

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 8.0

Январь 2020

Содержание		Страница
	<u>Изменения по сравнению с предыдущей версией (в. 7.0)</u>	3
	<u>Список сокращений</u>	4
1	<u>Введение</u>	5
2	<u>Приготовление и хранение питательной среды</u>	6
3	<u>Приготовление инокулюма</u>	8
4	<u>Инокуляция чашек с агаром МХ и МХ-П</u>	10
5	<u>Нанесение дисков с антибиотиками</u>	11
6	<u>Инкубация</u>	12
7	<u>Контроль качества проведения исследования после инкубации</u>	14
8	<u>Измерение зон подавления роста и интерпретация результатов определения чувствительности</u>	15
9	<u>Контроль качества</u>	17
	<u>Приложение А</u>	21

Изменения по сравнению с предыдущей версией (в. 7.0)

Раздел	
Таблица 1, 3	Добавлена информация о <i>Burkholderia pseudomallei</i>
8.1	Добавлены рекомендации по оценке зоны подавления роста в трудных случаях определения границы зоны.
8.9.2	Добавлена специальная инструкция по учету результатов определения чувствительности <i>Burkholderia pseudomallei</i> к триметоприму-сульфаметоксазолу.
8.9.4	Инструкции по учету результатов определения чувствительности к мециллину валидированы для всех <i>Enterobacterales</i> , имеющих пограничные значения.
8.9.8	Удалена специальная инструкция по учету результатов определения чувствительности стафилококков к линезолиду.
8.9.11	Добавлена специальная инструкция по учету результатов определения чувствительности <i>H. influenzae</i> к β-лактамам.
9.3	Добавлена информация о субкультивировании штаммов для контроля качества.
9.5, 9.5.1-9.5.5	Добавлены рекомендации по выполнению и оценке результатов повседневной программы контроля качества.
9.6, 9.6.1-9.6.2	Добавлена информация по контролю качества партии агара Мюллера-Хинтон.
Таблица 4	Добавлен контрольный штамм <i>Klebsiella pneumoniae</i> BAA-2814.
Приложение А, Таблица А1	Добавлены инструкции по измерению зон при исследовании <i>Campylobacter jejuni</i> и <i>coli</i> .

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	Colección Española 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 für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) have DSM numbers (Бактериальные культуры 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 mecA or mecC gene) (Метициллинорезистентный золотистый стафилококк (вследствие наличия генов mecA или mecC))
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
КК	Контроль качества
КОЕ	Колониеобразующая единица
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
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, будучи одним из первых методов определения чувствительности к антибиотикам, до настоящего времени остается наиболее распространенным в практических бактериологических лабораториях. Метод может применяться для исследования большинства бактериальных возбудителей, в том числе и наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями. Метод является универсальным для широкого круга антимикробных препаратов и не требует использования специального оборудования.

Также, как и некоторые другие варианты выполнения диско-диффузионного метода, метод EUCAST является стандартизированным методом, в основе которого лежат принципы, изложенные в отчете о Международном совместном исследовании по определению чувствительности к антибиотикам 1972 г. (International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing, 1972) и опыт 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 вебсайте (<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 добавлением ингредиентов, указанных в таблице 1. Подробная инструкция по приготовлению МХ-П и внесению дополнительных ингредиентов находится на вебсайте http://www.eucast.org .
2.2	Толщина агара должна составлять 4±0,5 мм (что приблизительно соответствует 25 мл среды для круглой чашки Петри диаметром 90 мм, 31 мл для круглой чашки Петри диаметром 100 мм, 71 мл для круглой чашки Петри диаметром 150 мм, 40 мл для квадратной чашки Петри размером 100x100 мм). Размеры чашек могут варьировать у разных производителей. Поэтому необходимо рассчитать требуемый объем среды на основании истинного размера используемых чашек Петри в лаборатории.
2.3	Поверхность агара перед использованием должна быть сухой. На поверхности агара и внутренней поверхности крышки не должно быть видимых капель влаги. 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 агар.
2.4	Хранить среды, приготовленные в лаборатории, необходимо при 4-8°C.
2.5	Для сред, приготовленных непосредственно в лаборатории, время подсушивания агара, условия хранения и срок годности должны быть установлены в рамках выполнения программы управления качеством в лаборатории.
2.6	Коммерческие готовые среды должны храниться в соответствии с рекомендациями производителя и использоваться в течение указанного срока годности.
2.7	Для чашек с агаром (приготовленных как в коммерческих условиях, так и непосредственно в лаборатории), которые хранятся в плотно закрытых контейнерах или пластиковых пакетах, может потребоваться подсушивание перед использованием (см. раздел 2.3), так как лишняя влага может стать причиной формирования нечеткого края зоны подавления роста и вуалеобразного роста внутри зоны подавления.

Таблица 1		Питательные среды для определения чувствительности к антибиотикам	
Микроорганизм		Питательная среда	
<i>Enterobacterales</i>		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	
<i>Aeromonas</i> spp.		МХА	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		МХА	
Другие привередливые бактерии		В процессе валидации	

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>Данный метод может быть использован для приготовления суспензий всех бактерий, включая бактерии со сложными питательными потребностями, перечисленные в таблице 1.</p>
3.2	<p>Стерильной бактериологической петлей или хлопковым тампоном необходимо собрать колонии, выросшие на неселективном агаре в течение 16-20 ч. По возможности следует собирать несколько морфологически идентичных колоний, чтобы избежать отбора атипичных вариантов. Суспендировать полученный материал в стерильном изотоническом растворе и тщательно перемешать до получения однородной мутности.</p>
3.3	<p>Довести плотность бактериальной суспензии до 0,5 по стандарту мутности МакФарланда путем добавления в суспензию микробной массы или разбавления ее стерильным изотоническим раствором. 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, которые должны быть калиброваны по стандарту 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 приготовленной суспензии со стандартом следует проводить 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. В этом случае плотность суспензии должна соответствовать 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. При использовании культуры, выросшей на шоколадном агаре, плотность инокулюма должна быть доведена до 1,0 по стандарту мутности МакФарланда.</p>
3.4	<p>Оптимально бактериальную суспензию следует нанести на агар в течение 15 минут, но не позже, чем через 60 минут после ее приготовления.</p>

¹Часть правила 15-15-15 минут: инокулировать суспензию на агар в течение 15 минут после приготовления, нанести диски в течение 15 минут после инокуляции чашек с агаром, начать инкубацию в течение 15 минут после нанесения 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% по объему) 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.
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 МХ и МХ-П
4.1	Перед инокуляцией необходимо убедиться что чашки с агаром достигли комнатной температуры.
4.2	<p>Оптимально бактериальную суспензию следует нанести на агар не позже, чем через 15 минут¹ после приготовления.</p> <p>Бактериальная суспензия должна быть всегда нанесена на агар не позже, чем через 60 минут после ее приготовления.</p>
4.3	Погрузить стерильный хлопковый тампон в суспензию.
4.3.1	При работе с грамотрицательными бактериями, чтобы избежать нанесения избыточного количества инокулюма, следует удалить излишки суспензии, тщательно отжимая тампон о внутренние стенки пробирки.
4.3.2	При работе с грамположительными бактериями не следует отжимать тампон о внутренние стенки пробирки.
4.4	При нанесении одной и той же суспензии на несколько чашек с агаром, следует повторить процедуру, описанную в п. 4.3 для каждой чашки
4.5	Инокуляция чашек может производиться вручную путем равномерного нанесения инокулюма штриховыми движениями на всю поверхность агара в трех направлениях или с использованием автоматического вращающего устройства. Важно следить за тем, чтобы инокулюм был равномерно распределен по всей поверхности агара и между штрихами не оставалось промежутков.
4.5.1	При работе с грамположительными бактериями особенно важно следить за тем, чтобы между штрихами не оставалось промежутков.
4.6	Диски на поверхность агара необходимо нанести не позже, чем через 15 минут ¹ после инокуляции агара. Длительное нахождение 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: использовать суспензию в течение 15 минут после приготовления, нанести диски в течение 15 минут после инокуляции чашек с агаром, начать инкубацию в течение 15 минут после нанесения дисков.

5	Нанесение дисков с антибиотиками
5.1	Требуемые концентрации антибиотиков в дисках представлены в таблицах пограничных значений и контроля качества (http://www.eucast.org).
5.2	Чтобы избежать быстрого снижения качества дисков из-за образования конденсата на них, не следует открывать картриджи или контейнеры для хранения дисков до достижения ими комнатной температуры.
5.3	Диски с антибиотиками должны быть нанесены на поверхность агара не позже, чем через 15 минут ¹ после инокуляции бактериальной суспензии. Контакт диска с агаром должен быть полным и плотным. После нанесения на поверхность агара диски нельзя передвигать, так как диффузия антибиотика в среду начинается очень быстро.
5.4	Количество дисков на одной чашке Петри должно быть ограниченным для предотвращения перекрытия зон подавления роста и взаимодействия между антибиотиками. Очень важно обеспечить возможность точного измерения диаметров зон подавления роста. 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 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) в закрытых сухих контейнерах с индикаторным влагопоглотителем, защищенных от действия света (некоторые препараты, включая метронидазол, хлорамфеникол и фторхинолоны, инактивируются при длительном воздействии света).
5.5.2	Основное количество дисков с антибиотиками должны храниться в соответствии с рекомендациями производителя. Некоторые препараты являются менее стабильными (например, амоксициллин-клавулановая кислота, цефаклор и карбапенемы) и могут требовать специальных условий хранения.
5.5.3	Рабочие наборы дисков следует хранить в соответствии с инструкцией производителя. После открытия упаковки диски должны быть использованы в течение времени, указанного производителем.
5.5.4	По истечении срока годности, указанного на упаковке, диски должны быть уничтожены.
5.5.5	Для контроля надлежащей сохранности активности дисков с антибиотиками во время хранения необходимо проводить регулярный контроль качества (см. Раздел 9) рабочих материалов.

¹ Часть правила 15-15-15 минут: использовать суспензию в течение 15 минут после приготовления, нанести диски в течение 15 минут после инокуляции чашек с агаром, начать инкубацию в течение 15 минут после нанесения дисков.

6	Инкубация
6.1	Перед инкубацией следует перевернуть чашки дном кверху и убедиться, что диски не падают с поверхности агара. Начать инкубацию следует не позже, чем через 15 минут ¹ после нанесения дисков с антибиотиками. Пре-диффузия АМП в агар в случае нахождения чашек при комнатной температуре после инокуляции может быть причиной ошибки определения чувствительности – получения больших зон подавления роста.
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 стопке является оптимальным количеством.
6.3	Условия инкубации для разных групп бактерий представлены в табл. 3.
6.3.1	Не следует продлевать инкубацию более длительно, чем это рекомендовано. Более длительная инкубация может привести к появлению бактериального роста внутри зоны подавления и ошибочной оценки изолята как резистентного.
6.3.2	При определении чувствительности <i>Enterococcus</i> spp. к гликопептидам резистентные колонии могут быть выявлены только после 24 ч инкубации. Однако учет результатов определения чувствительности можно проводить через 16-20 ч. При обнаружении резистентности инкубацию можно не продолжать. В остальных случаях следует продолжить инкубацию и повторить учет результатов после истечения 24 ч от момента начала инкубации.

¹ Часть правила 15-15-15 минут: использовать суспензию в течение 15 минут после приготовления, нанести диски в течение 15 минут после инокуляции чашек с агаром, начать инкубацию в течение 15 минут после нанесения дисков.

Таблица 3 Условия инкубации при определении чувствительности диско-диффузионным методом	
Микроорганизм	Условия инкубации
<i>Enterobacterales</i>	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
<i>Pseudomonas</i> spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
<i>Acinetobacter</i> spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
<i>Staphylococcus</i> spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
<i>Enterococcus</i> spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч (24 ч – для гликопептидов)
<i>Aeromonas</i> spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	35±1°C, обычная атмосфера, 18±2 ч
Стрептококки групп А, В, С и G	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
Стрептококки группы Viridans	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
<i>Haemophilus influenzae</i>	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
<i>Listeria monocytogenes</i>	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
<i>Pasteurella multocida</i>	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч
<i>Campylobacter jejuni</i> и <i>coli</i>	См. Приложение А
<i>Corynebacterium</i> spp.	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч. При слабом росте изолята после 16-20 ч инкубации следует немедленно продлить инкубацию до 40-44 ч, после чего провести учет результатов.
<i>Aeromonas sanguinicola</i> и <i>urinae</i>	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч. При слабом росте изолята после 16-20 ч инкубации следует немедленно продлить инкубацию до 40-44 ч, после чего провести учет результатов.
<i>Kingella kingae</i>	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 18±2 ч. При слабом росте изолята после 16-20 ч инкубации следует немедленно продлить инкубацию до 40-44 ч, 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. Край зоны подавления роста вокруг дисков с антибиотиками должны иметь форму окружности. Края зон подавления роста должны быть ровными (не зубчатыми).
7.4	Необходимо оценить соответствие диаметров зон подавления роста контрольных штаммов допустимым диапазонам (http://www.eucast.org).

8	Измерение зон подавления роста и интерпретация результатов определения чувствительности
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). При затруднительном определении края зоны учет результатов можно облегчить, наклонив чашку под углом 45° к рабочей поверхности.</p>
8.2	<p>Измерение зон подавления роста на МХА без добавок проводят в отраженном свете. Чашку Петри с закрытой крышкой располагают дном кверху над темной матовой поверхностью.</p>
8.3	<p>Измерение зон подавления роста на среде МХА-П с добавками проводят в отраженном свете. Чашку Петри помещают дном книзу, 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 миллиметра при помощи линейки или штангенциркуля.</p>
8.5.1	<p>Используемые автоматические устройства для учета результатов должны быть калиброваны по отношению к визуальному учету.</p>
8.6	<p>Интерпретация результатов и определение клинической категории чувствительности проводится в соответствии с актуальной версией таблиц пограничных значений диаметров зон подавления роста, представленных на вебсайте 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 доступна на вебсайте http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program.</p>
8.8	<p>Примеры, иллюстрирующие правила измерения диаметров зон подавления роста, содержатся в презентации «Руководство по учету результатов» (http://www.eucast.org).</p>
8.9	<p>Особые ситуации:</p>
8.9.1	<p>При формировании двойной зоны или изолированных колоний внутри зоны подавления роста следует убедиться в чистоте культуры и при необходимости повторить исследование. Если культура чистая, колонии внутри зоны следует учитывать при измерении диаметра зоны подавления роста.</p>
8.9.2	<p>При определении чувствительности к триметоприму-сульфаметоксазолу внутри зоны подавления может наблюдаться слабый рост, распространяющийся до края диска в результате наличия антагонистов в среде. Такой рост не учитывается, а диаметр измеряется по наиболее четкому краю.</p>
	<p>При определении чувствительности <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> и <i>Burkholderia pseudomallei</i> к триметоприму-сульфаметоксазолу изоляты, имеющие любые признаки</p>

наличия зоны подавления роста, диаметр которой \geq пограничного значения для чувствительных изолятов, оцениваются как чувствительные. Внутри зоны подавления может наблюдаться достаточно выраженный рост. Только в тех случаях, если рост распространяется до края диска и не имеется никаких признаков наличия зоны подавления, результат учитывается как отсутствие зоны подавления роста.

При определении чувствительности *Aeromonas* spp. к триметоприму-сульфаметоксазолу результат учитывается по четкому краю зоны, тонкий или валеобразный рост внутри зоны подавления роста не учитывается. Если четкий край зоны не определяется, диаметр зоны подавления следует измерять по внутреннему краю зоны.

- 8.9.3 При определении чувствительности *Enterobacteriales* к ампициллину, ампициллину-сульбактаму и амоксициллину-клавулановой кислоте, следует игнорировать рост в виде тонкой пленки внутри зоны подавления, который появляется при использовании некоторых партий МХА.
- 8.9.4 При учете результатов определения чувствительности *Enterobacteriales* к мециллину изолированные колонии внутри зоны подавления роста не учитываются.
- 8.9.5 При учете результатов определения чувствительности *Proteus* spp. роение внутри зоны не принимается во внимание. Учет результатов проводится по краю зоны подавления роста.
- 8.9.6 При учете результатов определения чувствительности стафилококков 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.
- 8.9.7 При оценке результатов выявления резистентности к метициллину у изолятов *Staphylococcus aureus* следует измерить видимую зону подавления роста и тщательно при хорошем освещении осмотреть зону с целью возможно обнаружения изолированных колоний внутри зоны. Эти колонии могут быть как следствием контаминации другим видом, так и проявлением гетерогенной метициллинорезистентности.
- 8.9.8 Для оценки результатов определения чувствительности энтерококков к ванкомицину следует тщательно оценить край зоны подавления роста, расположив чашку дном книзу в проходящем свете. При наличии нечеткого края зоны подавления роста и колоний внутри зоны изолят оценивается как резистентный к ванкомицину и подлежит дальнейшему исследованию. Изолят нельзя оценивать как чувствительный до истечения полных 24 ч инкубации.
- 8.9.9 При определении чувствительности гемолитических стрептококков следует учитывать зону подавления роста и не учитывать зону гемолиза. Над зоной β -гемолиза обычно нет роста микроорганизмов, а зона α -гемолиза часто совпадает с зоной роста бактерий. Для облегчения дифференциации зоны подавления роста и зоны гемолиза, чашку следует просмотреть, наклоняя ее под разными углами.
- 8.9.10 При определении чувствительности *Escherichia coli* к фосфомицину изолированные колонии внутри зоны подавления роста не учитываются. Измерение диаметра проводится по внешнему краю.
- 8.9.11. При определении чувствительности *H. influenzae* к β -лактамам в зоне полного подавления роста может наблюдаться область роста вокруг диска. В этом случае учет результатов проводится по внешнему краю зоны подавления роста.

9	Контроль качества
<p>9.1</p> <p>9.1.1</p> <p>9.2</p> <p>9.3</p> <p>9.4</p> <p>9.4.1</p> <p>9.5</p>	<p>Мониторинг качества выполнения исследований антибиотикочувствительности проводится с использованием специальных штаммов (Таблица 4). Основные рекомендованные контрольные штаммы являются чувствительными к антибиотикам. Кроме того для подтверждения способности метода выявлять резистентность, опосредованную известными механизмами, необходимо использовать устойчивые штаммы (Расширенный контроль качества (КК), Таблица 5). Контрольные штаммы могут быть получены из коллекций типовых культур или коммерческих источников.</p> <p>Для контроля ингибирующего компонента в дисках, содержащих комбинации β-лактамов и ингибиторов β-лактамаз, рекомендуется использовать специальные штаммы, продуцирующие β-лактамазы (Таблица 4). Это должно быть частью повседневного КК. Активный компонент контролируется чувствительными контрольными штаммами.</p> <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. Каждый контрольный штамм должен храниться в двух экземплярах, один для регулярного использования, второй – как резервный.</p> <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 в течение недели. Привередливые микроорганизмы, жизнеспособность которых не сохраняется при хранении на чашках в течение недели, следует субкультивировать последовательно ежедневно, используя для посева 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 культуру из архивной пробирки и из данной субкультуры приготовить другую пробирку для регулярного использования.</p> <p>При субкультивировании контрольного штамма следует собирать несколько колоний, чтобы избежать селекции мутантных вариантов.</p> <p>Допустимые диапазоны значений для контрольных штаммов представлены в таблицах контроля качества EUCAST на вебсайте: http://www.eucast.org.</p> <p>Таблицы контроля качества EUCAST содержат диапазоны допустимых значений и целевые значения для каждой комбинации контрольный микроорганизм-антибиотик. При регулярном тестировании контрольных штаммов значения диаметров зон подавления должны находиться в пределах допустимого диапазона и распределяться внутри него случайным образом. При наличии ≥10 результатов среднее арифметическое значений диаметров зон должны быть близким к целевому значению (оптимально ±1 мм от целевого значения).</p> <p>Для контроля качества определения чувствительности следует использовать контрольные штаммы для повседневного (рутинного) контроля. Для работы следует использовать суточную (16-20 ч) культуру контрольного штамма соблюдать все процедуры исследования, как при работе из клиническими изолятами.</p> <p>Контроль качества определения чувствительности с использованием набора рекомендованных контрольных штаммов следует проводить ежедневно, или как минимум 4 раза в неделю для тех антибиотиков, которые включены в стандартные панели (наборы). Учет и оценку результатов исследования контрольных штаммов необходимо выполнить перед сообщением результатов определения чувствительности клинических изолятов лечащему врачу.</p>

- 9.5.1** Результаты каждого исследования контрольного штамма следует сравнивать с результатами последних 20 исследований этой же комбинации контрольный штамм-антибиотик для своевременного выявления тенденции отклонения значений от целевого в ту или иную сторону.
- 9.5.2** 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.
- 9.5.3** Если диаметры зон подавления роста контрольного штамма в 2 последовательных случаях из 20 находятся за пределами допустимого диапазона или зоны подавления роста вокруг нескольких дисков находятся за пределами допустимого диапазона в один и тот же день, необходимо выяснить причины этого до сообщения результатов определения чувствительности. Может возникнуть необходимость в повторении исследований.
- 9.5.4** Если при исследовании резистентных контрольных штаммов резистентность не выявляется – нельзя сообщать результаты определения чувствительности, следует выяснить причины и повторить исследование.
- 9.5.5** Возможными источниками ошибок при проведении диско-диффузионного метода могут быть проблемы, связанные с дисками, питательной средой, условиями тестирования и качеством контрольных штаммов.
- 9.6** Дополнительно к ежедневному контролю качества, необходимо проводить контроль качества каждой новой партии агара Мюллера-Хинтон и убедиться, что диаметры зон подавления роста находятся в пределах допустимых диапазонов. Кроме того, для каждой новой партии агара необходимо убедиться, что толщина слоя агара в чашке Петри находится в допустимых пределах.
- Оценка результатов исследования аминокликозидов может способствовать выявлению неприемлемых вариаций содержания двухвалентных катионов в среде, тигециклина – вариаций в содержании магния, триметоприма-сульфаметоксазола – проблем с содержанием тимицина и тимидина, эритромицина – неприемлемый уровень pH. Увеличение глубины слоя агара в чашке Петри выше или ниже допустимых значений может привести к формированию зон подавления роста меньшего или большего диаметра.
- 9.6.1** Уменьшение или увеличение диаметров зон подавления роста вокруг дисков с аминокликозидами при исследовании *P. aeruginosa* ATCC 27853 по отношению к допустимым значениям могут свидетельствовать о высокой или низкой концентрации двухвалентных катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+}) в среде, соответственно
- 9.6.2** Уменьшение диаметра зоны подавления роста *E. faecalis* ATCC 29212 вокруг диска с триметопримом-сульфаметоксазолом ниже допустимых значений может свидетельствовать об избытке тимицина и тимидина.

Таблица 4		Перечень контрольных микроорганизмов, рекомендуемых для использования в рутинной практике	
Микроорганизм	Штамм	Характеристика	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 76.24 DSM 1103 CCUG 17620 CECT 434	Чувствительный, дикий тип	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218 NCTC 11954 CIP 102181 DSM 5923 CCUG 30600 CECT 943	Продуцент TEM-1, устойчивый к ампициллину	
<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 и ингибиторов β-лактамаз)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-2814	KPC-3, SHV-11 и TEM-1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 NCTC 12903 CIP 76.110 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 70.2T DSM 4688 CCUG 11284	Чувствительный, дикий тип Параметры тестирования, см. Приложение А	

Таблица 5 Дополнительный перечень контрольных микроорганизмов, рекомендуемых для выявления механизмов резистентности (расширенная программа контроля 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 CCUG 67181	<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 ПСБ

Приложение А

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

В соответствии с рекомендациями EUCAST при определении чувствительности *Campylobacter jejuni* и *coli* необходимо придерживаться следующей методики (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% дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД (МХ-П) Чтобы уменьшить феномен роения, чашки с агаром МХ-П следует подсушить перед инокуляцией (при 20-25°C в течение ночи или при 35°C с открытой крышкой в течение 15 мин).
Инокулюм	0,5 по стандарту мутности по МакФарланду.
Инкубация	Микроаэрофильные условия 41±1°C 24 ч В результате должен сформироваться сплошной рост в виде ровного газона. При определении чувствительности некоторых изолятов <i>C. jejuni</i> в течение 24 ч не происходит образования достаточного для учета результатов роста. В этом случае следует немедленно продолжить инкубацию и провести учет результатов после 40-48 ч инкубации (общее время инкубации). Температура инкубации 41±1°C выбрана для создания наиболее благоприятных условий для роста <i>Campylobacter</i> spp.
Учет результатов	Чашку Петри помещают дном книзу в отраженном свете, крышку снимают. При измерении зон подавления роста следует учитывать зону полного подавления видимого роста при осмотре чашки невооруженным глазом на расстоянии 30 см, наклоняя чашку под углом 45° к рабочей поверхности.
Контроль качества	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560