TODY LABORATORIES INT. SRL

todylaboratories®
Susceptibility Discs

BIOANALYSE® AST
DISCURI DE TESTARE A SENSIBILITATII LA ANTIBIOTICE

MANUAL DE UTILIZARE

In bacteriologia clinica, sensibilitatea bacteriilor la sulfamide si antibiotice este, de obicei, detectata prin utilizarea tehnicii de difuzie in gel.
Discurile Bioanalyse® sunt standardizate cu atentie prin utilizarea unei hartii speciale cu o capacitatea de absorbtie crescuta. Discurile sunt controlate pentru sterilitate si concentratie minima inhibitorie.

Test de Sensibilitate Standardizat

1. Mediul: Este general acceptat ca mediul Mueller-Hinton este cel mai adecvat pentru studiile de testare a sensibilitatii la antibiotice. Pentru turnare in placi Petri, mediul steril este adus la 45 - 50°C.
2. Stratul de Agar turnat in placa trebuie sa aiba o inaltime de 4 mm. Pentru placile cu diametru de 90 mm, este suficienta o cantitate de 25 ml mediu.
3. pH: pH-ul mediului trebuie sa fie cuprins intre 7.2 si 7.4.
4. Pastrarea: Placile Petri se pastreaza la +4°C invelite in folii de celofan, pentru a preveni deshidratarea mediului. Pentru a inlatura excesul de umiditate si picaturile de condens de pe suprafata mediului, inainte de a fi utilizate, placile vor fi tinute timp de 30 minute in incubator sau o ora la temperatura camerei. Acest mediu, fara adaus de sange este adecvat pentru cresterea multor microorganisme aerobe. Pentru microorganismele pretentioase precum streptococii si gonococii, se va adauga 5% sange defibrinat de oaie, iepure sau cal, dupa ce mediul a fost racit pana la temperatura de 45 - 50°C. Pentru a obtine rezultate valide, placile vor fi utilizate cand au suprafetele umede.
5. Prepararea Materialelor: Cu ajutorul unei anse sterile, se iau din mediul de izolare primara 4 – 5 colonii cu morfologii similare; acestea se vor suspenda in 4 – 5 ml bulion (Mueller-Hinton, bulion triptona soia sau infuzie de creier – inima) si vor fi incubate timp de 2-5 ore la 37ºC. Daca la sfarsitul timpului de incubare se obtine o turbiditate vizibila, suspensia bacteriena este ajustata fata de standardul Mac Farland (0.5 ml sol $BaCl_2.2H_2O$ + 99.5 ml sol H_2SO_4 0.36 N (1%) cu ser fiziologic sau bulion, apoi se face inocularea. In cazul in care concentratia bacteriana este scazuta, inocularea se efectueaza dupa 2 – 8 ore de la incubare.
6. Inocularea in placile Petri: Inocularea se face conform tehnicilor de laborator descrise de Bauer si Kirby. Suspensia bacteriana se omogenizeaza cu ajutorul unui aplicator steril iar excesul de fluid din aplicator este inlaturat prin presarea si rotirea aplicatorului in interiorul tubului, deasupra nivelului de fluid. Insamantati suprafata mediului prin striere in trei directii diferite prin rotirea placilor in unghiuri de 60° dupa fiecare striere.
7. Se freaca aplicatorul pe toata suprafata placii. O alta metoda este prin “picurarea si dispersarea suspensiei”. Pipetati cativa ml de suspensie peste mediul de agar si rotiti usor pentru a-l acoperi complet (2 – 5 ml, in functie de suprafata). Prin aspirare, inalturati cat mai mult din excesul de fluid.
8. Dupa insamantare, toate placile Petri se vor usca la temperatura camerei timp de 15 – 20 minute.
9. Desigilati cartusul sub flacara dupa care distribuiti discurile in cutiile Petri cu ajutorul unei pensete sau al unui dispenser. Este important sa presati usor discurile dispersate cu o penseta flambata si racita. Pentru a observa clar zona de inhibitie, spatiul dintre discuri nu trebuie sa fie mai mic de 24 mm iar distanta dintre disc si marginea placii trebuie sa fie de 1 cm.

10. Asezati placile Petri inversate in incubator. Dupa incubare la 37 °C timp de 18 ore (o noapte) zonele de inhibitie dezvoltate trebuie comparate cu valorile corespunzatoare din Standardul CLSI. Pentru controlul calitatii discurilor Bioanalyse® AST (Antimicrobial Susceptibility Testing) au fost utilizate urmatoarele tulpini standard: Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853), Escherichia coli (ATCC 25922) si Staphylococcus aureus (ATCC 25923).

11. Citirea zonelor de inhibitie: Dupa o incubare la 37 °C timp de 18 ore (o noapte), pe placile care au fost preparate corespunzator se vor obtine zone clare de inhibitie. Dupa 6 – 8 ore se pot observa zone primare de inhibitie, insa confirmarea zonelor se face numai la sfarsitul incubarii de peste noapte. Diametrul zonei de inhibitie se va masura pe partea inferioara a placii. In cazul mediului agar sange, zona de inhibitie se va masura la suprafara placii cu un compas. Interpretarea (in scopuri clinice sau de control de calitate) zonelor de inhibitie se regaseste in Standardul CLSI. Rezultatele obtinute se vor interpreta fie ca:
    S - sensibil, I – intermediar sau R – rezistent

12. Posibile surse de eroare:

(1) Inocul nu poate fi ajustat conform standardului McFarland Nr. 0.5. Zonele de inhibitie vor fi mai mici in cazul unui inocul cu o concentratie mare de bacterii. Situatia opusa poate fi de asemenea, considerata.
(2) Utilizarea de culturi mixte: Principiul fundamental al acestei metode standardizate este utlizarea unei culturi pure. Inoculul preparat din culturi mixte va cauza rezultate eronate.
(3) Umiditatea excesiva de pe suprafata mediului poate determina o crestere puternica a coloniilor iar acest fapt conduce la zone de inhibitie mai mici. Contrar, o suprafata prea uscata poate cauza o crestere slaba iar zonele de inhibitie pot sa fie mai mari.

Rev: feb.02.2017 MS

SC Tody Laboratories INT. SRL
Adresa: Str. Vadul Moldovei, nr 22, Sector 1, Bucuresti, Romania
Tel.: +4021 269 00 00 Fax: +4021 269 06 41
www.todylaboratories.com

Bioanalyse®