

Disková difuzní metoda EUCAST a prozatímní kritéria pro kontrolu kvality (QC) EUCAST u vybraných rychle rostoucích anaerobních bakterií na agaru pro náročné anaeroby - FFA (Fastidious Anaerobe Agar)

* Tato metoda je validována pro *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* a *Cutibacterium acnes* při inkubaci po dobu 16-20 h. Nelze ji použít pro jiné druhy anaerobních bakterií nebo pro inkubaci delší než 20 hodin.

Půda

1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) s 5 % mechanicky defibrinované koňské krve a bez dalších přísad.
 - a. Hloubka agaru musí být $4,0 \pm 0,5$ mm.
 - b. Při vlastní přípravě ploten se před přidáním krve půda ochladí na 42-45°C.
 - c. Takto připravené plotny by měly být skladovány při 4-8 °C ve větraných stojanech a chráněny před světlem. Způsob skladování by měl být součástí laboratorního programu k zajištění kontroly kvality, nicméně lze očekávat minimální trvanlivost 14 dnů.
 - d. Komerčně připravené plotny by měly být skladovány podle doporučení výrobce, chráněny před světlem a použity před datem expirace.
 - e. Plotny FAA se musí před očkovaním vysušit k odstranění přebytečné vlhkosti, která může být příčinou neostrých okrajů inhibičních zón, plazivého nebo zastřeného růstu v zónách. Lze použít jeden z následujících postupů:
 - i. sušení při 20-25 °C přes noc, nebo
 - ii. sušení při 35 °C s odkrytým víčkem po dobu 15 min. Před tímto krokem musí mít plotny pokojovou teplotu.
 - iii. u ploten skladovaných v plastových sáčcích může být nezbytné postupovat podle (i) a poté podle (ii).
 - f. Před použitím se plotny FFA neredukují v anaerobním prostředí.

Příprava inokula

1. Z kultury narostlé na neselektivním agaru po inkubaci přes noc se dotykem sterilní kličkou nebo bavlněným tamponem odebere několik morfologicky podobných kolonií.
2. Kolonie se rozetřou ve fyziologickém roztoku a promíchají se tak, aby vznikl rovnoměrný zákal.
3. Hustota inokula se upraví přidáním fyziologického roztoku nebo bakterií podle zákalové stupnice McFarland 1,0 (0,9-1,1). Doporučuje se použít fotometr.
4. Suspenze inokula se použije do **15 minut** od přípravy.

Inokulace agarových ploten

1. Sterilní bavlněný tampon se ponoří do suspenze o zákalu 1,0 dle McFarlanda.
 - a. U *Bacteroides* spp. se přebytečná tekutina odstraní otáčením tamponu proti vnitřní stěně zkumavky, aby nedošlo k naočkování přílišného množství inokula.
 2. Inokulum se rovnoměrně rozetře po povrchu agaru tak, aby nevznikly mezery.
 - a. To je zvláště důležité u druhů vyrůstajících na FFA v drobných koloniích, jako je *Cutibacterium acnes*.
- Na správně inokulovaných plotnách je růst splývavý s rovnoměrnými kruhovými inhibičními zónami.

Aplikace disků s antibiotiky

1. Použijí se disky s obsahem antibiotik doporučené EUCAST, uvedené v tabulkách kontroly kvality (QC) na konci tohoto dokumentu.
2. Před otevřením se kazety nebo kontejnery ponechají v pokojové teplotě pro temperování disků.
3. Disky se na plotnu aplikují do 15ti minut od inokulace.
 - a. Disky musí být v těsném a rovnoměrném kontaktu s povrchem plotny a po aplikaci se již nesmí přesouvat.
 - b. Počet disků na plotně musí být omezený tak, aby se vytvořené zóny nepřekrývaly. Optimálně se použijí tři disky na kruhovou plotnu o průměru 90 mm (pro *Bacteroides* spp. lze použít čtyři disky).

Inkubace ploten

1. Plotny obrátí dnem vzhůru k ujištění, že disky nespady z povrchu. Plotny se dají inkubovat do **15ti minut** po aplikaci disků.
2. Plotny FAA se inkubují v anaerobním prostředí při 35-37 °C po dobu 16-20 h.
 - a. Anaerobních podmínek lze dosáhnout v anaerobní stanici nebo v anaerobních nádobách, v nichž se vyvíjí plyn pro anaerobní prostředí nebo v systému vyvíjejícím plyn jako je Anoxomat.
 - b. Prodloužení inkubace (více než 20 h) není povoleno, neboť ovlivňuje velikost zón a zneplatňuje kritéria pro interpretaci.

Odečítání inhibičních zón

1. Správné inokulum poskytuje splývavý rovnoměrný růst po celém povrchu agaru. Není-li růst splývavý, test je zapotřebí opakovat nebo vyšetřit MIC.
2. Plotny se po odstranění víčka odečítají z horní strany v odraženém světle.
3. Okraj zóny se odečítá od bodu úplné inhibice viditelné pouhým okem z plotny držené ve vzdálenosti 30 cm od oka, nakloněné v úhlu 45 ° k pracovnímu stolu.
4. Průměr inhibiční zóny se pravítkem nebo posuvným měřítkem změří na nejbližší milimetr.

- a. Při zastření uvnitř zóny se odčítá průměr zóny od nejzřetelnějšího okraje. Zjevný okraj zóny lze lépe rozeznat nakloněním plotny směrem k sobě.
 - b. V případě dvojitých zón se odečítá průměr vnitřní zóny.
 - c. Hemolýza a plazivý růst uvnitř zóny se ignoruje.
5. Izolované kolonie rostoucí uvnitř inhibiční zóny je nutno vzít do úvahy.
Zvlášť důležité je prozkoumat kolonie rostoucí uvnitř zóny kolem klindamycinu.
6. Obrázky a příklady odečítání uvádí Návod k odečítání diskové difuze u anaerobních bakterií na FFA.

Kontrola kvality

1. Kontrola kvality (QC) se provádí při každém vyšetření. Použije se kultura kontrolních kmenů inkubovaných přes noc a stejný postup vyšetření jako u klinických izolátů.
 - a. K monitorování testu se použije *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 a *Clostridium perfringens* ATCC 13124. Rozmezí a cíle QC jsou v tabulce uvedené níže.
 - b. K monitorování anaerobního prostředí slouží *Clostridium perfringens* DSM 25589 a disk s 5 µg metronidazolu. Bylo prokázáno, že tato kombinace je citlivým indikátorem anaerobního prostředí. Nedostatečná anaerobióza může ovlivnit růst a výsledky vyšetření citlivosti anaerobů. Interpretací kritéria jsou uvedeny níže v tabulce.
 - i. Zvláštní pozornost vyžaduje anaerobní prostředí pracovních stanic. Pravidelný servis a technická kontrola jsou nezbytné.

Odstranění problémů

Pro výsledky mimo rozmezí existuje jeden nebo více důvodů. Pro zajištění spolehlivých výsledků je nutné přísně dodržovat vyšetření.

Návod pro odstranění problémů:

- a. Půda
 - i. Jsou plotny FAA skladovány a sušeny podle výše uvedených pokynů?
 - ii. Je hloubka agaru $4,0 \pm 0,5$ mm? Cílová hloubka je 4,0 mm, tudíž hodnoty $\pm 0,5$ mm je možné připustit jako náhodné, nikoli systematické odchylky.
- b. Očkování ploten
 - i. Dbá se na to, aby inokulum bylo rovnoměrně a bez mezer rozetřeno po celém povrchu agaru.
 1. To je zvláště důležité u druhů rostoucích na FFA v malých koloniích, jako *Cutibacterium acnes*.
 - ii. U *Bacteroides* spp. je třeba zajistit odstranění přebytečné tekutiny otáčením tamponu proti vnitřní stěně zkumavky, aby nedošlo k naočkování přílišného množství inokula.

- c. Disky s antibiotiky
 - i. Počet disků na plotně je třeba omezit a umožnit tak neomezený růst a vytváření nepřekrývajících se zón. Na kruhové 90 mm plotně se u většiny druhů se použijí tři disky s antibiotiky.
 - ii. Před otevřením se kazety ponechají v pokojové teplotě pro temperování disků a zkontroluje se, zda byly dodrženy podmínky pro skladování disků.
- d. Inkubace
 - i. Anaerobní atmosféra se kontroluje pravidelně (bez ohledu na to, jak vznikla).
 - 1. Anaerobní atmosféra pracovních stanic vyžaduje pravidelný servis a technickou kontrolu. Atmosféru a teplotu může ovlivnit to, jak často se systém otevírá pro vkládání a vykládání ploten, a také množství ploten v pracovní stanici.
 - 2. Při použití anaerobních nádob pro kultivaci je zapotřebí se ujistit, že nedochází k úniku plynu.
 - ii. Breakpointy a kritéria kontroly kvality diskové difuze pro anaerobní bakterie EUCAST na FAA platí pouze pro 16-20 h inkubaci.
 - 1. Prodloužení inkubace není povoleno, neboť výrazně ovlivňuje velikost zón.
- e. Odečítání zón
 - i. Je třeba se ujistit, že byly dodrženy výše uvedené konkrétní pokyny pro odečítání u anaerobů. Obrázky a příklady odečítání uvádí Návod k odečítání diskové difuze u anaerobních bakterií na FFA.

Prozatímní kritéria EUCAST pro kontrolu kvality diskové difuzní metody EUCAST na agaru pro náročné anaeroby (FAA)

***Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (CNCTC 5632^T)** (NCTC 9343, DSM 2151, CCUG 4856T)

Antibiotikum	Obsah disku (µg)	Průměr inhibiční zóny (mm)	
		Cíl ¹	Rozmezí ¹
Piperacilin-tazobaktam ²	30-6	32	29-35
Meropenem	10	35-36	32-39
Klindamycin	2	26	23-29
Metronidazol	5	32-33	29-36

***Clostridium perfringens* ATCC 13124 (CNCTC 5467^T)** (NCTC 8237, CIP 103409, DSM 756, CCUG 1795T, CECT 376 T)

Antibiotikum	Obsah disku (µg)	Průměr inhibiční zóny (mm)	
		Cíl ¹	Rozmezí ¹
Benzylopenicilin	1 J	26	23-29
Piperacilin-tazobaktam ²	30-6	33	30-36
Meropenem	10	37	34-40
Vankomycin	5	17	14-20
Klindamycin	2	23	20-26
Metronidazol	5	23	20-26

¹ V tabulkách pro kontrolu kvality (QC) EUCAST jsou uvedeny cíle i rozsahy průměrů inhibičních zón. Opakované vyšetřování kmenů pro kontrolu kvality EUCAST by mělo poskytnout hodnoty průměrů jednotlivých zón náhodně distribuované v doporučených rozmezích. Při počtu testů ≥ 10 by se měl střední průměr zóny blížit cílové hodnotě (optimálně ± 1 mm od cíle).

² Pro kontrolu kvality složky inhibitoru, viz Routine control for β -lactam-inhibitor combinations v EUCAST QC Tables (https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/quality_control/), český překlad viz Tabulky pro kontrolu kvality EUCAST (<http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast>).

Kontrola anaerobního prostředí při použití diskové difuzní metody EUCAST na agaru pro náročné anaeroby (FAA)

***Clostridium perfringens* DSM 25589** (CCUG 75076)

Antibiotikum	Obsah disku (µg)	Cut-off ¹ (mm)
Metronidazol	5	<25

¹ Průměr zóny < 25 mm značí nedostatečnou anaerobiózu. To může ovlivnit růst a výsledky vyšetření citlivosti anaerobních bakterií.