

	Јавна здравствена установа болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-001
Испитивање осјетљивости изолованих бактерија на антибиотике методом диск дифузије				
Страна 1 од 8	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	2	2023-02-02	др Санда Лазих руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Испитивање осјетљивости изолованих бактерија на антибиотике - тест антимикробне осјетљивости (у даљем тексту ТАО), вршимо у циљу избора оптималне терапије инфекција као и рационалне употребе антибиотика.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Диск дифузиони метод је рутински метод испитивања осјетљивости изолованих бактерија на антибиотике. Изводи се према смјерницама Европског комитета за испитивање антимикробне осјетљивости ("The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing", у даљем тексту: EUCAST).

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Није примјењиво.

4. ВРСТА УЗОРКА

Чиста бактеријска култура из свих узорака хуманог поријекла.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Није примјењиво.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

Петри плоче промјера 90 милиметара са одговарајућом подлогом, стерилне епрувете за припрему инокулума.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Фрижидер, инкубатор, диспензор, дензитометар, стерилна пинцета, мјерач зона, стерилни брисеви, стерилна еза, стерилни стаклени штапић, плинска боца са Бунзеновим пламеником.

Физиолошки раствор за припрему инокулума, Милер - хинтон подлога, антибиограм дискови / таблете, препоручени од EUCAST - а.

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Управљање условима средине и безбједношћу дефинисано је у даљем тексту, као и сљедећим документима:

УП-10-142: Мјере заштите на раду у Служби за микробиологију са паразитологијом.

УП-10-023: Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом.

УП-10-139: Упутство за безбједно руковање опасним хемикалијама у Служби за микробиологију са паразитологијом.

УП-10-141: Прање и стерилизација лабораторијског посуђа у Служби за микробиологију са паразитологијом.

УП-10-138: Обезбјеђење и прањење услова средине у процесу испитивања.

УП-10-016: Интерна контрола квалитета у Служби за микробиологију са паразитологијом.

Болница Бијељина	Страна 2 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-001
		2	2023-02-02	

УП-10-041: Упутство у случају лабораторијског акцидента у Служби за микробиологију са паразитологијом.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

10.1 Припрема подлоге:

- Аутоклавирати подлогу и расхладити је на 45- 50 °C (водено купатило).
- Разлити подлогу у Петри шоље (25ml подлоге у Петри шољу пречника 90 mm, 31 ml у Петри шољу пречника 100 mm ± или око 50 ml подлоге у Петри шољу пречника 160 mm).
- Дебљина подлоге мора да буде 4 mm ± 0,5 mm.
- Подлога разливена уз пламеник под асептичним условима и охлађена на собној температури чува се у фрижидеру (8-10°C до 7 дана или на 4-8°C дуже од 7 дана у пластичним кесама са патентом за затварање) са поклопцем окренутим на доле.
- Прије употребе подлога мора стајати бар пола сата на собној температури.
- Ако се на површини подлоге налазе капи кондензоване воде, неопходно је прије употребе подлогу просушити у термостату тако да површина подлоге буде окренута надоље и наслоњена на отворени поклопац.
- Контролисати пе - ха подлоге (7,2-7,4).

У табели 1 је наведен избор подлоге у зависности од микроорганизма

Табела 1: Подлоге за ТАО

Организам	Подлога
Enterobacterales	MH agar
Pseudomonas spp.	
Stenotrophomonas maltophilia	
Acinetobacter spp.	
Staphylococcus spp.	
Enterococcus spp.	
Streptococcus groups A, B, C and G	MH - F agar ¹
Streptococcus pneumoniae	
Viridans group streptococci	
Haemophilus influenzae	
Moraxella catarrhalis	
Listeria monocytogenes	
Pasteurella multocida	
Campylobacter jejuni and coli (vidi Appendix A)	
Corynebacterium spp.	
Aerococcus sanguinicola and urinae	
Kingella kingae	

Болница Бијељина	Страна 3 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-001
		2	2023-02-02	

Aeromonas spp.	MH agar
Achromobacter xylosoxidans	
Bacillus spp.	
Burkholderia pseudomallei	

¹ 1 MH + 5% механички дефибринисане коњске крви + 20 mg/L β -NAD

10.2 Припрема инокулума и инокулисање плоча:

- Езом се пикира 4 - 5 колонија чисте 18 – 24 часа културе и пренесе у 5 ml физиолошког раствора.
- Густина суспензије се подешава поређењем са MC Farland стандардом 0,5 за турбидитет (изуев пнеумокока који се пикира са чоколадног агара 1,0). Прије употребе стандард снажно промућкати, а припремљену суспензију испитиваних бактерија поредити са стандардом уз помоћ дензиметра или према приложеном картону (с тамним хоризонталним линијама) постављеном иза обје суспензије.
- Пожељно је пикирати *Streptococcus pneumoniae* са крвног агара, када густина инокулума треба да износи 0.5 МФ. Уколико се суспензија прави са чоколадног агара, тада густина инокулума треба да буде 1.0 МФ.
- Инокулум се засијава брисом, који је добро оцијеђен о зид епрувете, оптимално 15 минута након прављења суспензије, најдуже након 1х, равномерно наносећи на површину подлоге у 3 правца да се добије конфлуентан пораст. Код Грам - позитивних бактерија водити рачуна да не буде празнина између потеза!
- За Грам - негативне бактерије ротирајући и притискајући о зид епрувете, добро оциједити брис, да би се спријечио прекомјеран пораст. За Грам - позитивне бактерије, не притискати и не ротирати брис о зид епрувете!
- Уколико се више плоча инокулише истим инокулумом, за сваку плочу поновити претходно описани поступак.
- Послије засијавања инокулума пожељно је да подлога стоји 10 - 15 минута на собној температури да би се површина осушила.

10.3 Постављање дискова или таблета

- Изводи се диспензером или стерилном пинцетом, обезбијеђујући добро пријањање за површину.
- Дискови се чувају у фрижидеру, на 4 - 8° Целзијуса, они који су у употреби у затвореним кесама са десикантом.
- Дискове загријати на собној температури прије отварања да се спријечи кондензација.
- Размак између дискова је најмање 3 cm, а растојање од ивице суда најмање 1 cm.
- На плочу пречника 10 cm наноси се максимално 6 дискова, а на плочу пречника 12 cm максимално 8 дискова.
- Окренути плочу поклопцем на доле, и најдаље за 15 минута ставити у инкубатор, редајући мац 4 плоче у шток.
- За детекцију индуцибилне резистенције на клиндамицин код стафилокока и стрептокока, дискови еритромицина и клиндамицина морају бити постављени са међусобним размаком ивица од 12-20 mm за стафилококе и 12-16 mm за стрептококе.

Болница Бијељина	Страна 4 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-001
		2	2023-02-02	

- ПОШТОВАТИ ПРАВИЛО 15 МИН - 15 МИН - 15 МИН (након прављења суспензије у року од 15 минута инокулисати МХА, затим у року од 15 минута поставити дискове, те у року од 15 минута ставити плоче у инкубатор.

У табели 2 су наведени услови инкубације према врсти микроорганизма

Табела 2: Услови инкубације према врсти микроорганизма

Организам	Услови инкубације
Enterobacterales	35 ± 1°C у трајању 18 ± 2 часа (24 часа за гликопептиде за Enterococcus spp.)
Pseudomonas spp.	
Stenotrophomonas maltophilia	
Acinetobacter spp.	
Staphylococcus spp.	
Enterococcus spp.	
Aeromonas spp. 35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
Achromobacter xylosoxidans	
Bacillus spp.	
Burkholderia pseudomallei	35 ± 1°C у 4-6% CO ₂ , трајање 18 ± 2 h
Streptococcus groups A, B, C and G	
Streptococcus pneumoniae	
Viridans group streptococci	
Haemophilus influenzae	
Moraxella catarrhalis	
Listeria monocytogenes	
Pasteurella multocida	
Corynebacterium spp.	35 ± 1°C у 4-6% CO ₂ , трајање 18 ± 2 h Изоловати са недовољним порастом након 16 - 20 часа се одмах поново инкубирају, а зоне инхибиције се читавају након 40 - 44 часа укупне инкубације
Aerococcus sanguinicola and urinae	
Kingella kingae	

10.4 Извјештавање и тумачење резултата

Извјештавање и тумачење резултата различито је код различитих врста микроорганизама те је потребно пратити упутства за испитивање осјетљивости на антибиотике за поједине врсте бактерија према актуелним смјерницама EUCAST - а.

За сваки антибиотик се мјери, мјерачем са милиметарском подјелом, пречник зоне инхибиције јасног раста према сљедећим препорукама:

10.4.1 Мјерење зона инхибиције

За све изолате посматрати зоне голим оком (не користити лупу), на удаљености од око 30 cm.

Плоче са МНА читати са доње стране, на тамној позадини под рефлектујућим свјетлом.

Плоче са FMNA читати отворене, од горе под рефлектујућим свјетлом.

Не користити лупу нити подизати плоче ка свјетлу, изузев у доле наведеним ситуацијама.

Болница Бијељина	Страна 5 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-001
		2	2023-02-02	

10.4.2 Специфичне инструкције

- Код дуплих зона или јасних колонија унутар зоне, провјерити чистоћу колонија и по потреби поновити тест. Ако су колоније чисте, код мјерења пречника узети у обзир и пораст унутар зоне.
- Код тумачења зоне *Stenotrophomonas maltophilia* и *Burkholderia pseudomallei* око СХТ, може постојати знатан пораст унутар зоне. Тај пораст треба игнорисати и читати видљиве ивице зоне инхибиције. Тумачити да нема зоне само ако је пораст до самог диска без видљиве зоне инхибиције.
- Код тумачења зона за ампицилин, ампицилин - сулбактам и амоксицилин - клавуланска киселина код *Enterobacterales*, игнорисати пораст у виду танког филма који даје унутрашњу зону на појединим серијама МНА.
- Код тумачења зона за темоцилин и мецилинам код *Enterobacterales*, игнорисати појединачне колоније у зони инхибиције.
- Код тумачења зоне за фосфомицин код *E. coli*, игнорисати појединачне колоније у зони инхибиције и читавати спољашњу ивицу зоне.
- Код *Proteus* spp. игнорисати ројење и читати зону инхибиције пораста.
- Код *Staphylococcus* spp. И бензилпеницилина, читати плочу подигнуту ка свјетлу. Изолате са зоном $\geq$ бреакпоинт са јасном, оштром ивицом тумачити као Р.
- Код употребе цефокситина за детекцију резистенције на метицилин *Staphylococcus* spp. - а, мјерити очигледну зону на добром свјетлу тражећи колоније у зони. То може бити контаминација али и експресија хетерогене метицилин резистенције.
- Зону за линезолид код стафилокока читај са задње стране плоче подигнуте ка свјетлу.
- *Enterococcus* spp. и ванкомицина, пажљиво погледај ивице зоне на плочи окренутој ка свјетлу. Нејасне ивице зоне и колоније у зони указују на могућу резистенцију и морају бити додатно испитане. Изолати се могу извијестити као осјетљиви тек након истека 24 часа инкубације.
- За хемолитичне стрептококе читати зону инхибиције пораста а не хемолизе. Вета хемолиза је неовисна о порасту док се α хемолиза поклапа са растом.
- За *Haemophilus influenzae* и бета - лактаме, читати спољашњу ивицу зоне у случајевима када иначе јасна зона инхибиције садржи и зону пораста око диска.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Описано је у УП-10-016: *Интерна контрола квалитета у Служби за микробиологију са паразитологијом.*

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА, БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Није примјениво.

Болница Бијељина	Страна 6 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-001
		2	2023-02-02	

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

Мјерити зоне инхибиције пораста те их тумачити у складу са важећим EUCAST смјерницама.

EUCAST настоји да минимизира варијације пружањем стандардизованих метода за одређивање МИК - а и диск дифузију, и избјегавањем постављања граничних вриједности које озбиљно утичу на поновљивост теста. Варијације у ТАО могу се додатно смањити постављањем строжијих стандарда за произвођаче материјала за ТАО (бујон, агар, антимикуробни дискови) и критеријума за контролу квалитета производних процеса и лабораторијске праксе.

Иако је ТАО једноставан за већину антимикуробних агенаса и бактеријских врста, постоје проблематичне области. Анализа EUCAST података који су генерисани током година идентификовала је такве ситуације, које су назване Област техничке несигурности (ОТН). ОТН - ови су упозорења да постоји неизвјесност која се мора ријешити прије него што колегама клиничарима прослиједимо резултате ТАО. ОТН не треба да се саопштава колегама клиничарима, осим под посебним околностима и само као дио дискусије о терапијским алтернативама у тешким случајевима.

У продужетку су наведене алтернативе на који начин можемо поступати са ОТН - овима. Које од ових акција ће бити изабране зависиће од ситуације. На предузете мјере ће утицати тип узорка (хемокултура у односу на уринокултуру), број расположивих алтернативних средстава и тежина болести, без обзира да ли је консултација са колегама клиничарима могућа.

- *Поновити тест*

Важи само уколико постоји разлог за сумњу на техничку грешку у ТАО.

- *Извршити алтернативни тест (одредити МИК)*

Ово може бити релевантно ако извјештај о осјетљивости оставља само неколико терапијских алтернатива или ако је резултат важан. Ако је организам мулти - резистентан, препоручљиво је да се изврши одређивање МИК-а за неколико антибиотика, могуће проширење ТАО на антибиотике као што су нове комбинације инхибитора бета - лактамаза и колистин за Грам - негативне бактерије. Понекад је неопходно извршити генотипску или фенотипску карактеризацију механизма резистенције како би се добило више информација.

- *Снижавати категорију осјетљивости*

Ако постоје друге терапеутске алтернативе у извјештају ТАО, допуштено је снизити категорију осјетљивости (са С на И, или са И на Р или са С на Р). Међутим, треба укључити коментар, а изолат сачувати за даље тестирање.

- *Укључити несигурност у извјештај о испитивању*

Уобичајена пракса у многим лабораторијским извјештајима о испитивању је да укључе информације о несигурности пријављеног резултата. Ово се може рјешити на неколико алтернативних начина:

1. За озбиљне ситуације, искористите прилику да контактирате колеге клиничаре да бисте објаснили и дискутовали о резултатима.
2. Категорисати резултат према граничним вриједностима, али укључити информације о техничким потешкоћама и / или несигурности интерпретације. У многим случајевима, "Р" је мање двосмислен од других алтернатива, посебно када постоје алтернативни антимикуробни агенси.

Област техничке несигурности обично је наведена као дефинисана опсег од 2 - 4 mm.

Одсуство ОТН-а (МИК и / или пречник зоне) значи да нема тренутне потребе за упозорењем.

Болница Бијељина	Страна 7 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-001
		2	2023-02-02	

Линк за Водич докумената доступан на EUCAST вебсајту.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Није примјењиво.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Није примјењиво.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Није примјењиво.

17. АЛАРМАНТНЕ / КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

EUCAST - ове граничне вриједности се користе да категорису резултат антибиограма у три категорије осјетљивости:

С - Осјетљив, стандардни режим дозирања: Микроорганизам је категорисан као Осјетљив, стандардни режим дозирања, када постоји велика вјероватноћа терапијског успјеха уз коришћење стандардног режима дозирања антимикубног агенса.

И - Осјетљив, повећана изложеност: Микроорганизам је категорисан као Осјетљив, повећана изложеност * када постоји велика вјероватноћа терапијског успјеха, јер се изложеност антимикубном агенсу повећава прилагођавањем режима дозирања или његовим концентрисањем на мјесту инфекције.

Р - Резистентан: Микроорганизам је категорисан као Резистентан када постоји велика вјероватноћа неуспјеха терапије, чак и када се повећава изложеност антимикубном агенсу.

*Изложеност је функција начина примјене, дозе, интервала дозирања, времена инфузије, као и дистрибуције, метаболизма и излучивања антимикубног агенса која утиче на микроорганизам на мјесту инфекције.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Одступање од дефинисане процедуре, као и одступање квалитета реагенаса могу довести до варијација у резултату, што се надзире интерном контролом квалитета.

Болница Бијељина	Страна 8 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-001
		2	2023-02-02	

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Antimicrobial susceptibility testing, EUCAST, 2022

Disk Diffusion Test Methodology, EUCAST, 2022

Лабораторијска дијагностика у клиничкој бактериологији, др Љ. Мугоша и сар., Министарство здравља Црне Горе, 2012

www.eucast.org

