

Antibiograma - conform standardului EUCAST



Olga Burduniuc, dr. științe medicale conferențiar universitar

Asociația de Biosiguranță și Biosecuritate din Republica Moldova

Chișinău, 2020

Rezistența la antimicrobiene - amenințare fără precedent

- Semnal de alarmă! cercetătorii consideră că în următorii 30 de ani RAM poate deveni principala amenințare – la adresa omului
- Aceștea afirmă că impactul economic al germenilor rezistenți va fi devastator mai > decât a noului COVID 19
- Suntem, practic, într-o luptă permanentă cu diverse microorganisme ca să putem să supraviețuim
- Competiția este dură și fiecare medic, instituție responsabilă, țară în întregime trebuie să fie pregătită cu o reacție rapidă și eficientă la acest tip de amenințări
- « One Health » sănătate cu **oameni**, și tot ce-i înconjoară, **animale**, **mediu** și tot ce o condiționează, **nutriția** precum și **ocupationalul**, încurajează colaborări, sinergii și cooperarea sectoarelor ce pot avea impact asupra sănătății noastre.

Conceptul „One Health”

- în diferite forme se extinde înapoi în antichitate;
- recunoașterea faptului că factorii de mediu pot avea impact asupra sănătății a fost consemnat de Hipocrate (460 î.Hr. – 370 î.e.n) care a promovat concept că sănătatea publică depinde de mediu curat;
- medicul italian Giovanni Maria Lancisi (1654–1720), pionier epidemiolog, medic veterinar, insista asupra rolului jucat de mediul fizic în răspândirea bolii la om și animale
- utilizarea acestui concept în forma sa deplină s-a produs în anul 2003, în conexiune cu Ebola, febra hemoragică, de către...
- William Karesh ce spunea: “Sănătatea umană sau a animalelor domestice sau a faunei sălbatice nu mai poate fi discutată izolat.

Există doar o sănătate și soluțiile necesită ca toată lumea să lucreze împreună la toate diferitele niveluri !!!



Antibiograma-definiție, principii

Antibiograma - testarea sensibilității unei tulpini bacteriene izolate dintr-un produs patologic la agenții antimicrobieni.

Principiul: antibiogramei constă în capacitatea antibioticelor de a împiedica multiplicarea bacteriană (efect bacteriostatic) sau proprietatea de a omori bacteriile (efect bactericid).

Testarea cu acuratețe a sensibilității la AM este una dintre cele mai importante proceduri de laborator în ceea ce privește managementul bolilor infecțioase!

Actiune antimicrobiană

- **Concentratia:** cantitatea dintr-un agent antimicrobian intr-un volum definit de lichid, preferabil de exprimat in mg/l sau intr-o masa definita dintr-un solid, exprimata in $\mu\text{g/g}$.
- **Concentratia minima inhibitorie (CMI):** cea mai joasa concentratie, exprimata in mg/l, care, in conditii *in vitro* definite, previne cresterea bacteriilor intr-o perioada definita de timp.
- **Concentratia minima bactericida (CMB):** cea mai mica concentratie de antibiotic, exprimata in mg/l, care in conditii definite *in vitro* reduce cu 99,9% (3 log.) numarul de microorganisme dintr-un mediu conținand un numar definit de microorganisme, intr-un interval definit de timp.

Semnificația antibiogramei

1. Oferă informații pentru selectarea celui sau celor mai active antimicrobiene față de microorganismul testat;
2. Prezintă ajutor în decizia terapeutică;
3. Asigură supravegherea epidemiologică a rezistenței bacteriene (va orienta ulterior antibioterapia);
4. Permite compararea fenotipurilor de rezistență a tulpinilor suspecte responsabile de infecții asociate asistentei medicale;
5. Identificând agentul microbial scoate în evidență rezistența naturală.



Antibiograma - indicații

Testarea uzuală a sensibilității la AM a tulpinilor patogene cu creștere rapidă izolate din:

- **Hemoculturi;**
- **lichid cefalo-rahidian;**
- **Prelevate din tractul respirator superior sau inferior** (lichid bronho-alveolar, lavaj bronșic, puroi din otite și sinuzite, expectorații);
- **Prelevate din tractul genito-urinar** (secreții vaginale, uroculturi);
- **Prelevate osteo-articulare, catetere, coproculturi, lichide de puncție;**
- Tulpini izolate de la bolnavii cu **infecții asociate asistenței medicale** confirmate ca factori etiologici.

Comitetul European pentru Testarea Sensibilitatii la Antibiotice (EUCAST 2018)

Obiective:

1. Standardizarea metodologiilor de testare a sensibilității microorganismelor la AM;
2. Utilizarea seturilor unice de AB pentru fiecare specie de microorganisme;
3. Utilizarea mediilor, reactivelor, discurilor cu AB de la același producător.
4. Armonizarea punctelor de ruptură a agenților antimicrobieni pentru fiecare specie de agenți patogeni.

Ceea ce ne permite în final să analizăm datele obținute la nivel de
republică!

Condițiile efectuării antibiogramei

1. ABG se efectuează după stabilirea diagnosticului etiologic, prin izolarea culturii pure și identificarea agentului patogen.
2. Conform rezultatului antibiogramei se alege AB cel mai eficace față de bacteria izolată (care are cea mai mare sensibilitate).
3. În cazul tratamentului cu AB de lungă durată, ABG se va repeta, deoarece microorganismul poate dobândi rezistență pe parcursul tratamentului și se pot produce suprainfecții).

Metode de testare a sensibilitatii

- **Dilutie in bulion:** tehnica in care se introduc in recipiente:
 - volume identice de bulion inoculat,
 - volume identice de solutie de antibiotic, dar concentratiile de antibiotic sunt crescatoare (de obicei, in progresie geometrica)
 - un inocul definit

Scop: determinarea celei mai joase concentratii care inhiba cresterea bacteriana (CMI)

Macrometoda: tuburi - volum minim de 2 ml.

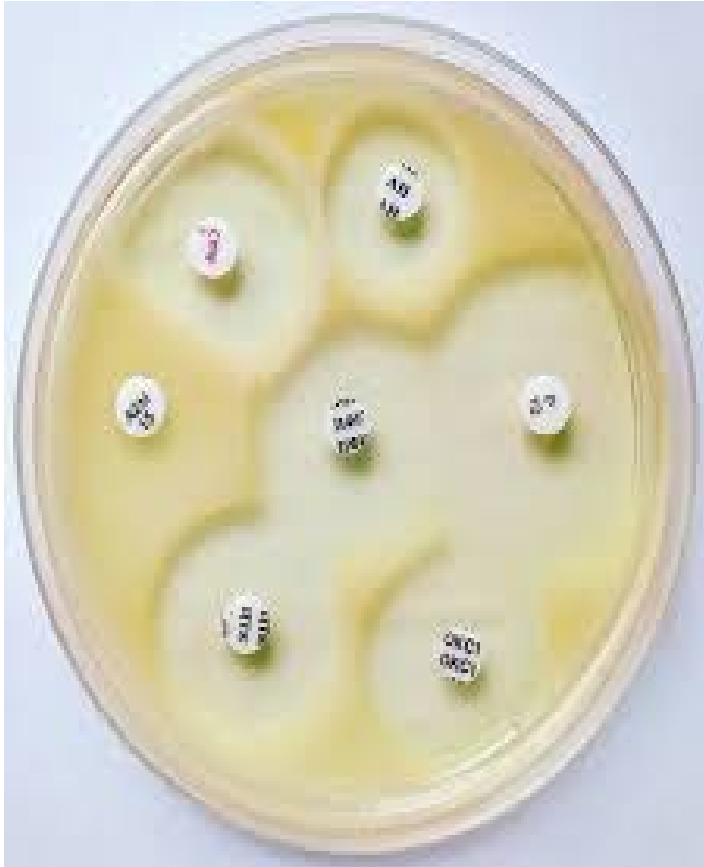
Micrometoda: placute de microtitrare – volum < 500 μ l

Metode de testare a sensibilitatii

- **Dilutie in agar:** incorporarea unui agent antimicrobial in mediu cu agar solid sau semisolid, in progresie geometrica a concentratiilor si aplicarea unui inocul bacterian definit pe suprafata mediului cu agar.

Scop: determinarea celei mai joase concentratii care inhiba cresterea bacteriana (CMI).

Metoda disc-difuzimetrică. Generalități



- Metoda disc-difuzimetrică este una dintre cele mai vechi abordări ale testelor de sensibilitate antimicrobiană și rămâne una dintre cele mai utilizate metode de rutină de testare a sensibilității la AM în lab clinice.
- Este potrivită pentru testarea majorității agenților patogeni bacterieni, inclusiv cele mai frecvente bacterii pretențioase și nu necesită echipamente speciale.

Metoda disc-difuzimetrică

- **Esența metodei disc-difuzimetrice** constă în aplicarea pe suprafața mediului Mueller-Hinton însămânțat în pânză cu tulpina de testat a discurilor cu diferite AB; AB difuzează circular în mediu, realizând concentrații descrescătoare.
- **Avantajul** constă în posibilitatea testării simultane a sensibilității față de mai multe AB
- **Dezavantajul** este lipsa de concordanță a rezultatelor obținute *în vitro* cu rezultatele terapiei *in vivo*.
- **Necesarul**
 - Cutii Petri cu mediului Mueller-Hinton;
 - Suspensie a tulpinii de testat (folosind cultura pură)
 - Standardul de 0,5 Mac Farland;
 - Tampon de vată steril;
 - Ansă bacteriologică
 - Setul cu antibiotice
 - Pensă
 - Incubator

Mediul de testare a sensibilității (1)

- În majoritatea cazurilor se folosește mediul Muller-Hinton, care are o valoare nutritivă ce permite dezvoltarea optimă a unei mari varietăți de bacterii și nu conține inhibitori ai acțiunii unor AB;
- este un bun mediu de cultură pentru majoritatea germenilor nepretențioși patogeni; este folosit cu succes de mulți ani, demonstrându-și calitățile.
- pentru microorganismele pretențioase se utilizează mediul Muller-Hinton suplimentat cu 5 % sânge de cal defibrinat + 20 mg/L de β -NAD (nicotinamid-adenin-dinucleotidă) (Muller-Hinton Fastidious).
- β -NAD se folosește cu o puritate ≥ 98 %.

Mediul de testare a sensibilității (2)

Microorganisme	Mediul
<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	Muller-Hinton agar
<i>Streptococcus pneumonia</i> <i>Streptococcus</i> grupa A,B,C și G Streptococci grupul <i>Viridans</i> <i>Haemophilus</i> spp. <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Campylobacter jejuni</i> și <i>coli</i> <i>Corynebacterium</i> spp.	Mueller-Hinton suplimentat cu 5% sânge de cal defibrinat + 20 mg / l β -NAD (MH-F)

Cerințe față de mediul de testare a sensibilității

Mediul trebuie să aibă o adâncime uniformă de $4 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$

Dimensiunile plăcilor pot diferi între producători:

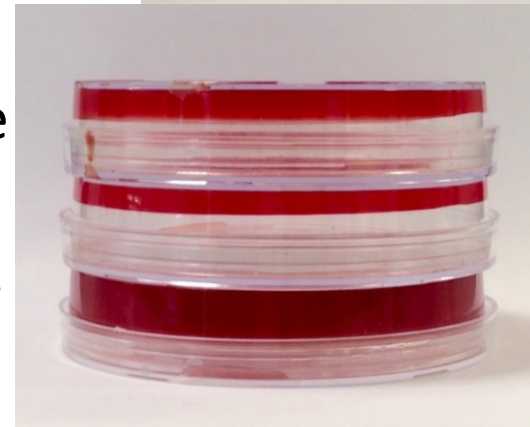
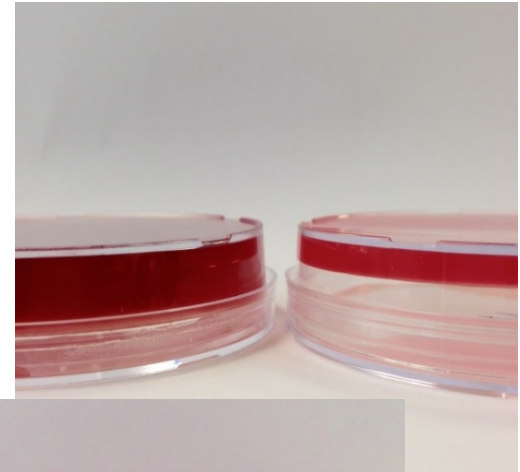
- ✓ placă circulară de 90 mm (~25mL);
- ✓ placă circulară de 100 mm (~31mL);
- ✓ placă circulară de 150 mm (~71mL);
- ✓ placă patrată de 100 mm (~40mL).

Adâncimea mediului nu trebuie să depășească valorile stabilite, deoarece AB difuzează în mediu atât în suprafață cât și în profunzime:

- o grosime mai mare va determina zone de inhibiție eronate mai mici (rezistențe false);
- o grosime mai mică determină creșteri false ale zonelor de inhibiție (sensibilități false).

Pregătirea mediului în laborator

- Mediul se pregătește conform instrucțiunii producătorului.
- Nu se adăugă sânge sau β -NAD până când temperatura mediului nu a scăzut până la 42-45°C, se amestecă bine și se toarnă imediat în plăci.
- Plăcile în care se toarnă mediul trebuie să se afle pe o suprafață plană pentru a obține adâncimea uniformă de 4,0 mm +/- 0,5 mm.



Controlul mediilor

Fiecare lot de mediu nou preparat trebuie testat pentru asigurarea unui pH mediu de 7,2-7,4 la temperatura camerei; valori scăzute ale pH-ului pot altera rezultatele pentru aminoglicozide și macrolide (rezistențe false), sau ale penicinelor (sensibilități false).



Controlul de calitate al mediului Muler-Hinton

Setul de tulpini recomandate de EUCAST și utilizate pentru controlul AB:

- ✓ *E. coli* ATCC 25922,
- ✓ *P. aeruginosa* ATCC 27853,
- ✓ *S. aureus* ATCC 29213,
- ✓ *E. faecalis* ATCC 29212 (pentru controlul discurilor cu concentrații înalte de gentamicină și streptomycină);
- ✓ *E. coli* ATCC 35218 (pentru controlul inhibitorilor de β -lactamază);
- ✓ *H. influenzae* ATCC 49247 și ATCC 49766,
- ✓ *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226,
- ✓ *S. pneumoniae* ATCC 49619.
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (pentru controlul componentul inhibitor al combinațiilor de inhibitori beta-lactamici ai discurilor)

Stocare medii

- Plăcile cu mediu se păstrează la temperatura de 4-8°C mai multe zile, în pungi de plastic, pentru a evita deshidratarea;
- Condițiile de uscare și depozitare a mediilor pregătite în laborator vor depinde de echipamentele disponibile;
- Plăcile comerciale trebuie depozitate conform recomandărilor producătorului și utilizate până la data lor de expirare.



Pregătirea mediilor pentru lucru

- Suprafața mediului trebuie să fie uscată înainte de utilizare. Pentru echilibrarea termică și îndepărtarea condensului format cutiile se vor usca la 20-25°C peste noapte sau la 35°C timp de 15 minute, fără capac.
- Pentru plăcile cu agar Muller-Hinton stocate în pungi de plastic sau în recipiente sigilate, poate fi necesară uscarea lor înainte de utilizare. Acest lucru se cere pentru a evita umiditatea excesivă, ceea ce poate duce la erori în citirea rezultatului.

Regula 15-15-15 minute

- Inoculul poate fi folosit timp de 15 minute de la preparare;
- Discurile se aplică în decurs de 15 minute pe plăcile inoculate;
- Incubarea se începe cu 15 minute pînă la aplicarea discurilor.

Prepararea inoculului (1)

Cu ajutorul unei anse sterile sau tampon steril se vor alege colonii similare din punct de vedere morfologic bine izolate, din creșterea după incubarea de 24 h, evitând selectarea coloniilor atipice.



Acestea se suspendează în sol. fiziologică și se amestecă până la obținerea unei turbidități uniforme.

Prepararea inoculului (2)

- Suspensia se va ajusta la densitatea standardului McFarland 0.5 ($1-2 \times 10^8$ UFC / ml pentru *E. coli*) prin adăugarea de sol. Fiz sau cultură bacteriană (inocul prea dens – zone de inhibiție reduse; inocul cu densitate scăzută – efectul opus).
- *Streptococcus pneumonia* izolat de pe geloză sânge este suspendat în soluție fiziologică pentru a produce o turbiditate egală cu McFarland 0.5, pe când – izolat de pe placa cu agar de ciocolată = McFarland 1.0.
- Se recomandă utilizarea unui dispozitiv fotometric calibrat la standardul McFarland 0.5, pentru reglarea densității suspensiei.
- În mod alternativ, densitatea suspensiei poate fi comparată vizual cu un standard de turbiditate McFarland 0.5, folosind un fundal alb cu linii negre.



Inocularea plăcilor (1)

- Plăcile cu mediu trebuie să atingă temperatura camerei înainte de inoculare.
- Se introduce un tampon de bumbac steril în suspensie și se îndepărtează excesul de lichid prin rotirea tamponului în interiorul tubului.



• Se răspândește inoculul în mod egal pe întreaga suprafață prin inoculare în trei direcții sau prin utilizarea unui rotator de plăci.



Inocularea plăcilor (2)

- Placa cu Muller-Hinton astfel inoculată și lăsată să absoarbă toată cantitatea de inocul depusă - cca 5 minute, după care se pot aplica discurile cu AB.
- Dacă plăcile inoculate sunt lăsate la temperatura camerei pu perioade prelungite de timp înainte de aplicarea discurilor, m-o-s se pot multiplica, ducând la o reducere eronată a dimensiunilor diametrelor zonei de inhibiție.
- Se va a asigura o bună însămânțare fără a lăsa lacune între dungile trasate pe mediu cu tamponul.
- Scopul final al inoculării mediului este realizarea unei creșteri bacteriene uniforme, sub formă de colonii confluențe.

Păstrarea discurilor antimicrobiene



- Stocurile de discuri sunt păstrate în condițiile recomandate de producător.
- Discurile în uz curent se depozitează la 4-8°C în recipiente sigilate, protejate de lumină (anumiți agenți, inclusiv metronidazol, cloramfenicol și fluorochinolone, sunt inactivate prin expunerea prelungită la lumină).
- Pentru a evita condensarea apei pe discuri, se lasă să se încălzească la temperatura camerei înainte de a fi aplicate pe suprafața mediului însămânțat.
- Este mai bine de păstrat discurile la temperatura camerei dacă va fi nevoie de schimbarea regimului de temperatură pe parcursul zilei.
- Discurile vor fi utilizate pînă la expirarea termenului de valabilitate care figurează pe recipient.

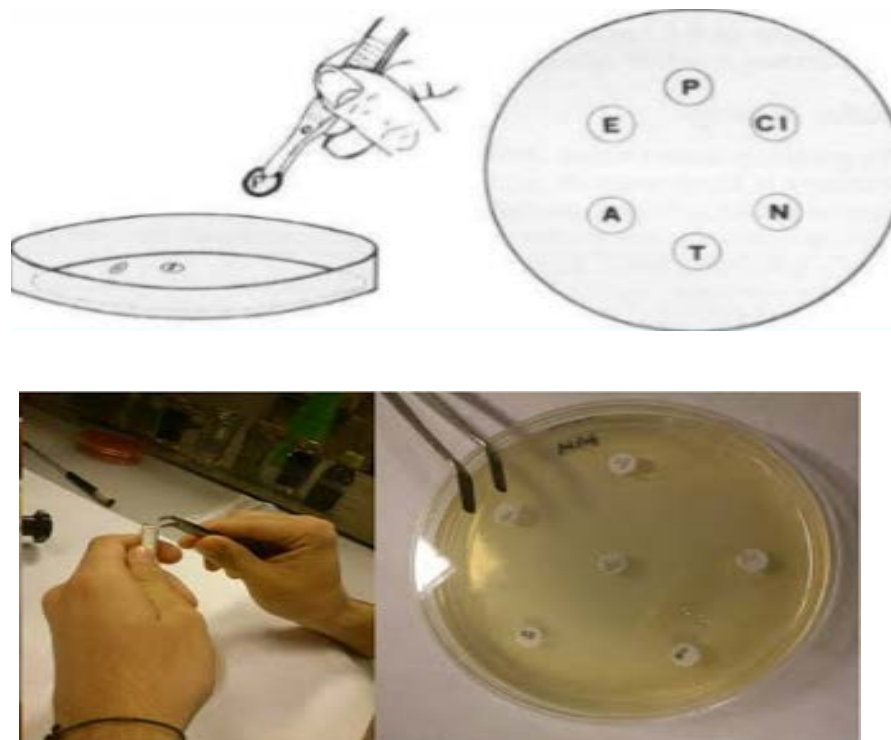
Aplicarea discurilor cu antibiotice (1)

- Aplicarea discurilor se poate face fie individual, cu pense sterile, fie cu dispensere speciale.
- Discurile se aplică ferm pe suprafața mediului în **decurs de 15 minute de la inoculare**, asigurând un contact strâns cu suprafața mediului și neschimbându-le poziția după ce au fost aplicate, deoarece difuziunea inițială a agenților antimicrobieni de pe discuri este foarte rapidă.
- Discurile trebuie să fie ferme, chiar și în contact cu suprafața mediului.
- Numărul de discuri de pe o placă trebuie să fie limitat pentru a evita suprapunerea zonelor și interferența între agenți (distanța între discuri – **minimum 24 mm de la centru la centru**). Este important ca diametrele zonelor să poată fi ușor măsurate.



Aplicarea discurilor cu AB (2)

- Numărul maxim de discuri depinde de microorganism și de selecția discurilor. În mod normal, 6 și 12 discuri reprezintă numărul maxim posibil pe o placă circulară de 90 și, respectiv, 150 mm (16 discuri – pe plăcile pătrate).
- Pentru a putea detecta rezistența inductibilă la clindamicină a stafilococilor și streptococilor, discurile de eritromicină și clindamicină trebuie să fie plasate la o distanță de 12-20 mm de la margine la margine – pentru stafilococi și 12-16 mm – pentru streptococi.



Incubarea plăcilor



- Plăcile se inversează și se incubează timp de 15 minute pîna la aplicarea discului, pentru a evita pre-difuzia, și obținerea unor dimensiuni mari ale zonelor de inhibiție.
- După aplicarea discurilor de antibiotice și nedepășind cele 15 minute, plăcile sunt întoarse cu capacul în jos (pentru a nu se umezi de la condensat) și se introduc în incubator, la 35°C, la atmosferă normală.
- MH este incubat în thermostat obișnuit, iar MH-F în prezența a 4-6% CO₂, timp de 24 h.
- În timpul incubării temperatura trebuie să fie uniformă, pentru a nu afecta dimensiunile zonei.
- numărul adecvat de plăci de pe fiecare stivă. Pentru majoritatea termostatelor, este adecvat maxim cinci plăci per stivă.

Condițiile de incubare

Microorganisme	Condiții de incubare
Enterobacteriaceae	35 +/- 1°C timp de 16 – 20 h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35 +/- 1°C timp de 16 – 20 h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35 +/- 1°C timp de 16 – 20 h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35 +/- 1°C timp de 16 – 20 h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35 +/- 1°C timp de 16 – 20 h *
<i>Enterococcus</i> spp.	35 +/- 1°C timp de 16 – 20 h
<i>Streptococcus</i> grupa A,B,C si G	35 +/- 1°C cu 4 – 6 % CO ₂ timp de 16 – 20 h
Streptococci grupul <i>Viridans</i>	35 +/- 1°C cu 4 – 6 % CO ₂ timp de 16 – 20 h
<i>Streptococcus pneumonia</i>	35 +/- 1°C cu 4 – 6 % CO ₂ timp de 16 – 20 h
<i>Haemophilus</i> spp.	35 +/- 1°C cu 4 – 6 % CO ₂ timp de 16 – 20 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35 +/- 1°C cu 4 – 6 % CO ₂ timp de 16 – 20 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35 +/- 1°C cu 4 – 6 % CO ₂ timp de 16 – 20 h
<i>Pasteurella multocida</i>	35 +/- 1°C cu 4 – 6 % CO ₂ timp de 16 – 20 h
<i>Campylobacter jejuni</i> si <i>coli</i>	41 +/- 1°C in mediu microaerofil timp de 24 h (40 – 48 h)
<i>Corynebacterium</i> spp.	35 +/- 1°C cu 4 – 6 % CO ₂ timp de 16 – 20 h (40 – 48 h)

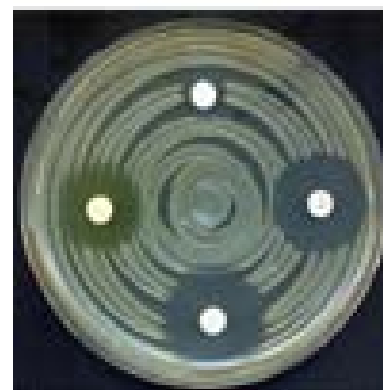
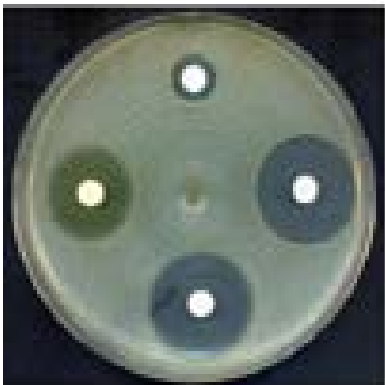
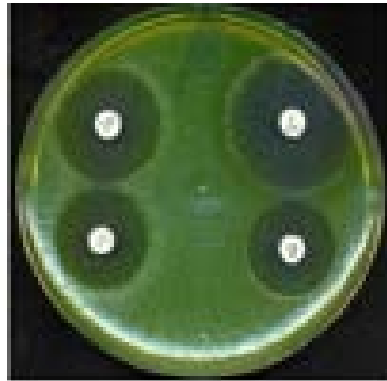
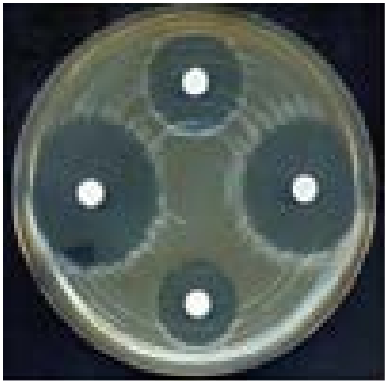


Examinarea plăcilor după incubare

- Un inoculum preparat corect și însămânțarea corespunzătoare a plăcilor determină o pânză uniformă și confluentă de creștere, cu zone de inhibiție uniform circulare (ne-zimțate);
- Toate plăcile cu germeni nepretențioși se examinează după 16-18 ore de incubatie, cu excepția stafilococilor și enterococilor, care necesită 20-24 ore pentru detecția meticilinorezistenței și respectiv rezistenței la vancomicină.
- Dacă se obțin colonii izolate, inoculul este pregătit necorespunzător și trebuie repetat.
- Se verifică dacă zonele de inhibiție pentru tulpinile de control al calității sunt în limitele acceptabile (<http://www.eucast.org>).

Plăcile ar trebui să arate

așa ...



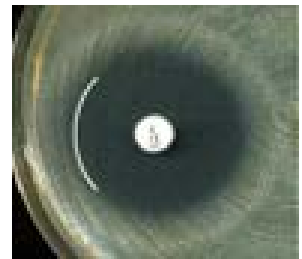
... și NU așa!

Citirea zonelor de inhibiție



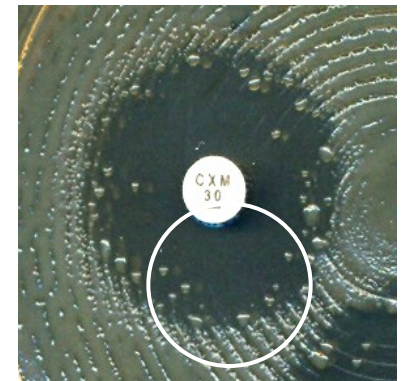
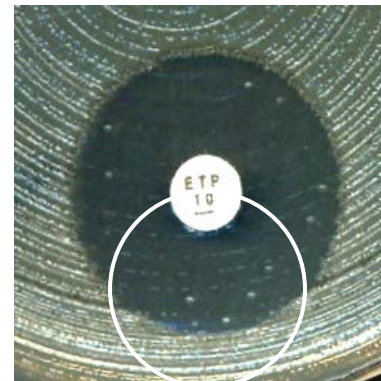
Diametrul zonei de inhibiție completă este măsurat, incluzând și diametrul discului, cu ajutorul unei rigle gradate sau șubler. Plăcile cu Muller-Hinton se citesc din spate pe un fundal închis, luminat cu lumină reflectată;

- Plăcile cu MH-F se citesc din față cu capacul scos iluminat cu lumină reflectată;
- Limitele marginilor trebuie citite la punctul de inhibare completă, cu ochiul liber, ținând placa la aproximativ 30 cm de la ochi.



Coloniile din zona de inhibiție

- În cazul coloniilor distincte în zonele de inhibiție, se verifică puritatea și se repetă testul, dacă este necesar.
- Coloniile care nu reprezintă o contaminare trebuie luate în considerare la citirea zonelor.



Diferențierea creșterii de hemoliză

- Se citește inhibarea creșterii și nu inhibarea hemolizei.
- Este uneori dificil să distingem hemoliza de creștere. Pentru aceasta în timpul citirii placa se ține ușor înclinată.

✓ β -hemolizinele difuzează în mediu. De aceea, β -hemoliza este delimitată de creștere.

✓ α -hemolizinele nu difuzează. Există adesea creștere în zonele de α -hemoliză.

✓ Zonele marginale însoțite de α -hemoliză sunt cele mai frecvente în cazul antibioticelor pentru *S. pneumoniae* și β -lactame.



Există, de obicei, o creștere pe întreaga arie a hemolizei.

Pentru unele microorganisme de pe plăcile cu MH-F, există o hemoliză suplimentară fără creștere.



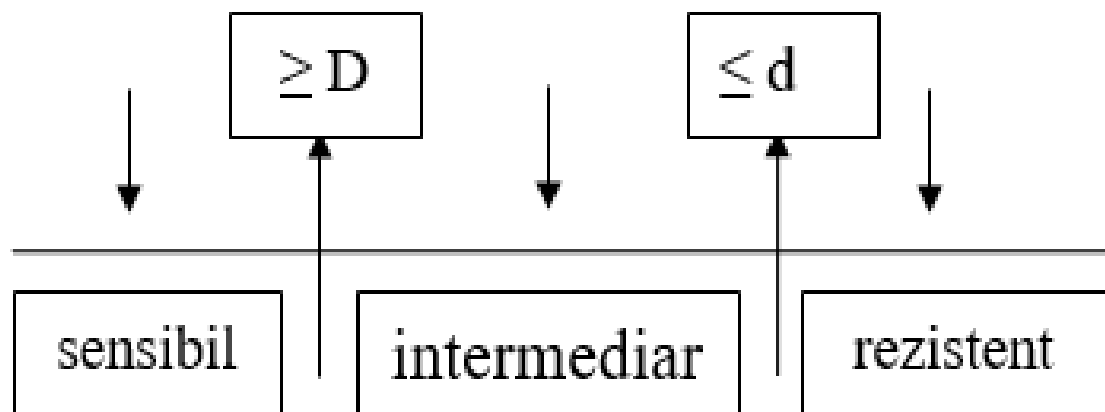
Puncte de ruptura (*BREAKPOINTS*)

- valori specifice ale unor parametri cum sunt: concentratiile minime inhibitorii (CMI) sau zonele de inhibitie, pe baza carora bacteriile pot fi incadrate in categoriile clinice:
 - “susceptibil (sensibil)”
 - “intermediar”
 - “rezistent”.

Desemnarea ca “intermediar” ofera de asemenea un spatiu de joc din punct de vedere tehnic, care minimizeaza confuzia intre microorganismele cu CMI apropiat de punctul de ruptura.

Interpretarea rezultatelor

- Diametrul zonei de inhibiție a creșterii, în mm, se compară cu cele două diametre critice stabilite de standardul EUCAST.
 - când această valoare este $\geq$ diametrul critic superior (D), tulpina este considerată sensibilă (S);
 - când valoarea determinată este $\leq$ diametrul critic inferior (d), tulpina este considerată rezistentă (R);
 - când diametrul măsurat este situat între valorile celor două diametre critice considerăm tulpina ca intermediară (I).



Caractere dependente de agentul patogen

Profilul de sensibilitate / rezistenta si antibiograma:

Acestea descriu *pattern* –ul de sensibilitate la o serie de antibiotice.

Ex.: o bacterie rezistenta la: penicilina

streptomicina

tetraciclina,

dar sensibila la: eritromicina

poate fi descrisa ca avand profilul de rezistenta PST.

Optional, un astfel de microorganism poate fi descris prin **antibiograma RRRS** pentru secventa predefinita de antibiotice.

Tulpini de referinta

- bacterii catalogate, caracterizate, cu fenotipuri de sensibilitate la antibiotice stabile, definite.
- se utilizeaza pentru controlul intern de calitate.

Metode de testare a sensibilitatii

- **Metoda difuziei in agar:** difuzia antibioticului din discuri, tablete, strip-uri (benzi) in medii solide inoculate cu cultura bacteriana da nastere unor zone de inhibitie ale caror diametre sunt in corelatie cu CMI ale bacteriei.

Controlul de calitate al testării disc-difuzimetrice (1)



- Toate loturile noi cu mediul Muller-Hinton ca și cele de discuri trebuie testate cu tulpinile de referință înainte de a fi date în exploatare pentru testarea tulpinilor clinice, iar testele de control trebuie stabilite și verificate zilnic sau cel puțin de patru ori pe săptămână pentru antibioticele care fac parte din lista de rutină.
- Principalele tulpini de control recomandate sunt tulpini sensibile tipice, dar pot fi utilizate și tulpinile rezistente pentru a confirma rezistența mediate de mecanismele de rezistență cunoscute.
- Se verifică dacă rezultatele pentru tulpinile de control se încadrează în limite acceptabile în tabelele QC EUCAST.

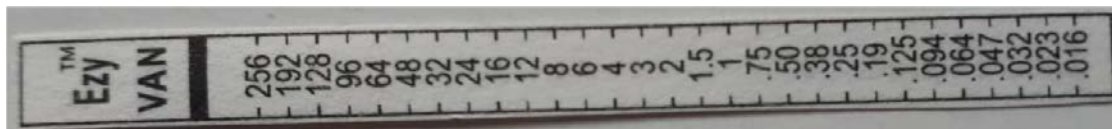
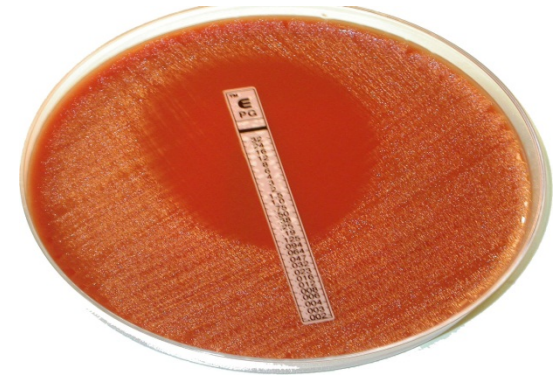
Controlul de calitate al testării disc-difuzimetrice (2)



- Dacă nr de teste este ≥ 10 , diametrul zonei medii trebuie să fie apropiat de valoarea țintă (± 1 mm).
- Nu sunt permise abateri de peste 3 mm ale diametrelor zonelor de inhibiție față de cele standard, iar atunci când aceasta se întâmplă, se iau măsurile corective necesare.
- Controlul de calitate are drept scop:
 - precizia și fiabilitatea tehnicii de testare a sensibilității;
 - Performanța reactivilor utilizați;
 - Performanța personalului care efectuează testele.

E-Test, definiții

- **E-Testul** reprezintă o metodă de testare *in vitro* a sensibilității la antibiotice pentru diferite microorganisme, inclusiv pentru bacteriile pretențioase și germenii anaerobi, care combină principiile metodei difuzimetrice cu cele de diluție.
- Spre deosebire de metoda disc-difuzimetrică metoda E-Test este ușor de utilizat și permite determinarea valorii CMI.



E-Test. Necesarul

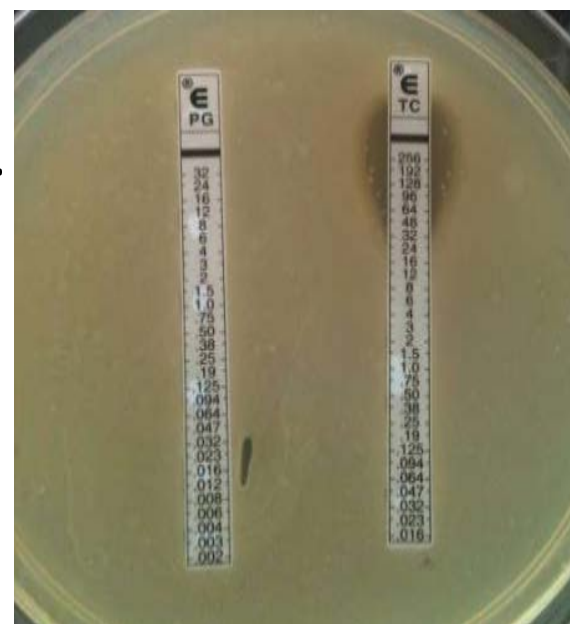
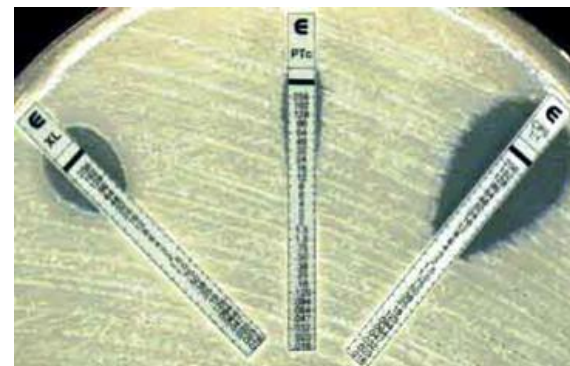
- plăci Petri cu agar Mueller-Hinton (păstrate la 2-8°C până în momentul utilizării);
- inocul bacterian;
- Sol. Fiziologică sterilă sau bulion Mueller-Hinton, pentru ajustarea inoculului bacterian;
- benzi E-Test (păstrate în congelator la -20°C până în momentul utilizării);
- tampoane sterile;
- ansă bacteriologică sterilă;
- pensă;
- standard de turbiditate McFarland 0,5 și 1,0;
- pipete Pasteur sterile;
- plăci Petri sterile;
- incubator cu atmosferă obișnuită sau îmbogățită cu CO₂ reglat la 34-35°C;
- sursă de lumină.

Pregătirea benzilor E-Test

- Mediul de cultură și benzile E test se scot din frigider și se lasă la temperatura camerei pentru echilibrare termică timp de 20 minute;
- Înainte de a deschide folia care include benzile, aceasta se va inspecta pentru a observa integritatea ei (în caz că folia e este intactă, atunci benzile din interiorul ei nu mai pot fi folosite);
- dacă nu sunt probleme, se taie cu o foarfece de-a lungul liniei întrerupte apoi între compartimentele ce conțin benzile;
- Benzile se scot din folie cu ajutorul unei pense și se plasează plăci sterile, de unde se ia câte una și se aplică pe mediul de cultură care conține inoculul microbian de testat;
- Restul benzilor se păstrează în tuburi în care în prealabil se va introduce o substanță desicantă pentru a le proteja de umezeală; de asemenea este necesară protecția față de căldură și expunerea directă la lumină (în congelator, la -20°C).

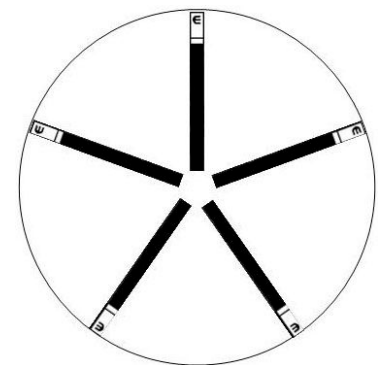
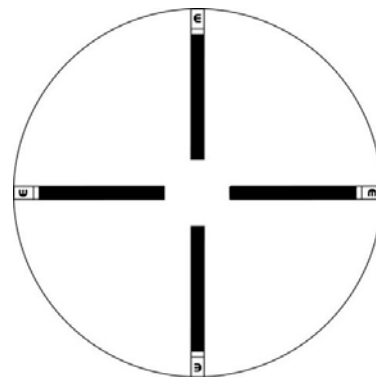
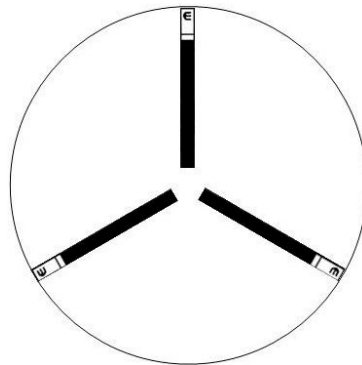
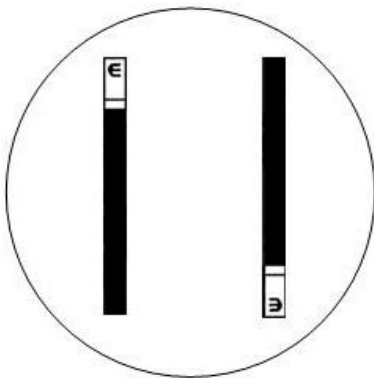
Tehnica de lucru

- Principiul metodei este asemănător metodei disc-difuzimetrice:
- Metoda necesită un inocul bacterian ajustat ca turbiditate (McFarland), ce urmează a fi depus pe mediul de cultură potrivit microorganismului studiat (ex. mediul Mueller-Hinton, geloză-sânge etc).
- Banda E-Test conține un gradient de agent antimicrobian și se aplică în plăci după însămânțare. În funcție de antibiotic, gradientul „acoperă” un șir continuu de concentrații între **0,002-32 mg/ml; 0,016-256 mg/ml sau 0,064-1024 mg/ml**.



Reguli de aplicare a benzilor E test (1)

- Se ia cu grijă o bandă fără a atinge partea pe care este depus agentul antimicrobian (banda se va lua cu pensa de capătul benzii notat cu E; se va avea grijă sa nu se aplice 2 benzi lipite între ele);
- banda E-Test se va aplica pe suprafața mediului de cultură cu capătul ce conține concentrația cea mai mare aproape de marginea plăcii;
- În cazul utilizării plăcilor cu diametrul de 90 mm se va aplica una sau două benzi; în cazul plăcilor cu diametrul de 150 mm - 6 benzi E-Test (benzile se aplică la distanțe egale, radial, pornind din centrul plăcii);



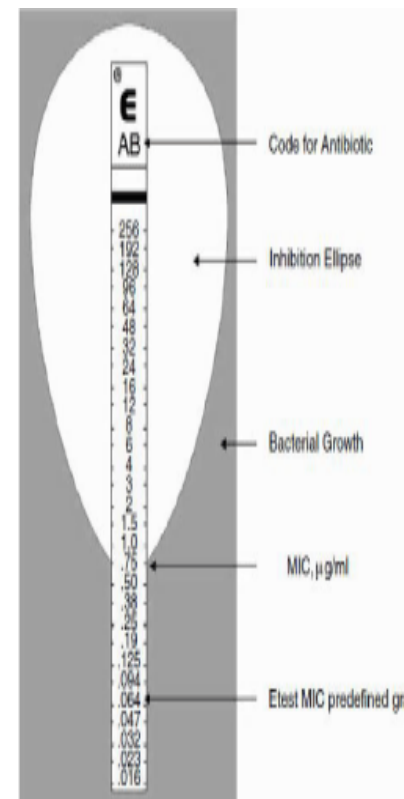
Reguli de aplicare a benzilor E test (2)

- banda trebuie să se afle în contact cu suprafața mediului eliminând bulele de aer de sub bandă cu ajutorul pensei sau a unui aplicator de benzi (prezența bulelor mici nu va afecta rezultatul);
- NU se schimbă poziția benzii odata aplicate pe suprafața mediului (în contact cu mediul de cultură, agentul antimicrobian de pe partea posterioară se difuzează imediat);
- dacă banda a atins suprafața mesei de lucru sau un alt obiect, se poate folosi în continuare atât timp cât nu a fost în contact cu o substanță lichidă.



Interpretarea rezultatelor

- După incubare (condițiile de incubare nu diferă de cele din metoda difuzimetrică) rezultatul va fi citit dacă creșterea bacteriană este confluentă, uniformă;
 - Ținând placa lângă o sursă de lumină se citește valoarea CMI în punctul în care creșterea bacteriană intersectează banda E-Test (se va utiliza o sursă de lumină reflectantă și o lupă în cazul utilizării mediului geloză-sânge sau geloză-ciocolată);
-
- în cazul în care nu apare nicio zonă de inhibiție, raportăm valoarea CMI ca fiind mai mare decât cea mai mare concentrație a agentului antimicrobian de pe banda E-Test;
 - dacă zona de inhibiție nu intersectează banda (se află sub banda E test), valoarea CMI se raportează ca fiind mai < decât concentrația cea mai scăzută a agentului antimicrobian de pe banda E-Test;
 - în cazul unei valori a CMI situată între 2 marcaje ale gradientului benzii, rezultatul pe care îl notat va fi valoarea cea mai mare;
 - Rezultatele CMI se interpretează conform EUCAST-lui





Cauzele obținerii rezultatelor eronate

➤ **Tulpina bacteriană:**

- ✓ Crescută > 18-20h;
- ✓ Flora mixtă;

➤ **Mediul**

- ✓ Cultura pe mediu necorespunzător (diferențial);
- ✓ Turnat necorespunzător în plăci;
- ✓ pH, grosime, sterilitate;

➤ **Discuri și benzi E-Test**

- ✓ Utilizare fără importanță pentru specia bacteriană testată;
- ✓ Păstrare în condiții necorespunzătoare;
- ✓ Utilizare peste limita de valabilitate;

!!! ANTIBIOGRAMA GREȘITĂ => TULPINI MDR

Concluzie

Determinarea sensibilității la AM este necesară pentru optimizarea algoritmului de tratament și furnizarea datelor consistente pentru argumentarea politicilor, strategiilor de reținere a rezistenței și consumului argumentat de AB.



Mulțumesc pentru atenție !

