



СТАНДАРДНИ ОПЕРАТИВНИ ПОСТУПАК

Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“
Референтна лабораторија за *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*

*Испитивање осетљивости *Salmonella enterica* на антимикробне агенсе диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST*

Ознака:	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:
SOP_DDT_Salm	II	30/05/2024	1//13	Наташа Галић




**Исшитување осетљивости *Salmonella* на антимикуробне агенсе
диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST**

Ознака: SOP_DDT_Salm	Издање: II	Важи од: 30/05/2024	Страница: 2/13	Ауторизација: Наташа Галић
-------------------------	---------------	------------------------	-------------------	-------------------------------

Историја измена документа и верзије

Верзија	Измена у поглављу	Опис измене	Датум важења	Ауторизација
1			1/12/2023	
2	Заглавље	Изглед Наслов микроорганизма <i>Salmonella</i> spp. → <i>Salmonella enterica</i>	30/05/2024	Наташа Галић
	Сва поглавља	Нумерација јер је уклоњен наслов (поглавље 1)		
	Поглавље 4 Подлоге и реагенси	Антимикуробни агенси за потврду ESBL/рAmpC фенотипа Вредност контролног интервала за GN10 <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>		
	Поглавље 6	Додат булит Б) Чување антимикуробних дискова		
	Поглавље 7	Додатак за колистин (МИК) Додатак за потврду фенотипова ESBL/рAmpC Наведена за колистин (МИК) Наведена за вероватан ESBL/рAmpC		
	Прилог 2. EUCAST клиничке и епидемиолошке граничне вредности антимикуробних агенаса за <i>Salmonella</i> <i>enterica</i>	Маркирани антимикуробни агенси у табели у Прилогу 2 (CTX, CAZ, COL, CRO)		

	Испитивање осетљивости <i>Salmonella</i> на антимиљробне агенсе диск дифузионом тестом према стандарду EUCAST				
	Ознака:	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:
	SOP_DDT_Salm	II	30/05/2024	3/13	Наташа Галић

СТАТУС ДОКУМЕНТА

Документ је препорука Референтне лабораторије за *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* (даље НРЛ) и нема статус националног водича добре лабораторијске праксе.

Стандардни оперативни поступак су написали стручњаци из НРЛ користећи референтну литературу из предметне области и узимајући у обзир капацитете и потребе микробиолошких лабораторија садржаних у извештају „Мапирање и евалуација националних капацитета за детекцију и карактеризацију хуманих *Salmonella* у локалним и регионалним лабораторијама у Републици Србији“ из септембра 2023. Намена документа је стандардизација свих фаза лабораторијског испитивања у оквиру микробиолошке дијагностике узрочника заразних болести из домена референтности НРЛ.


Документ није обавезујући али предлаже се примена СОП до објаве националних водича добре лабораторијске праксе из области микробиологије.

ЗАКОНСКИ ОСНОВ

Према Закону о заштити становништва од заразних болести („Сл. гласник РС“ бр. 15/16, 68/20 и 136/20) обавезно је спровођење епидемиолошког надзора и примене мера за спречавање и сузбијање заразних болести из домена референтности које се преносе храном, водом и животном средином (салмонелоза, трбушни тифус, паратифус, јерсиниоза, шигелоза, колера). У свим случајевима појаве или сумње на појаву заразне болести према чл. 21. Закона обавезно је лабораторијско испитивање ради утврђивања и типизације узрочника.

Према Номенклатури здравствених лабораторијских услуга на примарном, секундарном и терцијарном нивоу („Сл. гласник РС“ бр. 70/19, област VI– микробиолошке анализе, услуге из бактериологије) лабораторијске услуге **„Испитивање осетљивости бактерија на антибиотике, диск дифузионом методом, на прву линију по усвојеном стандарду“** и **„Испитивање осетљивости бактерија на антибиотике, диск дифузионом методом, на другу и трећу линију по усвојеном стандарду“** треба спроводити за изолате *Salmonella enterica*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* хуманог порекла у циљу праћења појаве антимиљробне резистенције (AMP) и на захтев клиничара код одређених индикација у терапијске сврхе (инвазивна инфекција, имуносупримирана стања, хронична запаљенска обољења црева...)

Према Правилнику о ценама лабораторијских здравствених услуга на примарном, секундарном и терцијарном нивоу („Сл. гласник РС“ бр. 132/21) наведене услуге су означене шифрама L020008 (... за прву линију) и L019992 (...за другу и/или трећу линију).

	Испитивање осетљивости <i>Salmonella</i> на антимикробне агенсе диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST			
	Ознака: SOP_DDT_Salm	Издање: II	Важи од: 30/05/2024	Страница: 4/13

1. Предмет

СОП описује испитивање осетљивости на антимикробне агенсе диск дифузионим тестом (антибиограм) хуманих изолата *Salmonella enterica* према EUCAST стандарду и из њега изведеном референтном документу „EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates“.

Наведена литература препоручује тестирање изолата *Salmonella enterica* на бројне антимикробне агенсе, између осталих и колистин. **Методологија испитивања осетљивости на колистин није предмет овог СОП-а јер се примењује искључиво бујон микродилуциони тест.**

Антибиограм *Salmonella enterica* се врши у циљу праћења појаве АМП али и у терапијске сврхе на захтев клиничара (инвазивна инфекција, имунокомпромитоване особе, бебе и старе особе са тежом клиничком сликом, пацијенти са основним интестиналним болестима ...).

Тестира се широка палета антимикробних агенаса од значаја за јавно здравље и здравље животиња, одређених маркера АМП и агенаса као резервних лекова код системске салмонелозе узроковане мултирезистентним сојевима (нпр. тигециклин, азитромицин).

2. Скраћенице и дефиниције

ATCC	American Type Culture Collection
AMP	резистенција на антимикробне агенсе
CFU	Colony Forming Unit
ESBL	β-лактамазе проширеног спектра
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
РГ	риична група микроорганизама или група биолошке штетности

3. Безбедно руковање

При раду је обавезно придржавање мера за безбедан рад које важе за лабораторију нивоа 2 биолошког изоловања. Употребљени материјал разврстан према врсти, одлагати у за то предвиђене контејнере за стерилизацију инфективног отпада. *Salmonella enterica* припадају микроорганизмима РГ 2 са изузетом *S. Typhi* 3(*).

Уколико се ради велики број тестова, због стварања аеросола процедуру треба изводити у биосигурносном кабинету класе II.

4. Подлоге и реагенси

- Mueller-Hinton агар (МНА, плоче Ø 90mm)
 - рН 7.2-7.4
 - 4.0±0.5mm
- Антибиограм дискови
 1. Ампицилин (АМ₁₀)
 2. Пефлоксацин (РЕФ₅)
 3. Цефотаксим (СТХ₅)
 4. Меропенем (МЕМ₁₀)

ОБАВЕЗНО
прва линија



**Испитивање осетљивости *Salmonella* на антимикробне агенсе
диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST**

Ознака:	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:
SOP_DDT_Salm	II	30/05/2024	5/13	Наташа Галић

5. Тетрациклин (TET₃₀)
6. Цефтазидим (CAZ₁₀)
7. Хлорамфеникол (CHL₃₀)
8. Сулфаметоксазол (RL₁₀₀) Oxoid
9. Триметоприм (TMP₅)
10. Азитромицин (AZM₁₅)
11. Тигециклин (TGC₁₀)
12. Гентамицин (GN₁₀)
13. Триметоприм/сулфаметоксазол (SXT_{1.25/23.75})
14. Налидиксинска кис. (NAL₃₀)

ОПЦИОНО

15. Цефокситин (FOX₃₀)
16. Цефепим (FEP₃₀)

Друга линија

17. Цефотаксим/клавуланска кис.(CTX/CLA₃₀₊₁₀) : Цефотаксим (Caz₃₀)
18. Цефтазидим/клавуланскакис.(CAZ/CLA₃₀₊₁₀):Цефтазидим (Ctx₃₀)
- или
19. Цефотаксим/клавуланска кис.(Ctx/CLA₅₊₁₀) : Цефотаксим (Ctx₅)
20. Цефтазидим/клавуланска кис.(Caz/CLA₁₀₊₁₀):Цефтазидим (Caz₁₀)

Потврда
вероватног
ESBL или
pAmpC
фенотипа

- Неселективна подлога 5% крвни агар (КА) или хранљиви агар (НА)
- 0.85% NaCl 5 ml (FR)
- 0.5 McFarland стандард (~ 1-2x10⁸ CFU/ml за *Escherichia coli*)

5. Опрема и потрошни материјал

- Инкубатор за аеробну култивацију на 35±1 °C
- Дензитометар
- Вортекс
- Фрижидер са комором за замрзавање
- Калипер или мерач зоне инхибиције
- Тамна подлога за мерење
- Стерилни комерцијални брисеви
- Стерилне езе
- Стерилне епрувете
- Ппинцете или диск диспензер дискова

6. Интерна контрола квалитета

А) Mueller Hinton agar

- Обавезна је контрола квалитета сваког новог лота МНА референтним културама *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 због нестандардизоване концентрације Ca²⁺ и Mg²⁺ и тимина у подлози.
- Висока или ниска концентрација двовалентних катјона у подлози се открива смањивањем или повећањем зона инхибиције у односу на контролни интервал (циљану вредност) тестирањем референтним *P. aeruginosa*. Висока концентрација



**Испитивање осетљивости *Salmonella* на антимиљробне агенсе
диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST**

Ознака:	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:
SOP_DDT_Salm	II	30/05/2024	6/13	Наташа Галић

тимиња и тимидина у подлози се открива смањивањем зоне инхибиције у односу на стандард тестирањем референтним *E. faecalis* (Табела 1.)

- Измерене зоне инхибиције око наведених агенаса морају да буду унутар вредности задатог интервала да би се тестирана серија подлоге прогласила одговарајућом

Табела 1. Контрола квалитета МНА стандардним

Антимиљробни агенс (диск)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	
	Циљана вредност (mm)	Контролни интервал (mm)	Циљана вредност (mm)	Контролни интервал (mm)
Сулфаметоксазол/триметоприм (SXT 25)	/		30	26-34
Гентамицин (GN 10)	20	17-23	/	/
Амикацин (АМК 30)	23	20-26	/	/

Б) Чување антибиограм дискова

- Неотворена паковања се чувају према упутству произвођача, нпр. у замрзивачу $\leq -18^{\circ}\text{C}$ због одржавања стабилности антибиотика (нарочито осетљиви β -лактами) и/или у фрижидеру на $2-8^{\circ}\text{C}$ до истека рока трајања
- Отворени кетрици са дисковима се чувају у фрижидеру у затвореним диспензерима или епруветама са десикатором (зрна силика гел)
- Пре коришћења дискови се темперирају 30 минута на собној температури
- Користе се искључиво дискови у року трајања

В) Диск дифузиони тест

- Придржавати се актуелне верзије стандарда која се обављује почетком јануара једном годишње. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria
- Обавезно спроводити редовну контролу панела антимиљробних агенаса тестирањем референтном културом *Escherichia coli* ATCC25922, 4/5 дана недељно 20 узастопних дана.
- За интерпретацију измерених вредности (mm) дијаметра зона инхибиције око диска придржавати се контролних интервала за контролни микроорганизам (Прилог 1).
- За контролу потврдног комбинованог диск дифузионог теста за фенотип ESBL/pAmpC користити референтну културу *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (β -лактамаза SHV-18 позитиван) са комбинованим дисковима цефалоспорина са клавуланском киселином (види Подлоге и реагенци).
- Контролне плоче очитати ујутро пре клиничких тестова.
- Уколико за тестирани антибиотик “искоче“ два неузастопна резултата (зоне инхибиције) од 20 мерења занемарити искакање и очитати клиничке антибиограме
- Уколико за антибиотик “искоче“ два узастопна резултата (зоне инхибиције) не пријављивати осетљивост за тај антибиотик, истражити узрок грешке и поновити тестирање тог агенса.



**Испитивање осетљивости *Salmonella* на антимиљробне агенсе
диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST**

Ознака:	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:
SOP_DDT_Salm	II	30/05/2024	7/13	Наташа Галић

- Уколико за антибиотик “искочи“ више од два резултата (зоне инхибиције) не пријављивати осетљивост за тај агенс, истражити узрок грешке и поновити тестирање тог агенса.
- Резултате приказати графички.
- Разматрати резултате 20 тестова по агенсу, учити трендове.

7. Процедура ДДТ

МНА плоча се инокулише стандардизованим инокулумом тестираног изолата и на њу се постављају антибиотски дискови са стандардизованом потенцијом које наводи стандард EUCAST. Чим дође у контакт са површином агара почиње дифузија антимиљробног агенса са диска због чега се метода изводи у дефинисаном времену »15-15-15 минута«. Плоче се инкубирају у стандардизованим условима за које време агенси дифундују у подлогу и (не)инхибишу раст тестираног изолата формирајући зоне инхибиције. Измерене зоне инхибиције (mm) за дати агенс код *Salmonella enterica* се интерпретирају на основу клиничких граничних вредности (клиничка резистенција, $S \geq$, $R <$) према у терапијске сврхе, а у сврху надзора према епидемиолошким граничним вредностима (микробиолошка резистенција, „non-wild type“ фенотипски детектабилна резистенција $NWT <$) наведеним у стандарду EUCAST и изведеном документу у Прилог 2.

Стандардизација сваке фазе тестирања је неопходна јер је тест високо зависан од варијација густине инокулума, формулације, дебљине и влажности подлоге, начина инокулисања плоча, употребе брисева направљених у лабораторији, варијације потенције дискова (сертификата о анализи дискова треба да садржи овај податак), услова чувања дискова, услова инкубације, правилног начина мерења зона инхибиције.

Примењује се правило »15-15-15 минута«!

1. Инокулисати подлогу у наредних 15 минута од припреме суспензије
2. Поставити дискове на инокулисану подлогу у наредних 15 минута
3. Тест поставити на инкубацију у наредних 15 минута.


7.1. Припрема МНА подлоге

- Подлогу разливати у Петри шоље Ø 90 mm (20-25 ml подлоге) да се добије дебљина 4 mm
- Пре употребе плоче из фрижидера сушити у инкубатору, али водити рачуна да се избегне пресушивање, не сме бити конденза на подлози или поклопцу јер зоне инхибиције буду неправилне
- Елиминисати танке, дебеле плоче, са дефектима или пресушене

7.2. Прављење инкулума и инокулисање МНА

Инокулум је вероватно фактор који највише варира у извођењу теста и зато има значајан утицај на величину зоне инхибиције. За тестирање *Enterobacteriales* користи се инокулум густине који одговара густини суспензије 0.5 McFarland (~1-2 x 10⁸ CFU/ml).

Обзиром да су *Salmonella* брзорастући микроорганизми примењује се »метод директне суспензије преконоћне културе«.

	Испитивање осетљивости <i>Salmonella</i> на антимикробне агенсе диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST				
	Ознака:	Издање:	Важи од:	Страница:	Ауторизација:
	SOP_DDT_Salm	II	30/05/2024	8/13	Наташа Галић


- Стерилном езом/брисем покупити најмање 3-4 исте колоније (избегава се селекција мутаната) са преконоћне културе са неселективне подлоге (КР или НА). Ресуспендовати у 5 ml FR да се добије хомогена бактеријска суспензија за инокулум
- Стандарде за калибрацију (McFarland стандарди) дензимата (0.5, 1, 2, 4) неколико пута окренути горе-доле па измерити густину и тако га калибрирати
- Вортексисати бактеријску суспензију
- Измерити густину суспензије дензиматом и подесити на 0.5 додавањем колоније или FR у суспензију зависно од измерене вредности
- Инокулум засејати на потребан број плоча у оптималних 15 минута
- Стерилини брис (искључиво комерцијални) уронити у инокулум, добро га оцедити окретањем бриса о унутрашње зидове епрувете
- Размазивати брис три пута по МНА у три правца под углом 60°
- Исти брис уронити у инокулум и поновити поступак за засејавање друге и треће плоче
- Вишак инокулума са подлоге отклонити повлачењем врха бриса дуж обима подлоге
- Инокулисану подлогу не поклапати наредних 5 минута да би испарио вишак течности

7.3. Постављање антимикробних дискова на МНА

- У наредних 15 минута поставити дискове на плоче диспензером или стерилном и охлађеном пинцетом (прва линија/ 1. плоча; друга линија/ 2. и 3. плоча са 4 и 3 диска, по реду)
- Максимално 4 или 5 дискова на једној плочи да се зоне инхибиције не поклапају
- Уколико се постави већи број дискова зоне инхибиције ће се преклопити и тест треба поновити
- Сваки диск притиснути на подлогу пинцетом да би се цео залепио на подлогу
- Постављен диск не померати јер одмах започиње дифузија агенса и померање ће довести до деформације зоне
- Уколико се дискови поставе исувише близу долази до дисторзије зона због антагонизма, синергизма, инхибиције и/или индукције. Ове појаве треба занемарити приликом мерења зона али је важна информација о могућим механизмима резистенције
- **НАПОМЕНА:** Осетљивост на **колистин ИСКЉУЧИВО** тестирати применом **бујон микродилуционог теста**, не примењивати ДДТ или градијент тест (Е тест).
- За потврду ESBL/pAmpC фенотипа користити претходно наведене дискове (поглавље 5, 17.-20.) најбоље по два (агенс + комбиновани агенс са клавуланатом) на свакој плочи да би се избегло преклапање зона инхибиције, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Miscellaneous/Guidance_document_Confirmation_of_ESBL.pdf

7.4. Инкубација ДДТ

- Инокулисане подлоге са поклопцима окренутим надоле ставити у инкубатор на аеробну култивацију 35±1 °C 18±2 часова, постављене у стуб висине до 5 плоча

	Испитивање осетљивости <i>Salmonella</i> на антимиљробне агенсе диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST			
	Ознака: SOP_DDT_Salm	Издање: II	Важи од: 30/05/2024	Страница: 9/13

- Уколико се не поштује правило почетка инкубације у року од 15 min већ се продужи, доћи ће до дифузије агенса у подлогу што ће резултирати превеликим зонама инхибиције

7.5. Мерење зона инхибиције и интерпретација резултата ДДТ

Уколико је процедура извођења теста испоштована раст културе треба да буде конфлуентан (Слика А). Ако се виде појединачне колоније, инокулум је недовољно густ и тест треба поновити (Слика Б).

- Пречник зоне инхибиције мерити без коришћења увеличавајућег стакла са задње стране подлоге удаљене 30 cm од тамне подлоге испод, држећи плочу под углом од 45 степени уз упадну светлост (Слика Ц)
- Пречник зоне инхибиције се мери на тачкама одсуства раста, (Слика Д) уколико није другачије наведено (нпр. Триметоприм и/или сулфонамиди Слика Е)
- Проверити изглед зона инхибиције, морају бити округле
- Уколико нема зоне раста око диска, уписује се вредност 6 mm (дијаметар диска)
- Код неких брендова МНА појављује се дупла зона инхибиције (бедемаста ивица) око аминопеницилина, унутрашњи прстен у том случају треба занемарити и прочитати спољашњу зону инхибиције
- Код појаве појединачних колонија у зони узети их у обзир уколико је чиста култура, а ако је мешана култура ретестирати за наведени диск
- Код тестирања *Enterobacteriales* се око неких антимиљробних агенаса формира нејасно ограничена зона инхибиције („fuzzy“), треба је прочитавати на тачкама комплетне инхибиције (Слика Ф)
- За потврду ESBL/pAmpC фенотипа уочити присуство или одсуство појаве синергизма тј. проширење дијаметра зоне инхибиције око дискова са клавуланском киселином у односу на диск цефотаксима или/и цефтазидима ≥ 5 mm

Уколико се ради антибиограм у терапијске сврхе НРЛ користити клиничке граничне вредности за интерпретацију категорија осетљивости (колоне $S \geq$, $R <$; Прилог 2).

Уколико се ради антибиорам у циљу праћења АМР користити епидемиолошке граничних вредности за откривање микробиолошке резистенције односно „non-wild type“ фенотипова (колоне $NWT <$, Прилог 2).

Правила интерпретације резултата ДДТ *Salmonella enterica* на неке антибиотике у терапијске сврхе:

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2019/Salmonella_ExpertRules_V3.2_20190613.pdf

А) Диск **пифлоксацин** се користи за тестирање осетљивости на флуороквинолоне (скрининг за ципрофлоксацин): ако је $S \leq 24$ mm извести $CIP = „S“$, ако је $R < 24$ mm извести $CIP = „R“$. Пифлоксацин обавезно користити јер открива хромозомски и плазмидски условљену резистенцију.

Б) Ако је тестиран **аминогликозид (гентамицин)** не извештавати резултат због недоказане ефикасности *in vivo* код људи.



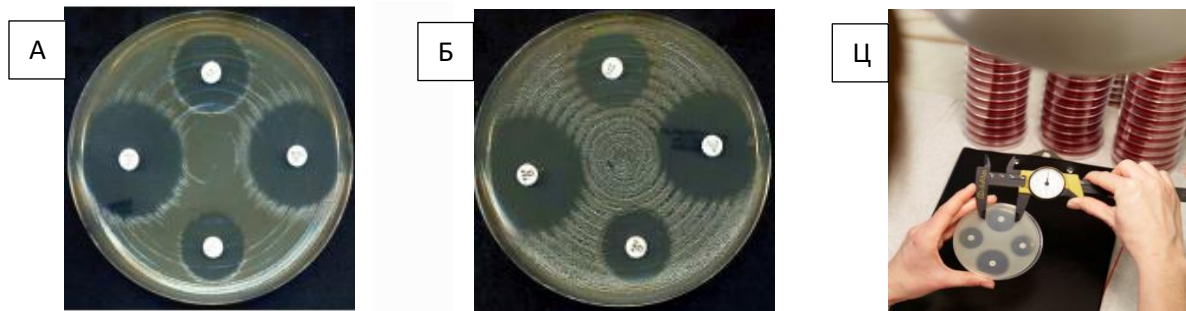
*Испитивање осетљивости Salmonella на антимиљробне агенсе
диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST*

Ознака: SOP_DDT_Salm	Издање: II	Важи од: 30/05/2024	Страница: 10/13	Ауторизација: Наташа Галић
-------------------------	---------------	------------------------	--------------------	-------------------------------

В) Не тестирати осетљивост на **цефалоспорине 2. генерације** или ако се тестира известити као R.

Г) Осетљивост на **колистин** извештавати искључиво као МИК-у ($\mu\text{g/ml}$).

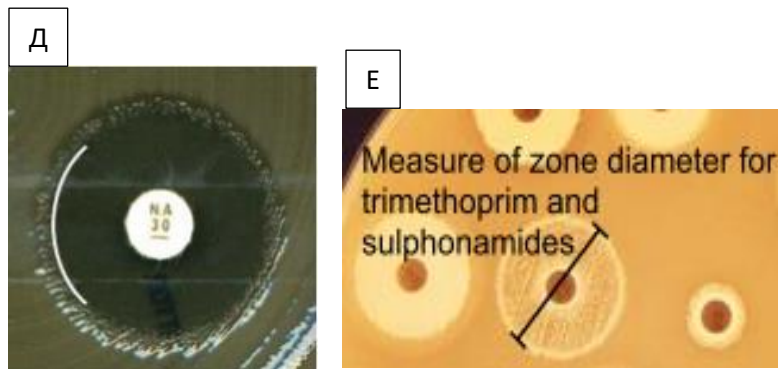
Д) Уколико је откривен **ESBL/pAmpC/Karbaпенemaza** фенотип изолат обавезно послати у НРЛ, а известити уколико се тражи осетљивост на цефалоспорине 3. генерације односно меропенем на основу клиничких граничних вредности.



Слика А, лево: конфлуентан раст културе, **исправан тест**


Слика Б, у средини: није конфлуентан раст културе, **неисправан тест**

Слика Ц, десно: правилно мерење зоне инхибиције



Слика Д, лево: мерење голим оком видљиве зоне потпуне инхибиције (унутрашња зона)

Слика Е, десно: мерење зона инхибиције око бактериостатског диска триметоприма и/или сулфонамида, занемарити раст у виду вела $\sim 20\%$ у зони (дејство агенса није момонетално инхибиторно па се размножава одређен броја генерација културе пре коначне инхибиције раста)

	Испитивање осетљивости <i>Salmonella</i> на антимиљробне агенсе диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST			
	Ознака: SOP_DDT_Salm	Издање: II	Важи од: 30/05/2024	Страница: 11/13

Φ **Fuzzy zone edges**
Enterobacterales

- Hold the plate against a dark background about 30 cm from the naked eye and estimate where the zone edge is. Do not hold the plate up to light (transmitted light) or use a magnifying glass.



Reading of zones with fuzzy zone edges for Enterobacterales.

Слика Φ: мерење нејасно оивичене зоне инхибиције (бела полукружна линија у зони инхибиције око диска)

8. Референце

- Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST, 2024, ver.12
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Manual_v_11.0_EUCAST_Disk_Test_2023.pdf
- EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates. ECDC, 2016. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/eu-protocol-harmonised-monitoring-antimicrobial-resistance-human-salmonella-and-0>
- EUCAST technical guidance on the use of the combination disk test (CDT) for confirmation of ESBL in Enterobacterales. 2019.
https://www.eucast.org/eucast_news/news_singleview?tx_ttnews%5Btt_news%5D=308&cHash=831995c871fe141f961aa7d289162c2
- Правиник о превентивним мерама за безбедан и здрав рад при излагању биолошким штетностима. Службани гласник РС. Бр 96/20 и 115/20.
- Laboratory biosafety manual, fourth edition. Geneva: World Health Organization; 2020 (Laboratory biosafety manual, fourth edition and associated monographs). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/337956/9789240011311-eng.pdf?sequence=1>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 13.2, 2023.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_13.2_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf

Прилог 1.

Табела 2. Интерна контрола квалитета теста - величина зона инхибиције за *E. coli* ATCC 25922



**Испитивање осетљивости *Salmonella* на антимиљробне агенсе
диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST**

Ознака: SOP_DDT_Salm	Издање: II	Важи од: 30/05/2024	Страница: 12/13	Ауторизација: Наташа Галић
-------------------------	---------------	------------------------	--------------------	-------------------------------

Routine QC

EUCAST QC Tables v. 13.2, valid from 2023-06-29

***Escherichia coli* ATCC 25922**

(NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434)

Test according to EUCAST methodology for non-fastidious organisms (MH broth and agar). See EUCAST Breakpoint Tables for short descriptions of MIC and disk diffusion methodology.

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)		Disk content (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	
	Target ¹	Range ²		Target ¹	Range ²
Amikacin	1-2	0.5-4	30	22-23	19-26
Amoxicillin	4	2-8	-	-	-
Amoxicillin-clavulanic acid ^{3,4}	4	2-8	20-10	21	18-24 ⁵
Ampicillin	4	2-8	10	18-19	15-22 ⁵
Ampicillin-sulbactam ^{4,6}	2	1-4	10-10	21-22	19-24 ⁵
Azithromycin	-	-	15	17	14-20 ⁷
Aztreonam	0.125	0.06-0.25	30	32	28-36
Cefadroxil	-	-	30	17	14-20
Cefalexin	8	4-16	30	18	15-21
Cefazolin	2	1-4	30	24	21-27
Cefepime	0.03-0.06	0.016-0.125	30	34	31-37
Cefiderocol ⁸	0.125-0.25	0.06-0.5	30	27	24-30
Cefixime	0.5	0.25-1	5	23	20-26
Cefotaxime	0.06	0.03-0.125	5	28	25-31
Cefoxitin	4	2-8	30	26	23-29
Cefpodoxime	0.5	0.25-1	10	25-26	23-28
Ceftaroline	0.06	0.03-0.125	5	27	24-30
Ceftazidime	0.125-0.25	0.06-0.5	10	26	23-29
Ceftazidime-avibactam ^{4,9}	0.125-0.25	0.06-0.5	10-4	27	24-30
Ceftibuten	0.25-0.5	0.125-1	30	31	27-35
Ceftobiprole	0.06	0.03-0.125	5	28	25-31
Ceftolozane-tazobactam ^{4,10}	0.25	0.125-0.5	30-10	28	24-32
Ceftriaxone	0.06	0.03-0.125	30	32	29-35
Cefuroxime	4	2-8	30	23	20-26
Chloramphenicol	4	2-8	30	24	21-27
Ciprofloxacin	0.008	0.004-0.016	5	33	29-37
Colistin ¹¹	0.5-1	0.25-2	-	-	-
Delafloxacin	0.016	0.008-0.03	IP	IP	IP
Doripenem	0.03	0.016-0.06	10	31	27-35
Eravacycline	0.06	0.03-0.125	20	21	18-24
Ertapenem	0.008	0.004-0.016	10	32-33	29-36
Fosfomycin ¹²	1	0.5-2	200 ¹³	30	26-34 ¹⁴
Gentamicin	0.5	0.25-1	10	22-23	19-26
Imipenem	0.125-0.25	0.06-0.5	10	29	26-32
Imipenem-relebactam ^{4,15}	0.125-0.25	0.06-0.5	10-25	30	27-33
Levofloxacin	0.016-0.03	0.008-0.06	5	33	29-37
Mecillinam ¹⁶	0.06-0.125	0.03-0.25	10	27	24-30
Meropenem	0.016-0.03	0.008-0.06	10	31-32	28-35
Meropenem-vaborbactam ^{4,17}	0.016-0.03	0.008-0.06	20-10	34	31-37
Moxifloxacin	0.016-0.03	0.008-0.06	5	31-32	28-35
Nalidixic acid	2	1-4	30	25	22-28
Neomycin	Note ¹⁸	Note ¹⁸	10	17	14-20
Netilmicin	-	≤0.5-1	10	21	18-24
Nitrofurantoin	8	4-16	100	20	17-23
Nitroxoline	4	2-8	30	21	18-24
Norfloxacin	0.06	0.03-0.125	10	31-32	28-35
Ofloxacin	0.03-0.06	0.016-0.125	5	31	29-33
Pefloxacin	-	-	5	29	26-32
Piperacillin	2	1-4	30	24	21-27
Piperacillin-tazobactam ^{4,10}	2-4	1-8	30-6	24	21-27
Temocillin	16	8-32	30	19	16-22 ¹⁴
Ticarcillin	8	4-16	75	27	24-30
Ticarcillin-clavulanic acid ^{3,4}	8	4-16	75-10	27	24-30
Tigecycline ¹⁹	0.06-0.125	0.03-0.25	15	23-24	20-27
Tobramycin	0.5	0.25-1	10	22	18-26
Trimethoprim	1	0.5-2	5	24-25	21-28
Trimethoprim-sulfamethoxazole ²⁰	≤0.5	-	1.25-23.75	26	23-29



**Исшитување осетљивости *Salmonella* на антимикробне агенсе
диск дифузионим тестом према стандарду EUCAST**

Ознака: SOP_DDT_Salm	Издање: II	Важи од: 30/05/2024	Страница: 13/13	Ауторизација: Наташа Галић
-------------------------	---------------	------------------------	--------------------	-------------------------------

Прилог 2.

Табела 3. ЕУ протокол са интерпретативним категоријама S-R са клиничким граничним вредностима (црвени правоугаоници -ДДТ) и WT-NWT са епидемиолошким граничним вредностима код хуманих изолата *Salmonella enterica* према стандарду EUCAST

EU protocol for harmonised monitoring of AMR in human *Salmonella* and *Campylobacter* isolates ANNEX 1

Annex 1. EUCAST clinical breakpoints and epidemiological cut-off values for the priority list of antimicrobials to be tested for *Salmonella enterica* as of 31 August 2021

Antimicrobial	Criteria based on MIC dilution (mg/L)			Recommended concentration range ¹ (mg/L) (number of wells)	Criteria based on disk diffusion (mm)			Disk load (µg)
	S ≤	R >	NWT >		S ≥	R <	NWT <	
First priority								
Ampicillin (AMP)	8.0	8.0	4.0	1-32 (6)	14	14	18	10
Azithromycin (AZM)	ND	ND	16	2-64 (6)	ND	ND	12	15
Cefotaxime (CTX)	1.0	2.0 (1.0) ²	0.5	0.25-4 (5), 0.25-64 (9) ²	20	17 (21) ²	20	5
Ceftazidime (CAZ)	1.0 ²	4.0 (1.0) ²	2.0	0.25-8 (6), 0.25-128 (10) ²	22 ³	19	20	10
Chloramphenicol (CHL)	8.0	8.0	16.0	8-64 (4)	17	17	19	30
Ciprofloxacin (CIP)	0.06	0.06	0.064	0.015-8 (10)	NA	NA	NA	NA
Colistin (COL)	2.0	2.0	NA	1-16 (5)	NA	NA	NA	NA
Gentamicin (GEN)	2.0	2.0	2.0	0.5-16 (6)	17	17	17	10
Meropenem (MEM)	2.0	8.0	0.06 (0.125) ²	0.03-16 (10)	22	16	27 (28) ²	10
Pefloxacin	NA	NA	NA	NA	24	24	24	5
Sulfamethoxazole (SMX)	ND	ND	ND	8-512 (7)	ND	ND	ND	100
Tetracycline (TCY)	ND	ND	8.0	2-32 (5)	ND	ND	17	30
Tigecycline (TGC)	ND	ND	ND	0.25-8 (6)	ND	ND	16	15
Trimethoprim (TMP)	4.0	4.0	2.0	0.25-16 (7)	15	15	23	5
Second level testing ESBL-producers								
Cefepime (FEP)	1.0	4.0	ND		27	24	ND	30
Cefoxitin (FOX)	ND	ND	8.0 ²	0.5-64 (8)	19	19 ²	21	30
Optional								
Amoxicillin (AMX)	8.0	8.0	4.0		ND	ND	ND	10
Ceftriaxone (CRO)	1.0	2.0 (1.0) ²	0.25		25	22 (23) ²	ND	30
Ertapenem (ETP)	0.5	0.5	ND (0.125) ²	0.015-2 (8)	25	25 ³	ND	10
Nalidixic acid (NAL)	ND	ND	8.0	4-64 (5)	ND	ND	16	30
Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	2.0	4.0	ND		14	11	22	1.25-23.75

S – clinically susceptible, standard dosing regimen; R – clinically resistant; NWT – non-wild type according to epidemiological cut-off; ND – not determined; NA – not applicable as test method unsuitable for this antimicrobial

1. From Commission Implementing Decision (EU) 2020/1729 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria and repealing Implementing Decision 2013/652/EU

2. Please note that these interpretive criteria should be used when screening for ESBL-production or carbapenemase-production, according to EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance

3. Test wider range if first test indicates resistance/non-wild type with the screening breakpoint