
<i>Pseudomonas</i> spp.		МХА	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		МХА	
<i>Acinetobacter</i> spp.		МХА	
<i>Staphylococcus</i> spp.		МХА	
<i>Enterococcus</i> spp.		МХА	
Стрептококки групп А, В, С и G		МХА-П ¹	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		МХА-П ¹	
Стрептококки группы Viridans		МХА-П ¹	
<i>Haemophilus influenzae</i>		МХА-П ¹	
<i>Moraxella catarrhalis</i>		МХА-П ¹	
<i>Listeria monocytogenes</i>		МХА-П ¹	
<i>Pasteurella multocida</i>		МХА-П ¹	
<i>Campylobacter jejuni</i> и <i>coli</i>		МХА-П ¹ (См. Приложение А)	
<i>Corynebacterium</i> spp.		МХА-П ¹	
<i>Aerococcus sanguinicola</i> и <i>urinae</i>		МХА-П ¹	
<i>Kingella kingae</i>		МХА-П ¹	

¹ МХА с добавлением 5% механически дефибрированной лошадиной крови и 20 мг/л β-NAD.

3	Приготовление инокулюма
3.1	<p>Для приготовления инокулюма используется метод прямого суспендирования колоний в стерильном изотоническом растворе до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда (Таблица 2), что приблизительно соответствует нагрузке $1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл (для <i>Escherichia coli</i>).</p> <p>Метод прямого суспендирования колоний может применяться для всех микроорганизмов, включая микроорганизмы со сложными питательными потребностями, перечисленными в Таблице 1.</p>
3.2	<p>Для этого стерильной бактериологической петлей или ватным тампоном необходимо собрать несколько (если возможно) морфологически схожих колоний чистой 18-24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде, чтобы избежать отбора атипичных вариантов, и суспендировать полученный материал в стерильном изотоническом растворе.</p>
3.3	<p>Необходимо довести плотность бактериальной суспензии строго до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда путем добавления изотонического раствора или бактериальной массы. Использование суспензии более высокой или низкой плотности может приводить к формированию зоны подавления роста меньшего или большего диаметра, соответственно.</p>
3.3.1	<p>Для измерения концентрации суспензии рекомендуется использовать фотометрические устройства, калиброванные по стандартам мутности 0,5 по МакФарланду в соответствии с инструкцией производителя.</p>
3.3.2	<p>Плотность суспензии также может быть определена путем визуального сравнения со стандартом мутности 0,5 по МакФарланду. Сравнение плотности тестируемой суспензии и стандарта должно проводиться на белом фоне с черными линиями.</p>
3.3.3	<p>Для приготовления суспензии <i>Streptococcus pneumoniae</i> предпочтительно использовать колонии, выросшие на кровяном агаре. При необходимости использования культуры, выросшей на шоколадном агаре, плотность инокулюма должна быть доведена до 1,0 по стандарту мутности МакФарланда.</p>
3.4	<p>Суспензия должна быть использована в течение 15 минут¹ оптимально, но не позднее 60 минут после приготовления.</p>

¹ Часть правила 15-15-15 минут: необходимо инокулировать суспензию микроорганизмов не позднее, чем через 15 минут после приготовления, нанести диски на инокулированную чашку Петри не позднее, чем через 15 минут после инокуляции и начать инкубацию чашек Петри не позднее, чем через 15 минут после аппликации дисков.

Таблица 2	Приготовление стандарта мутности 0,5 по МакФарланду
1	Добавить 0,5 мл раствора BaCl ₂ с концентрацией 0,048 моль/л (1,175% раствор BaCl ₂ x 2H ₂ O) к 99,5 мл раствора H ₂ SO ₄ с концентрацией 0,18 моль/л (0,36 N) (1% v/v) и тщательно перемешать до получения гомогенной суспензии.
2	Правильность приготовления суспензии необходимо проверить на спектрофотометре. Поглощение при использовании кюветы 1 см должно составить 0,08 – 0,13 при длине волны 625 нм.
3	Приготовленную суспензию необходимо разлить в герметично закрывающиеся пробирки такого же диаметра, как и используемые для приготовления бактериальной суспензии. Закрывать пробирки герметично.
4	Хранить приготовленный стандарт необходимо в темноте при комнатной температуре.
5	Непосредственно перед использованием приготовленный стандарт необходимо тщательно встряхивать на вортексе.
6	Стандарт мутности необходимо обновлять или проверять его оптическую плотность после 6 месяцев хранения.

4	Инокуляция чашек с агаром
4.1	Перед инокуляцией чашек необходимо убедиться, что чашки с агаром имеют комнатную температуру.
4.2	Бактериальную суспензию следует нанести на агар не позже, чем через 15 минут, и всегда – не позже чем через 60 минут после ее приготовления.
4.3	Погрузить стерильный ватный тампон в суспензию.
4.3.1	При исследовании грамотрицательных бактерий необходимо удалить избыток суспензии, отжимая тампон о внутренние стенки пробирки, чтобы избежать нанесения избыточного количества инокулюма.
4.3.2	При исследовании грамположительных бактерий отжимать тампон о внутренние стенки пробирки не следует.
4.4	Если нужно инокулировать несколько чашек с агаром одной и той же суспензией, следует повторить шаги, описанные в пункте 4.3 для каждой чашки.
4.5	Нанесение инокулюма может быть выполнено тампоном штриховыми движениями в трех направлениях или при помощи автоматического инокулятора. Инокулюм следует наносить равномерно штриховыми движениями на всю поверхность агара таким образом, чтобы штрихи плотно прилегали друг к другу.
4.5.1	При нанесении инокулюма грамположительных бактерий необходимо особенно тщательно следить за тем, чтобы между штрихами не оставалось свободного пространства.
4.6	Диски на поверхность агара необходимо нанести не позднее, чем через 15 минут ¹ после инокуляции агара. Длительное пребывание инокулированных чашек при комнатной температуре может привести к началу роста бактериальной культуры и ложному уменьшению зоны подавления роста.

¹ Часть правила 15-15-15 минут: необходимо инокулировать суспензию микроорганизмов не позднее, чем через 15 минут после приготовления, наложить диски на инокулированную чашку Петри не позднее, чем через 15 минут после инокуляции и начать инкубацию чашек Петри не позднее, чем через 15 минут после аппликации дисков.

5	Нанесение дисков с антибиотиками
5.1	Требуемые концентрации антибиотиков в дисках представлены в таблицах по контролю качества http://www.eucast.org .
5.2	Не следует открывать контейнеры или картриджи с дисками до достижения ими комнатной температуры. Это позволит предотвратить образования конденсата на дисках, что может привести к снижению активности некоторых антибиотиков.
5.3	Диски с антибиотиками должны быть нанесены не позднее, чем через 15 минут ¹ после инокуляции чашек с агаром. Контакт диска с поверхностью агара должен быть плотным и полным. Нельзя перемещать диски после их нанесения, так как диффузия антибиотика в агар начинается очень быстро.
5.4	Количество дисков на одной чашке Петри должно быть ограниченным, для предотвращения перекрытия зон подавления роста и взаимодействия между антибиотиками. Максимальное количество дисков на одной чашке Петри зависит от вида микроорганизма и исследуемых антибиотиков. Обычно на одну чашку диаметром 90 мм следует помещать не более 6 дисков, а на чашку диаметром 150 мм – не более 12 дисков.
5.4.1	Для выявления индуцибельной устойчивости к клиндамицину у стафилококков и стрептококков, диски с эритромицином и клиндамицином следует расположить на расстоянии 12-20 мм между краями дисков для стафилококков, и 12-16 мм – для стрептококков.
5.5	Снижение активности (содержания) АМП в дисках приводит к уменьшению диаметра зон подавления роста, что является одной из самых распространенных ошибок. При хранении дисков необходимо соблюдать следующие правила:
5.5.1	Хранить диски (включая диспенсеры с дисками) следует в плотно закрытых сухих контейнерах, защищенных от действия света (некоторые препараты, включая метронидазол, хлорамфеникол, и фторхинолоны, инактивируются при длительном воздействии света).
5.5.2	Основные партии дисков следует хранить в соответствии с инструкциями производителя. Некоторые антимикробные препараты являются менее стабильными, чем другие (например, амоксициллин-клавулановая кислота, цефаклор, карбапенемы), поэтому производителем могут быть предоставлены особые инструкции.
5.5.3	Рабочие партии дисков следует хранить в соответствии с инструкциями производителя. После вскрытия упаковки диски должны быть использованы в течение срока, указанного производителем.
5.5.4	Не допускается использование дисков после истечения срока годности, указанного производителем.
5.5.5	Процедуру контроля качества необходимо выполнять регулярно (см. Раздел 9). С целью контроля активности дисков во время хранения при выполнении процедуры контроля качества необходимо использовать наборы дисков, предназначенные для повседневной работы.

¹ Часть правила 15-15-15 минут: необходимо инокулировать суспензию микроорганизмов не позднее, чем через 15 минут после приготовления, наложить диски на инокулированную чашку Петри не позднее, чем через 15 минут после инокуляции и начать инкубацию чашек Петри не позднее, чем через 15 минут после аппликации дисков.

6	Инкубация
6.1	Перед началом инкубации необходимо перевернуть чашки вверх дном и убедиться, что диски не падают с поверхности агара. Чашки Петри должны быть помещены в термостат не позднее, чем через 15 минут ¹ после нанесения дисков. Пре-диффузия АМП в агар в случае длительного нахождения чашек при комнатной температуре после нанесения дисков может быть причиной ошибки из-за формирования зон подавления роста большего диаметра.
6.2	Расположение чашек Петри в термостате (в частности, количество чашек в одной стопке) может привести к их неравномерному нагреву. Учитывая разную степень точности работы термостатов, контроль этого этапа исследования, включая количество чашек в каждой стопке, должен быть частью программы внутрилабораторного контроля качества. Для большинства термостатов пять чашек в одной стопке является наиболее приемлемым количеством.
6.3	Условия инкубации для разных групп бактерий представлены в таблице 3 .
6.3.1	Нельзя допускать увеличения периода инкубации сверх установленных пределов, так как это может привести к появлению роста внутри зоны и оценке изолята как ложно резистентного.
6.3.2	Резистентность к гликопептидам у некоторых изолятов <i>Enterococcus</i> spp. может быть выявлена только после 24 часов инкубации. Учет результатов определения чувствительности можно проводить через 16-20 часов инкубации. При обнаружении резистентности, инкубацию можно не продолжать. Однако заключение о чувствительности изолята может быть сделано только после истечения 24 ч инкубации.

¹ Часть правила 15-15-15 минут: необходимо инокулировать суспензию микроорганизмов не позднее, чем через 15 минут после приготовления, наложить диски на инокулированную чашку Петри не позднее, чем через 15 минут после инокуляции и начать инкубацию чашек Петри не позднее, чем через 15 минут после аппликации дисков.

Таблица 3		Условия инкубации при определении чувствительности диско-диффузионным методом	
Микроорганизм		Условия инкубации	
<i>Enterobacteriaceae</i>		35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч	
<i>Pseudomonas</i> spp.		35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч	
<i>Acinetobacter</i> spp.		35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч	
<i>Staphylococcus</i> spp.		35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч	
<i>Enterococcus</i> spp.		35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч (24 ч для гликопептидов) (24 часа – для гликопептидов)	
Стрептококки групп А, В, С и G		35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов	
Стрептококки группы Viridans		35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов	
<i>Haemophilus</i> spp.		35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов	
<i>Moraxella catarrhalis</i>		35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов	
<i>Listeria monocytogenes</i>		35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов	
<i>Pasteurella multocida</i>		35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов	
<i>Campylobacter jejuni</i> и <i>C. coli</i>		41± 1°C, микроаэрофильные условия, 24 часа	
<i>Corynebacterium</i> spp.		35±1°C, 4-6% CO ₂ в атмосфере, 16-20 часов. При слабом росте изолята после 16-20 ч инкубации следует продлить инкубацию до 40-44 часов (общая длительность периода инкубации), после чего провести учет результатов.	
<i>Aerococcus sanguinicola</i> и <i>urinae</i>		35±1°C, 4-6% CO ₂ в атмосфере, 16-20 часов. При слабом росте изолята после 16-20 ч инкубации следует продлить инкубацию до 40-44 часов (общая длительность периода инкубации), после чего провести учет результатов.	
<i>Kingella kingae</i>		35±1°C, 4-6% CO ₂ в атмосфере, 16-20 часов. При слабом росте изолята после 16-20 ч инкубации следует продлить инкубацию до 40-44 часов (общая длительность периода инкубации), после чего провести учет результатов.	
Другие привередливые бактерии		В процессе валидации	

7	Контроль качества проведения исследования после инкубации
7.1	При соблюдении правил подготовки инокулюма и инокуляции чашек с агаром должен сформироваться равномерный сплошной слой бактериального роста (газон).
7.1.1	Формирование отдельных колоний вместо сплошного роста свидетельствует о недостаточной плотности инокулюма. В этом случае исследование необходимо повторить.
7.2	Газон должен быть равномерным на всей поверхности агара. Края зон подавления роста вокруг дисков с антибиотиками должны быть ровными и иметь форму окружностей.
7.3	Необходимо оценить соответствие диаметров зон подавления роста контрольных штаммов диапазонам допустимых значений (http://www.eucast.org).

8	Измерение зон подавления роста и интерпретация результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом
8.1	<p>При измерении зон подавления роста вокруг дисков с любыми АМП следует ориентироваться на зону полного подавления роста микроорганизмов, определяемую невооруженным глазом, при расположении чашки на расстоянии примерно 30 см от глаз (если другое не указано в разделе 8.9).</p>
8.2	<p>Для измерения зон подавления роста на среде, не содержащей дополнительных компонентов, чашку Петри с закрытой крышкой располагают дном вверх на темную матовую поверхность, так чтобы свет падал на нее под углом 45° (учет в отраженном свете).</p>
8.3	<p>Для измерения зон подавления роста на среде, содержащей дополнительные компоненты, чашку Петри помещают дном книзу, так чтобы свет падал на поверхность агара под углом 45° (учет в отраженном свете), крышку снимают.</p>
8.4	<p>Не следует учитывать результаты в проходящем свете или использовать увеличительное стекло, если это не предусмотрено методикой (см. раздел 8.9).</p>
8.5	<p>Измерение зон подавления роста необходимо проводить с точностью до ближайшего миллиметра при помощи линейки или штангенциркуля.</p>
8.5.1	<p>При использовании автоматических приборов для учета результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом, результаты должны быть калиброваны по отношению к визуальному методу.</p>
8.6	<p>Интерпретация диаметров зон подавления роста для определения клинических категорий чувствительности проводится в соответствии с актуальной версией таблиц пограничных значений, представленной на сайте http://www.eucast.org.</p>
8.7	<p>При использовании для интерпретации результатов определения чувствительности шаблонов, чашку следует поместить сверху шаблона и интерпретировать зоны в соответствии с пограничными значениями EUCAST, отмеченными на шаблоне. Необходимо убедиться, что шаблоны подготовлены в соответствии с актуальной (последней) версией таблиц пограничных значений EUCAST. Программа для подготовки шаблонов находится в свободном доступе на сайте http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program.</p>
8.8	<p>В документе «Руководство по учету результатов», размещенном на сайте http://www.eucast.org имеется несколько иллюстраций, демонстрирующих примеры учета диаметра зоны подавления роста. Кроме того, этот документ содержит инструкции по учету результатов в частных случаях – для отдельных комбинаций микроорганизм-антибиотик.</p>
8.9	<p>Рекомендации по учету результатов определения чувствительности: частные случаи</p>
8.9.1	<p>При наличии двойной зоны подавления роста или обнаружении внутри зоны отдельных колоний необходимо проверить чистоту культуры и при необходимости повторить процедуру определения чувствительности. При подтверждении чистоты культуры отдельные колонии должны быть учтены при измерении зоны подавления роста.</p>

8.9.2	<p>При определении чувствительности к триметоприму и триметоприму-сульфаметоксазолу может наблюдаться слабый рост внутри зоны до самого диска из-за присутствия в среде антагонистов. Такой рост не учитывают, зону подавления роста измеряют по наиболее четкому краю.</p> <p>При оценке чувствительности <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> к триметоприму-сульфаметоксазолу при наличии любых признаков того, что диаметр зоны подавления роста \geq пограничного значения для чувствительных изолятов, результат оценивается как чувствительный. При этом рост внутри зоны подавления может быть достаточно выраженным. Отсутствие зоны регистрируется только при полном отсутствии признаков подавления роста.</p>
8.9.3	<p>При определении чувствительности <i>Enterobacteriaceae</i> к ампициллину, ампициллину-сульбактаму и амоксициллину-клавулановой кислоте с использованием некоторых серий МХА внутри основной зоны подавления роста может появляться нежный рост в виде внутренней зоны. Этот рост следует игнорировать.</p>
8.9.4	<p>При учете результатов определения чувствительности <i>Escherichia coli</i> к мециллину не следует учитывать изолированные колонии внутри зоны подавления роста.</p>
8.9.5	<p>При учете результатов определения чувствительности <i>Proteus</i> spp. следует игнорировать роение в зоне подавления роста, а измерение диаметра зоны – проводить по наиболее заметному внешнему краю.</p>
8.9.6	<p>При учете результатов определения чувствительности <i>Staphylococcus aureus</i> к бензилпенициллину следует особенно тщательно осмотреть край зоны подавления роста в проходящем свете. Если диаметр зоны подавления роста \geq пограничного значения для чувствительных изолятов, но край зоны четкий, изолят должен быть оценен как резистентный.</p>
8.9.7	<p>При оценке результатов выявления резистентности <i>Staphylococcus aureus</i> к метициллину с использованием цефокситина следует измерить четко видимую зону подавления роста и тщательно осмотреть зону при хорошем освещении с целью возможного обнаружения изолированных колоний внутри зоны. Эти колонии могут быть как свидетельством контаминации другим видом, так и проявлением гетерогенной метициллинорезистентности.</p>
8.9.8	<p>Для оценки результатов определения чувствительности стафилококков к линезолиду следует поднести чашку к источнику света и провести учет результатов в проходящем свете.</p>
8.9.9	<p>Учет результатов определения чувствительности энтерококков к ванкомицину проводится в проходящем свете. Следует тщательно оценить край зоны подавления роста. Нечеткий край зоны подавления роста и колонии внутри зоны свидетельствуют о резистентности к ванкомицину. Такие изоляты требуют дальнейшего исследования. Заключение о чувствительности изолята к ванкомицину может быть сделано только после 24 ч инкубации.</p>
8.9.10	<p>При определении чувствительности гемолитических стрептококков на агаре МХ-П необходимо дифференцировать зону подавление роста и зону гемолиза: при измерении зоны следует ориентироваться на зону подавления роста и не</p>

учитывать зону гемолиза. Над зоной β -гемолиза обычно нет роста микроорганизмов, а зона α -гемолиза часто совпадает с зоной роста бактерий. Для лучшей дифференциации зоны подавления роста и зоны гемолиза следует несколько раз наклонить чашку вперед-назад.

8.9.11

При оценке чувствительности *Escherichia coli* к фосфомицину изолированные колонии внутри зоны подавления роста не учитываются. Диаметр измеряется по наружному краю зоны подавления роста.

9	Контроль качества
9.1	<p>Для контроля качества выполнения методики определения чувствительности используют специальные штаммы (Таблица 4). Основные рекомендованные контрольные штаммы характеризуются чувствительностью к антибиотикам; в то же время для подтверждения способности метода выявлять резистентность, опосредованную известными механизмами, необходимо использовать устойчивые штаммы (Таблица 5. Расширенный контроль качества). Контрольные штаммы могут быть получены из коллекций типовых культур или коммерческих источников.9.1.1</p>
9.1.1	<p>Для контроля ингибирующего компонента дисков, содержащих комбинации β-лактамов с ингибиторами β-лактамаз, необходимо использовать специальные β-лактамазо-продуцирующие штаммы (Таблица 4), которые следует включить в набор контрольных штаммов для повседневной практики. Чувствительный штамм используется для контроля активного компонента.</p>
9.2	<p>Контрольные штаммы необходимо хранить в условиях, обеспечивающих их жизнеспособность и стабильность фенотипа. Наиболее удобный метод – хранение в бульоне с добавлением глицерина (или коммерческие эквиваленты) при температуре -70°C. Непривередливые микроорганизмы могут храниться при -20°C. Каждый контрольный штамм должен храниться в двух экземплярах, один для регулярного использования, второй – как резервный.</p>
9.3	<p>Каждую неделю следует субкультивировать штамм из пробирки, предназначенной для регулярного использования на соответствующей неселективной среде. После контроля чистоты культуры этот рассев должен использоваться ежедневно для подготовки субкультуры контрольного штамма. Привередливые микроорганизмы, жизнеспособность которых не сохраняется при хранении на чашках в течение 5-6 дней, следует пересевать ежедневно, но не более чем в течение одной недели.</p> <p>Для субкультивирования контрольного штамма необходимо использовать несколько колоний, чтобы избежать селекции мутантных вариантов.</p>
9.4	<p>Необходимо проверить соответствие полученных значений допустимым диапазонам значений для контрольных штаммов (http://www.eucast.org).</p>
9.4.1	<p>В таблицах EUCAST представлены допустимые диапазоны и целевые значения для контрольных штаммов. При повторных исследованиях значения диаметров зоны подавления роста контрольных штаммов должны случайным образом распределяться внутри рекомендуемого диапазона, а при наличии результатов ≥10 исследований, среднее арифметическое должно быть близким к целевому значению (±1 мм от целевого значения).</p>
9.5	<p>Для контроля качества определения чувствительности следует использовать рекомендованные контрольные штаммы для повседневного (рутинного) контроля.</p> <p>Контроль качества определения чувствительности с использованием набора рекомендованных контрольных штаммов следует проводить ежедневно, по крайней мере, для тех антибиотиков, которые включены в стандартные панели (наборы).</p> <p>Результаты каждого исследования контрольного штамма следует сравнивать с результатами последних 20 исследований этого же контрольного штамма для своевременного выявления тенденции увеличения или уменьшения зон подавления роста по сравнению с целевыми значениями. Результаты двух или более из 20 тестов, выходящие за рамки допустимого диапазона, требуют проведения мероприятий для выяснения причин получения нестабильных результатов.</p>

- 9.6 В дополнение к рутинному контролю качества, контрольные исследования необходимо проводить перед началом использования каждой новой партий МХА.
- Несоответствие результатов исследования контрольных штаммов допустимым диапазонам по отдельным антибиотикам может свидетельствовать о ненадлежащем составе среды: аминогликозиды могут выявлять недопустимые вариации двухвалентных катионов, тигециклин – содержания магния, тремитоприм-сульфаметоксазол – тимина, эритромицин – ненадлежащее значение pH.

Таблица 4 Перечень контрольных микроорганизмов, рекомендуемых для использования в рутинной практике		
Микроорганизм	Штамм	Характеристика
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434	Чувствительный, дикий тип
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5564 CCUG 30600 CECT 943	Продуцент TEM-1, устойчив к ампициллину (для контроля ингибирующего компонента дисков с комбинациями β-лактамов с ингибиторами β-лактамаз)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	Продуцент ESBL (SHV-18) (для контроля ингибирующего компонента дисков с комбинациями β-лактамов с ингибиторами β-лактамаз)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 NCTC 12934 CIP 76110 DSM 1117 CCUG 17619 CECT 108	Чувствительный, дикий тип
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 NCTC 12973 CIP 103429 DSM 2569 CCUG 15915 CECT 794	Слабый продуцент β-лактамаз
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570 CCUG 9997 CECT 795	Чувствительный, дикий тип
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619 NCTC 12977 CIP 104340 DSM 11967 CCUG 33638	Сниженная чувствительность к бензилпенициллину
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49766 NCTC 12975 CIP 103570 DSM 11970 CCUG 29539	Чувствительный, дикий тип
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560 NCTC 11351 CIP 702 DSM 4688 CCUG 11284	Чувствительный, дикий тип

Таблица 5 Дополнительный перечень контрольных микроорганизмов, рекомендуемых для выявления механизмов резистентности (расширенный контроль качества)		
Микроорганизм	Штамм	Характеристика
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603 NCTC 13368 CCUG 45421 CECT 7787	Продуцент ESBL (SHV-18)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12493	<i>mecA</i> -положительный, гетеро-резистентный MRSA
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299 NCTC 13379 CIP 104676 DSM 12956 CCUG 34289	Высокий уровень резистентности к аминогликозидам (HLAR) и резистентность к ванкомицину (<i>vanB</i> -положительный)
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247 NCTC 12699 CIP 104604 DSM 9999 CCUG 26214	Сниженная чувствительность к β -лактамам за счет мутаций в генах ПСБ (β -лактамаза-отрицательный, ампициллин-резистентный (BLNAR))

Приложение А

Диско-диффузионный метод определения чувствительности *Campylobacter jejuni* и *coli*

В соответствии с рекомендациями EUCAST при определении чувствительности *Campylobacter jejuni* и *coli* необходимо следовать следующей методике (Таблица А1).

Таблица А1	Диско-диффузионный метод определения чувствительности <i>Campylobacter jejuni</i> и <i>coli</i>
Питательная среда	Агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5% дефибрированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД (МХ-П). Чашки с агаром МХ-П должны быть подсушены перед инокуляцией для уменьшения роения (при 20-25°C в течение 10-12 ч или при 35°C, со снятой крышкой в течение 15 мин).
Инокулюм	0,5 по стандарту мутности по МакФарланду.
Инкубация	Микроаэрофильные условия 41±1°C 24 ч В результате инкубации должен появиться рост в виде сплошного газона. При определении чувствительности некоторых изолятов <i>S. coli</i> в течение 24 часов не происходит образование сплошного газона, достаточного для учета результатов. В этом случае следует немедленно продолжить инкубацию и провести учет результатов после 40-48 часов инкубации (в целом). Температура инкубации 41±1°C была выбрана для создания наиболее благоприятных условий для роста <i>Campylobacter</i> spp.
Учет результатов	Стандартные правила учета результатов EUCAST: Чашку Петри помещают дном книзу, так чтобы свет падал на поверхность агара под углом 45° (учет в отраженном свете), крышку снимают. При измерении зон подавления роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста при осмотре чашки невооруженным глазом с расстояния 30 см.
Контроль качества	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560