



EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST

návod k odečítání bujónové mikrodiluce

Verze 4.0
Leden 2022

Změny od předchozí verze (3.0)

Obrázek	Změna
15	Vysvětlení, že specifické instrukce pro odečítání bakteriostatických antibiotik u gramnegativních bakterií platí pro všechna bakteriostatická antibiotika.

Bujónová mikrodiluce

- Bujónová mikrodiluce je referenční metoda pro vyšetřování citlivosti rychle rostoucích aerobních bakterií, s výjimkou mecilinamu a fosfomycinu, pro které je referenční agarová diluční metoda.
- EUCAST doporučuje testování dle Mezinárodního standardu ISO 20776-1, avšak pro náročné bakterie se použije bujón MH-F (Mueller-Hinton bujón obohacený 5 % lyzované koňské krve a 20 mg/l β -NAD, viz instrukce pro přípravu na www.eucast.org).
- Výsledky se odečítají jako nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu - minimální inhibiční koncentrace (MIC), vyjádřená v mg/l nebo μ g/ml.

Odečítání bujónové mikrodiluce

Výsledky platí, splňují-li následující kritéria:

- Dostatečný růst, tzn. zřetelný knoflík (na dně jamky) nebo jednoznačný zákal v pozitivní kontrole růstu.
- Čistá kultura
 - Čistota se kontroluje současnou kultivací neselektivního agaru, naočkovaného z jamky pro kontrolu růstu ihned po její inokulaci.
- Správné inokulum 5×10^5 CFU/ml
 - Počet životaschopných kolonií lze zjistit odebráním 10 μ l z jamky pro kontrolu růstu ihned po inokulaci do 10 ml fyziologického roztoku. Po promíchání se 100 μ l inokuluje a rozetře na plotnu s neselektivním agarem. Po inkubaci by měl být počet kolonií přibližně 20-80.

Vzhled růstu

- Růst se projeví zákalem nebo jako usazenina buněk na dně jamky. Vzhled růstu se liší v závislosti na testovaném mikroorganismu a na antibiotiku.
- V jamkách s kulatým dnem se růst projeví jako knoflík/peleta uprostřed jamky. V jamkách s plochým dnem může být růst rozptýlen.
- Růst v jamkách s antibiotiky se může lišit od růstu v jamkách s pozitivní kontrolou růstu, a to i u čistých kultur.

Odečítání koncových bodů MIC

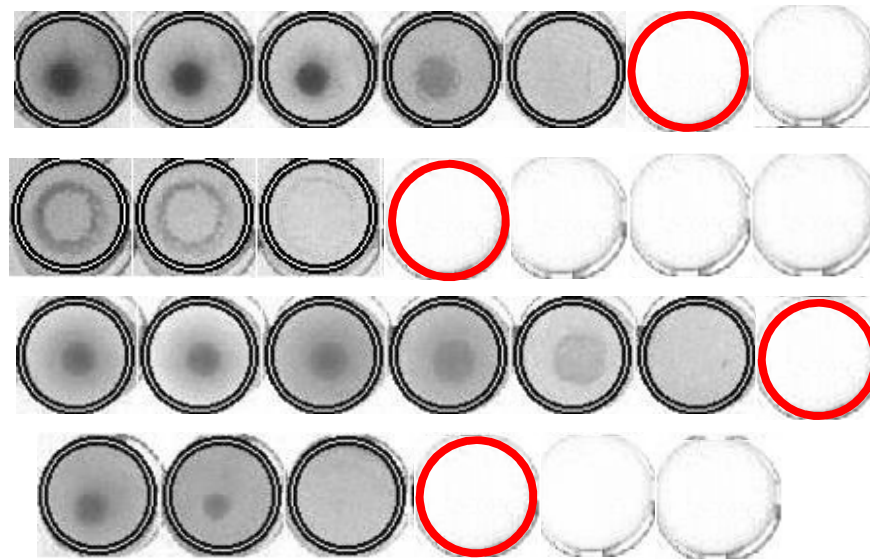
- Výsledky by měly být odečítány manuálně. Odečítání usnadňuje použití zrcadla.
- Jsou-li použity automatické odečítače nebo kamerové systémy, musí být kalibrovány podle manuálního odečítání.
- MIC se odečítá jako nejnižší koncentrace antibiotika, která kompletně inhibuje růst detekovaný pouhým okem. Výjimky, viz obrázky na str. 12-16.

Vlekoucí se koncové body

- U většiny kombinací antibiotikum-bakterie jsou koncové body zřetelné.
- U některých kombinací antibiotikum-bakterie se koncové body táhnou přes 2-3 jamky s postupným slábnutím růstu.
- Pokud není uvedeno jinak, pak koncové body by měly být odečítány až při úplné inhibici růstu (výjimky, viz str. 12-16).

Zákal bez knoflíku

- Zastření nebo zákal v jamce bez knoflíku (pelety) se vyskytuje u *Pseudomonas* spp. a *Acinetobacter* spp. Pokládá se za růst a koncový bod se odečítá v první jamce s úplnou inhibicí (čirý bujón).



Hemolýza

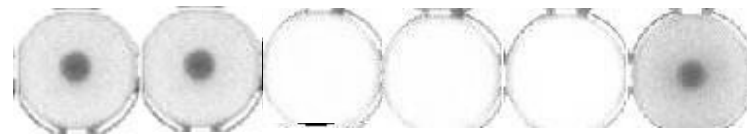
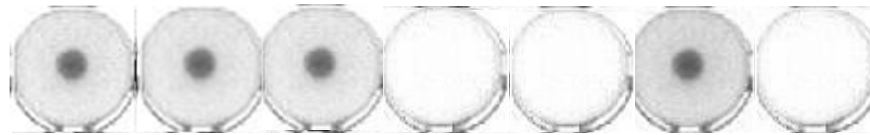
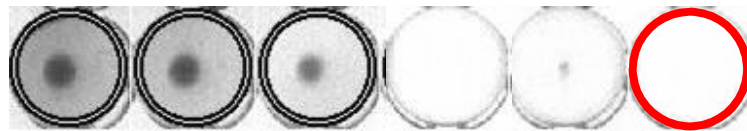
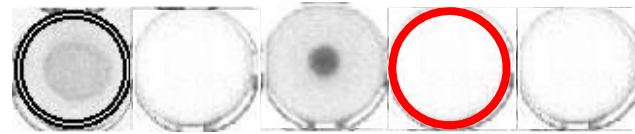
- Náročné bakterie mohou hemolyzovat krev v bujónu MH-F. To je často doprovázeno přítomností zákalu (nebo knoflíku/pelety).
- Při určování koncových bodů by hemolýza nebo zákal měly být považovány za růst.



Vynechané jamky

- Občas může být pozorován přeskok, tj. vynechaná, prázdná jamka, obklopená jamkami vykazujícími růst. Existuje několik možných vysvětlení, včetně nesprávné inokulace, kontaminace, heterogenní rezistence apod.
- Vyskytne-li se jedna prázdná jamka, izolát se retestuje, nebo se odečte nejvyšší hodnota MIC, aby se předešlo hlášení falešné citlivosti.
- Výsledky vyšetření s více než jednou prázdnou jamkou se nehlásí.

Příklady vynechaných jamek



Retestovat nebo
odečíst nejvyšší
hodnotu MIC!

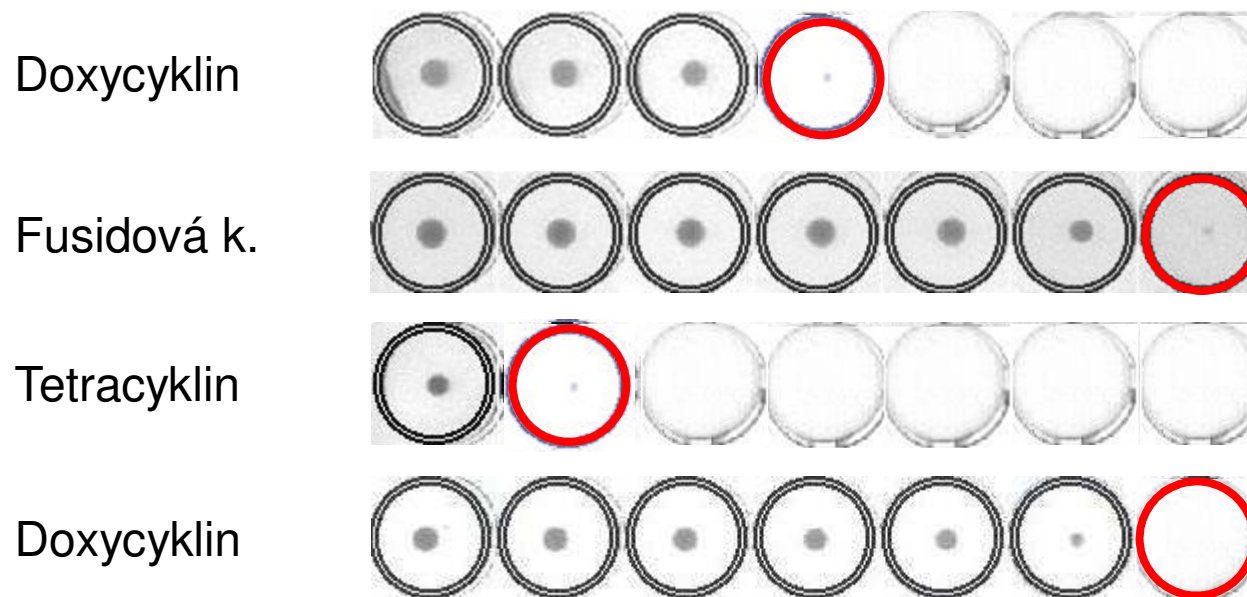
Neplatné výsledky!

Zvláštní pokyny pro odečítání

- Zvláštní pokyny pro odečítání vyžadují následující kombinace:
 - Bakteriostatická antibiotika u grampozitivních i gramnegativních bakterií
 - Trimetoprim a trimetoprim-sulfametoxazol
 - Cefiderokol

Grampozitivní koky s bakteriostatickými antibiotiky

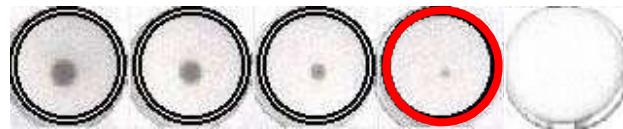
- Tečkovitý růst (drobná tečka) se přehlíží.



Grampozitivní koky s bakteriostatickými antibiotiky

- Tečkovitý vlekoucí se růst (drobné tečky) se přehlíží.

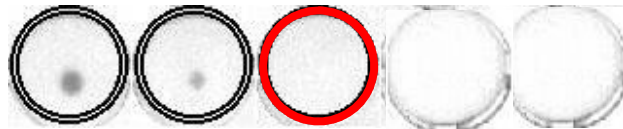
Linezolid



Linezolid



Tedizolid

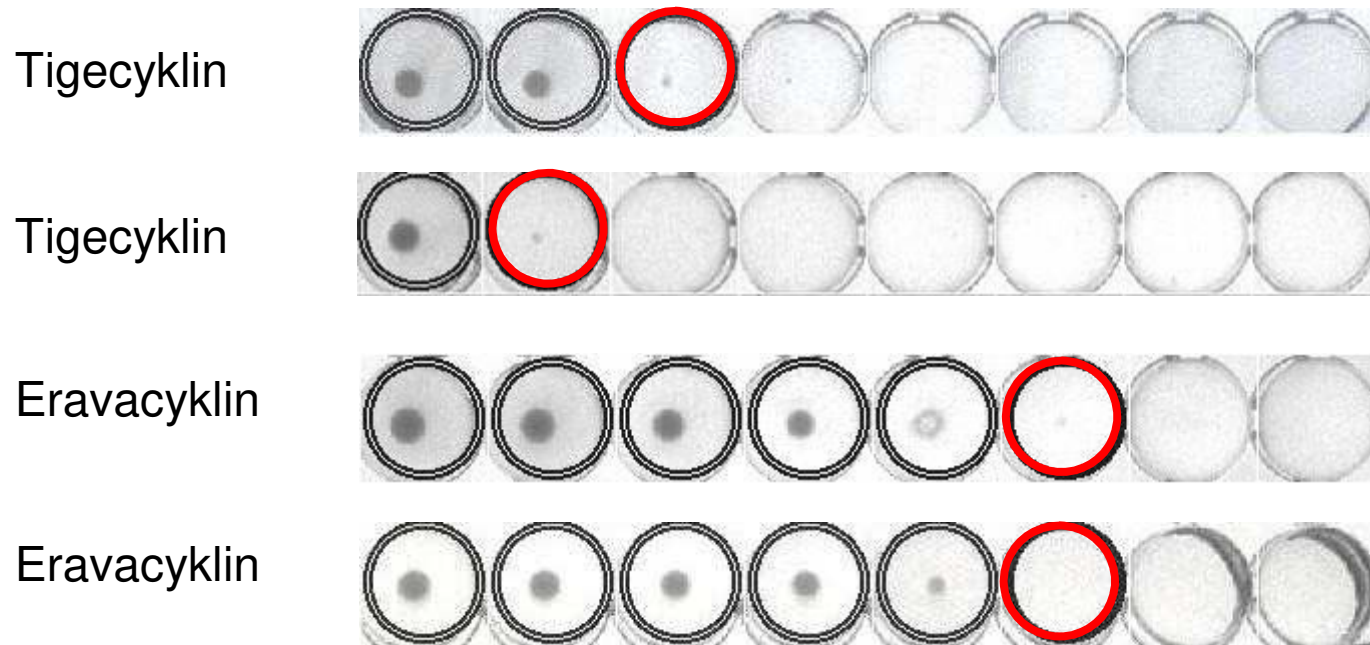


Tedizolid



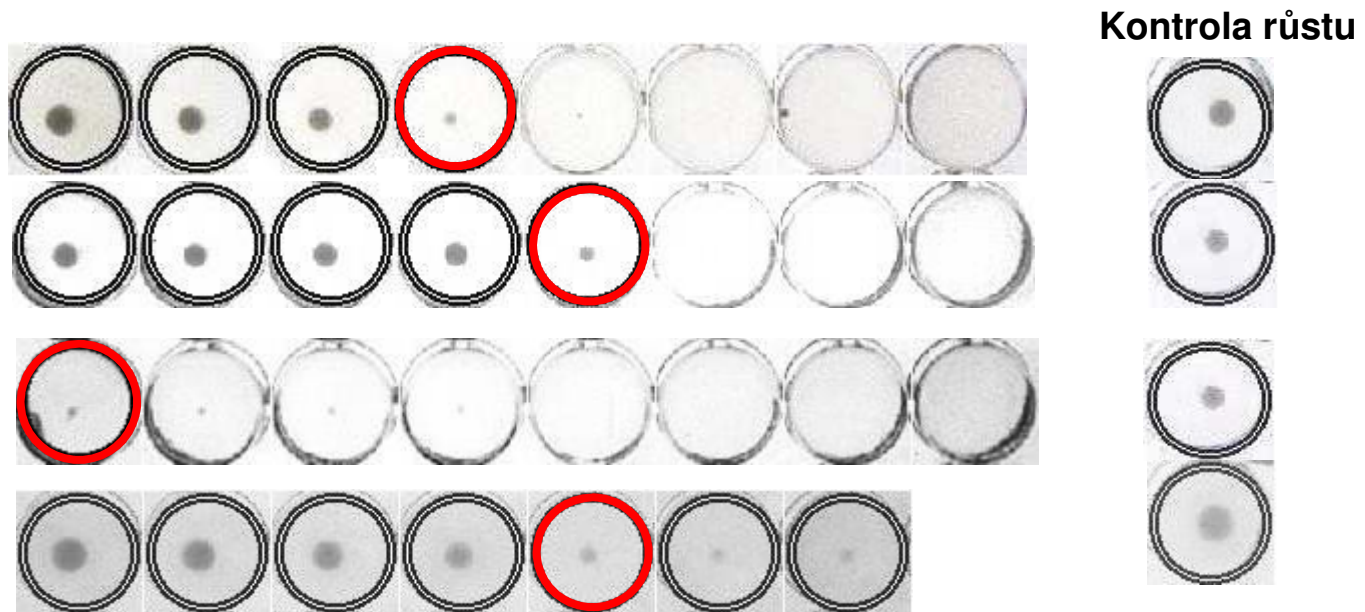
Gramnegativní bakterie a bakteriostatická antibiotika

- Tečkovitý vlekoucí se růst (drobné tečky) se přehlíží.



Trimetoprim a trimetoprim-sulfametoxazol

MIC se odečítá jako nejnižší koncentrace, která inhibuje $\geq 80\%$ růstu ve srovnání s jamkou pro kontrolu růstu.

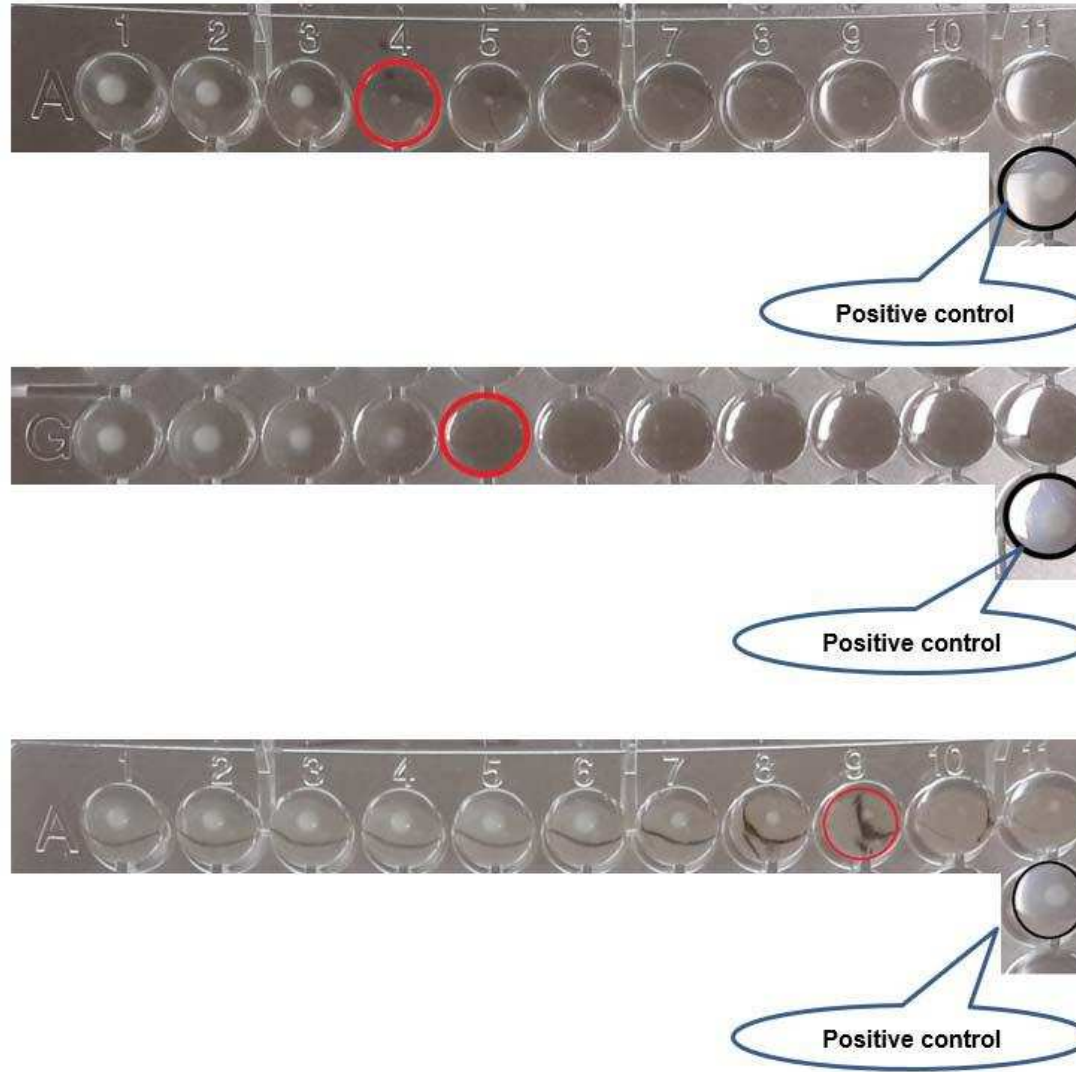


Cefiderokol

- MIC bujónovou mikrodilucí se musí vyšetřovat v Mueller-Hinton bujónu bez železa a odečítání vyžaduje specifické pokyny, viz https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/guidance_documents/, český překlad, viz <http://www.szu.cz/dalsi-dokumenty-s-pokyny-pri-testovani-citlivosti-eucast>
- MIC se odečítá v první jamce, v níž je růst potlačen a vytváří tečku < 1 mm, slabý zákal nebo lehký opar.
- Růst pozitivní kontroly musí být silný a vytvářet knoflík > 2 mm, nebo hustý zákal.
- Na následující straně jsou obrázky s příklady odečítání.

Cefiderokol

17



18

Interpretace výsledků

- Před hlášením výsledků klinických izolátů je zapotřebí se ujistit, že hodnoty MIC příslušných kmenů pro kontrolu kvality jsou v přijatelném rozmezí.
 - viz kritéria pro kontrolu kvality v EUCAST QC Tables (www.eucast.org), (český překlad [Tabulky pro kontrolu kvality](#) EUCAST).
- Hodnoty MIC se interpretují v kategoriích citlivosti (C, I a R) podle aktuálních EUCAST Breakpoint Tables (www.eucast.org), (český překlad [Tabulky breakpointů](#) EUCAST).

X EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases