

1. Pregătirea plăcilor nutritive

1.1 Plăcile nutritive se prepară în conformitate cu instrucțiunea. În practica națională încă se mai folosește mediul AGV, iar în practica mondială numai geloza Mueller-Hinton. Este important de a nu supraîncălzi mediul la preparare. După pregătire este necesar de determinat pH-ul (7,2–7,4), deoarece la virarea pH-ului spre acid sau bază se poate schimba considerabil atât difuziunea antibioticului, cât și creșterea culturii. Scăderea pH-ului conduce la micșorarea activității aminoglicozidelor, macrolidelor și mărirea activității penicilinelor. Controlul pH-ului cu ajutorul pH-metrului trebuie să fie o procedură obligatorie.

1.2 După autoclavare, mediul se răcește până la 45–50° și se toarnă în cutii amplasate pe o suprafață orizontală, în așa fel ca grosimea plăcii să constituie $4,0 \pm 0,5$ mm, ceea ce corespunde la 25 ml mediu pentru cutiile cu diametru de 100 mm.

1.3 La folosirea plăcilor proaspăt pregătite, ele se usucă în poziție orizontală timp de 10–20 minute la 35–37°C cu capacele întredeschise. Înainte de inoculare, e necesar de verificat lipsa condensatului pe partea internă a capacului.

1.4 Cutiile se păstrează la temperatura +4- +8°C în ambalaj din plastic închis ermetic, timp de 1 săptămână.

Materiale pentru efectuarea metodei difuzimetrice:

- 1) medii nutritive: geloză Mueller-Hinton (GMH) AGV;
- 2) trusă cu discuri antimicrobiene;
- 3) soluție Na Cl 0,9% sterilă;
- 4) tamponane din vată sterile standarde;
- 5) etalonul nr. 0,5 din scara Mac Farland cu suflat de bariu.

Etaple efectuării metodei difuzimetrice:

- 1) pregătirea plăcilor nutritive;
- 2) pregătirea suspensiei microbiene și inocularea;
- 3) aplicarea discurilor și termostatarea;
- 4) interpretarea rezultatelor.

2. Prepararea suspensiei de microorganisme și inocularea

2.1. Suspensia de microorganisme se prepară din cultură de 16–18 ore crescută pe geloză, în soluție 0,9% NaCl până la turbiditatea corespunzătoare etalonului 0,5 Mac Farland. Din momentul etalonării culturii, plăcile trebuie însămânțate în maximum 15 minute.

2.2. Însămânțarea plăcilor se efectuează cu ajutorul tamponelor din vată sterile. Se imersează tamponul de vată în inoculum etalonat, se scurge excesul de lichid prin rotirea fermă a tamponului de peretele tubului. Se descarcă tamponul în striuri paralele, peste toată suprafața mediului, succesiv în 3 direcții prin întoarcerea plăcii cu câte 60° . În final se parcurge cu vârful tamponului toată circumferința mediului la limita cu sticla. Se lasă placa însămânțată timp de câteva minute (nu mai mult de 15), pentru absorbția inoculului.

2.3. În lipsa tamponelor standarde, se folosesc tampoane din vată pe tijă din lemn pregătite în condiții de laborator, care sunt sterilizate în dispozitive din sticlă sau în hârtie prin autoclavare la 0,5 atm. 30 min.

2.4. Prepararea standardului de turbiditate 0,5 unități Mc Farland se face în felul următor. La 0,5 ml soluție BaCl_2 cu concentrația 0,048 mol/l (1,175% soluție $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) se adaugă încet, amestecând minuțios 99,5 ml soluție H_2SO_4 cu concentrația 0,18 mol/l (1%) până la obținerea unei suspensii omogene. Corectitudinea pregătirii suspensiei se verifică la spectrofotometru. Absorbția luminii cu lungimea de undă 625 nm prin chiuveta de 1 cm trebuie să fie 0,08–0,10. Suspensia preparată va fi repartizată câte 4–6 ml în tuburi cu dopuri etanșe. Tuburile vor fi de același diametru ca și cele utilizate pentru prepararea suspensiei bacteriene.

Tuburile cu suspensia standardă vor fi păstrate la temperatura camerei într-un loc întunecat. Înainte de utilizare, tuburile vor fi minuțios agitate și se va aprecia omogenitatea suspensiei. La apariția particulelor vizibile tuburile nu vor mai fi utilizate.

La fiecare lună, standardul de turbiditate trebuie reînnoit și controlată densitatea lui optică.

3. Aplicarea discurilor și termostatarea

3.1. Ambalajele cu discuri antimicrobiene se scot din frigider și se mențin închise etanș 1–2 ore, la temperatura camerei pentru echilibrarea termică. Astfel se evită condensarea apei pe discurile reci. Este necesară protejarea discurilor de umiditate atât la păstrarea, cât și la folosirea lor (silico-gel). După luarea discului, flaconul se închide cu dopul. Nu se permite a lăsa flaconul deschis la locul de muncă, la acțiunea directă a razelor solare și aflarea în apropierea nemijlocită lângă surse de temperatură.

3.2. Discurile cu antibiotice se aplică nu mai târziu de 15 min. după însămânțare, cu ajutorul unei pense sterile sau dispenserului automat. Distanța dintre discuri, dintre disc și marginea plăcii trebuie să fie de 15–20 mm. Astfel, pe suprafața unei cutii cu diametrul de 100 mm se aplică nu mai mult de 6 discuri. Fiecare disc se presează ferm pe suprafața mediului pentru a asigura contactul discului cu placa. Se incubează imediat plăcile la 35–37°C pentru 18–20 ore.

3.3. Nu se permite folosirea discurilor preparate individual, a discurilor cu termenul de păstrare expirat și netestate pe culturi de referință.

3.4. Se recomandă de păstrat discurile în frigider la t° +4+8°C sau congelate la t° de 14–20°C (camera de congelare a frigiderului casnic).

Discurile cu carbapeneme, cefaclor și preparate combinate cu acid clavulanic sunt păstrate în stare congelată până la folosire. Discurile ce conțin restul β -lactaminelor se păstrează la t° +4+8°C timp de numai o săptămână; la folosirea mai îndelungată se păstrează numai în stare congelată.

4. Interpretarea rezultatelor

4.1. Pentru determinarea diametrului zonei de inhibiție completă a creșterii, cutiile sunt aranjate cu fundul pe o suprafață întunecată, astfel ca lumina lămpii de masă să cadă sub un unghi de

45°. Diametrul zonei de inhibiție completă a creșterii se măsoară cu precizie până la 1 mm cu ajutorul unei rigle gradate transparente sau cu șublerul.

4.2. Dacă mediul este netransparent, se ia capacul cutiei și zona de inhibiție completă a creșterii se determină cu ajutorul șublerului.

4.3. La determinarea zonei de inhibiție completă a creșterii se orientează la lipsa totală a creșterii vizibile. Nu se ia în considerare creșterea abia vizibilă la marginea zonei. Coloniile de dimensiuni mari, care se găsesc în raza de inhibiție a creșterii, ne denotă prezența microflorei străine sau heterorezistența populației. În acest caz este necesar de repetat identificarea și determinarea sensibilității la antibiotice. Determinarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor de protei, care cresc în pânză, zona de reținere a creșterii poate fi împăinjenită cu un val abia vizibil, care nu împiedică determinarea hotarelor zonei.

4.4. Rezultatele se interpretează conform datelor din tabele (anexa nr. 1).

5. Controlul intern al calității determinării antibioticogramelor

5.1. Controlul calității investigațiilor poate fi unic (de situație) și curent (planificat). Controlul unic se efectuează în caz de:

- schimbare a lotului mediului nutritiv,
- primire a unui lot nou de discuri,
- controlul culturii de referință.

Controlul curent se efectuează permanent. Optimă ar fi efectuarea controlului calității cu folosirea tulpinilor referente la fiecare investigație, însă în practică, la obținerea rezultatelor stabile timp de o lună, frecvența investigațiilor de control poate fi redusă până 1-2 ori în săptămână.

5.2. În calitate de tulpini referente se folosesc culturile de microorganisme ce aparțin colecției Americane de culturi tipice (ATCC). Alegerea tulpinilor referente pentru efectuarea cercetărilor de control se determină în conformitate cu tipul microorganismului cere-

tat: Enterobacteriaceae – E. coli ATCC 25922, E. coli ATCC 35218 – pentru determinarea sensibilității la penicilinele inhibitor-protectoare:

- + *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. ș.a. nefermentative - *P. aeruginosa* ATCC 27853;
- + *Staphylococcus* spp. – *S. aureus* ATCC 25923;
- + *Streptococcus* spp. – *S. pneumoniae* ATCC 46619;
- + *Haemophilus* spp. *H. influenzae* ATCC 49247;
- + *H. influenzae* ATCC 49766;
- + *Neisseria gonorrhoeae* – *N. gonorrhoeae* ATCC 49266.

5.3. Rezultatele cercetărilor sensibilității la antibiotice a tulpinilor referente trebuie să corespundă datelor din tabele (anexa nr. 2).

5.4. Frecvența controlului de calitate. Optimă este efectuarea controlului de calitate a sensibilității cu utilizarea setului tulpinilor de control în fiecare zi, paralel cu testarea tulpinilor clinice. Dar în practică la obținerea rezultatelor stabile a controlului de calitate timp de o lună frecvența investigațiilor de control poate fi redusă până la 1–2 ori pe săptămână. Investigațiile de control trebuie efectuate la utilizarea unor noi partide de reagenți și, mai întâi de toate, a mediilor nutritive. Totodată, dacă la efectuarea unui așa mod de testare rezultatele vor ieși din parametrii indicați, e necesar de a reveni la controlul de calitate zilnic pentru descifrarea cauzei obținerii rezultatelor incorecte.

6. Controlul intern al calității mediilor nutritive

6.1. Se supune controlului fiecă lot nou de medii.

6.2. Determinarea pH-ului mediului. Se efectuează după autoclavare, după introducerea tuturor adausurilor și răcire până la 25°C; diapazonul optim 7,2–7,4.

6.3. Controlul compoziției cationice. Mediul nutritiv trebuie să conțină Ca ++ 20–25 mg/l, Mg ++ 10–12,5 mg/l. Metoda integrală, mai accesibilă, pentru aprecierea calității mediilor nutritive (lichide, solide), este folosirea *P. aeruginosa* ATCC 27853. Mediul este considerat satisfăcător, dacă mărimea CMI gentamicinei constituie

0,5–2,0 mg/ml. Alegerea gentamicinei pentru controlul calității se datorează faptului că antibioticele aminoglicozide sunt mai sensibile la devierile concentrațiilor cationilor bivalenți.

6.4. Pentru controlul prezenței antagoniștilor preparatelor sulfamilamidice și trimetoprimei este recomandată folosirea *E. faecalis* ATCC 29212. La CMI a trimetoprimei / sulfametoxazolului sub 0,5–9,5 mg/ml – mediul se apreciază satisfăcător.

6.5. Mediul AGV poate fi folosit pentru testarea microorganismelor familiei *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter spp.* și *Staphylococcus spp.* la toate preparatele antimicrobiene, cu excepția trimetoprimei/sulfametoxazolului. În scopul aprecierii activității antimicrobiene a trimetoprimei/sulfametoxazolului pentru toate genurile de bacterii se folosește numai GMH.

Pentru determinarea sensibilității *P. aeruginosa* la imipenem, aminoglicozide și ftorhinolone se folosește numai mediul GMH; pe mediul AGV se permite testarea *P. aeruginosa* la ticarcilină / clavulanat, cefoperazonă și cefpiromă.

Determinarea rezistenței la antibiotice a microorganismelor cu cerințe nutritive dificile

Determinarea rezistenței la antibiotice a microorganismelor cu cerințe nutritive dificile constituie una din cele mai complicate probleme, deoarece necesită concomitent folosirea metodei diluțiilor succesive și metodei difuzimetrice, se cere o deosebită atenție la executarea tuturor procedurilor, începând cu pregătirea mediilor nutritive și finisând cu efectuarea controlului calității. Totodată, eficacitatea terapiei empirice a multor infecții, determinate de microorganismele acestei grupe, este bine prognosticată.

Luând în considerare toate acestea, la planificarea efectuării investigațiilor rezistenței la antibiotice e necesar de a aprecia obiectiv corelația cost și eficacitate (însemnătatea clinică) a acestei lucrări, la fel, de a compara costul utilajului tehnico-material integru cu resursele accesibile. Încercările de a modifica doar neînsemnat metodele standarde (înlocuirea reagenților costisitori cu reagenți mai ieftini) pot conduce la erori principiale, la obținerea rezultatelor false.

Determinarea sensibilității la antibiotice a *Streptococcus pneumoniae*

În lucrarea «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов методам диффузии в агар с использованием дисков». (1983), scrisoarea metodică «Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов дискодиффузионным методом» (1984) și „Методические указания по определению чувствительности стрептококков к антибиотикам” (1985), metodică testării pneumococilor nu e descrisă. De aceea, sensibilitatea pneumococilor la antibiotice se determină în conformitate cu recomandările NCCLS Comitetul Național de Standarde Clinice de Laborator a SUA.

Obligatorie este determinarea sensibilității pneumococilor la penicilină, eritromicină, trimetoprim sulfametoxazol (I grupă). Determinarea sensibilității la alte preparate, spre exemplu, tetracilină, ofloxacină și vancomicină, se efectuează numai la necesitate (prezența rezistenței la preparatele I grupe etc.)

În infecțiile de sistem și rezistența la penicilină, în trusa obligatorie de antibiotice pentru aprecierea sensibilității intră cefalosporinele de generația III (cefataximă sau ceftriaxonă).

În activitatea practică pentru aprecierea rezistenței pneumococilor izolați din locusurile sterile (sânge, LCR) și nesterile ale organismului uman este binevenită folosirea diferitelor metode.

Gama antibioticelor pentru testare este prezentată în *tabelul nr. 1*.

Tabelul nr. 1

Antibioticele folosite pentru testarea sensibilității *Streptococcus pneumoniae*

Sursa de izolare	Preparatele I rând	Preparatele de rezervă
Locusurile nesterile	Penicilină Eritromicină Co-trimoxazol	Cefotaxină (ceftriaxonă) amoxicilina tetracilină

		ofloxacină clindamicină cloramfenicol rifampină
Sânge, LCR	Penicilină Cefotaximă (ceftriaxonă) Carbapeneme Vancomicină	Amoxicilină Tetraciclină Ofloxacină Clindamicină Cloramfenicol Rimefampină

Notă: Pentru cercetări se aplică numai metoda diluțiilor succesive.

S. pneumoniae, izolate din locusurile nesterile.

În practică, la cercetarea pneumococilor izolați din locusurile nesterile, în primul rând, este necesar de determinat sensibilitatea la penicilină (metoda scrining cu rondelile cu 1 μg oxacilin), eritromicină, cotrimoxazol.

Determinarea sensibilității la preparatele suplimentare este condiționată de localizarea și gradul de dezvoltare a procesului infecțios.

S. pneumoniae, izolate din sânge și licvor.

În infecții sistemice provocate de pneumococi penicilinorezistenți terapia cu penicilină și în unele cazuri cu cefalosporine de generația a III poate fi inefficientă. În legătură cu aceasta, investigarea sensibilității tulpinilor de pneumococi izolați din *sânge* și licvor către cefalosporinele III și IV și carbapeneme (metoda diluțiilor succesive) cloramfenicol, rifampin, și vancomicin trebuie efectuată până la obținerea rezultatelor scriningului cu oxacilină.

7. Metoda determinării sensibilității pneumococilor la antibiotice

Determinarea sensibilității pneumococilor la penicilină se efectuează prin metoda scrining cu disc, ce conține 1 μg oxacilină. Aceasta ne permite a face diferențierea tulpinilor de pneumococi

„sensibili” de cei „intermediari” și „rezistenți”. Folosirea discurilor cu oxacilină se explică prin faptul că discurile cu penicilină nu întotdeauna denotă tulpinile de pneumococ relativ-rezistente.

Folosirea metodei difuzimetrice la determinarea sensibilității *S. pneumoniae* la cefalosporine, ampicilină, amoxicilină, carbapeneme nu dă rezultate veridice, de aceea determinarea sensibilității la aceste antibiotice se efectuează numai prin metoda diluțiilor succesive.

Reactive și materiale:

- 1) plăci cu geloză Mueller-Hinton (GMH) cu adaos de 5% sânge defibrinat de berbec;
- 2) discuri standarde cu antibiotice – 1 μg oxacilină, 15 mcg eritromicină, 1,25/23,75 μg trimetoprimă / sulfametoxazol, 30 μg tetracilină, 30 μg cloramfenicol, 5 μg ofloxacină;
- 3) soluție 0,9% Na Cl sterilă;
- 4) tampoane de vată standarde sterile;
- 5) etalonul nr. 0,5 din scara Mac Farland cu sulfat de bariu ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Tehnica efectuării

GMH se pregătește conform prescrierii din foaia de însoțire. După adăugarea a 5% sânge defibrinat de berbec, se toarnă în cutii cu grosimea plăcii de 4 mm (pentru cutiile cu diametrul 100 mm e necesar 25 ml mediu, pentru cutiile cu diametrul 90 mm – 20 ml).

Suspensia microbiană se prepară din cultură *S. pneumoniae* de 18–24 ore, crescută pe geloză sânge, în soluție 0,9% clorură de sodiu până la turbiditatea corespunzătoare etalonului 0,5 Mac-Farland. Însămânțarea plăcilor se efectuează cu ajutorul tamponelor din vată sterile. Se imersează tamponul de vată în inoculumul microbian etalonat, se scurge excesul de lichid prin rotire fermă a tamponului de peretele tubului. Se descarcă tamponul în striuri paralele, pe toată suprafața mediului, succesiv în 3 direcții prin întoarcerea plăcii cu câte 60°. În final se parcurge cu vârful tamponului toată circumferința mediului la limită cu sticla. Se lasă placa

însămânțată timp de 3–5 minute (nu mai mult de 15), pentru absorbția inoculului. Se depun discurile cu antibiotic – nu mai mult de 6 discuri pe placa cu diametrul 100 mm. Se presează ferm cu pensa fiecare disc pe suprafața mediului. La tulpinile izolate din sânge, lichidul cefalorahidian, concomitent se determină CMI a penicilinei și cefotaximei (sau ceftriaxonei). Plăcile se incubează la 35–37°C pentru 20–24 ore în atmosferă cu 5–7% CO².

Citirea rezultatelor:

Diametrul zonelor de inhibiție completă a creșterii se măsoară cu șublerul sau rigla gradată.

Interpretarea rezultatelor

1. Pneumococii cu zona de inhibiție completă a creșterii 20 mm sunt sensibili (CMI <0,06 mg/l) la penicilină și se consideră sensibili la ampicilină, amoxicilină (clavulanat, ampicilină) sulbactan, cefaclor, cefuroxim, ceftriaxonă, imipenem, meropenem;

2. Pentru determinarea sensibilității la alte antibiotice (eritromicină, trimetoprim), sulfametoxazol, tetracilină, cloramfenicol, ofloxacină se folosesc datele din *tabelul nr. 2*.

3. Pneumococii cu zona de inhibiție completă a creșterii <19 mm nu totdeauna sunt rezistenți la penicilină (aproximativ 12% *S. pneumoniae* cu zona de inhibiție a creșterii <19 mm posedă CMI în diapazon 0,03–0,06 mg/l), de aceea sensibilitatea la penicilină și alte antibiotice β-lactamice se determină numai prin metoda diluțiilor succesive sau testelor-E (*tabelul nr. 2*).

Tabelul nr. 2

Criteriile de interpretare a sensibilității pneumococilor prin metoda difuzimetrică pe geloză Mueller-Hinton cu 5% sânge defibrinat de berbec

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă, mg	Diametrul zonei de inhibiție, mm		
		rezistent	intermediar	sensibil
Penicilină (disc cu oxacilină)	1	–	–	≥ 20

Eritromicină	15	≤ 15	16-20	≥ 21
Tetracilină	30	≤ 18	19-22	≥ 23
Trimetoprim / Sulfametoxazol	1,25/23,75	≤ 15	16-19	≥ 20
Cloramfenicol	30	≤ 20	-	≥ 21
Ofloxacină	5	≤ 12	13-15	≥ 16

8. Folosirea mediului AGV pentru determinarea sensibilității pneumococilor la antibiotice

Luând în considerare că geloza Mueller-Hinton este inaccesibilă pentru multe laboratoare, au fost efectuate cercetări asupra posibilității folosirii mediului nutritiv AGV, îmbogățit cu 5% sânge defibrinat uman, în loc de GMH cu 5% sânge defibrinat de berbec, pentru determinarea sensibilității pneumococilor la PA prin metoda difuzimetrică și interpretarea rezultatelor conform standardului NCCLS.

La determinarea sensibilității pneumococilor la penicilină (folosirea discului cu oxacilină 1 μg), macrolide (claritromicină, azitromicină), clindamicină și ofloxacină pe mediul AGV prin metoda difuzimetrică, diametrul zonei de inhibiție completă a creșterii nu diferă semnificativ de cel obținut pe GMH cu 5% sânge defibrinat de berbec. Sensibilitatea tulpinii de referință *S. pneumoniae* ATCC 49619 la aceste antibiotice la fel s-a aflat în diapazoanele indicate în NCCLS.

Astfel, în lipsa GMH, poate fi folosit mediul AGV pentru determinarea sensibilității pneumococilor la oxacilină, claritromicină, azitromicină, clindamicină, ofloxacină prin metoda difuzimetrică și de interpretat rezultatele conform criteriilor NCCLS (tabelul 3).

Tabelul nr. 3

Criteriile de interpretare a sensibilității pneumococilor prin metoda difuzimetrică pe mediul AGV cu adaos de 5% sânge defibrinat uman

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă	Diametrul zonei de inhibiție, mm		
		rezistent	intermediar	sensibil
Penicilină disc (cu 1 mg oxacilină)	1	-	-	≥ 20

Azitromicină	15	≤ 13	14–17	≥ 18
Claritromicină	15	≤ 16	17–20	≥ 21
Clindamicină	2	≤ 15	16–18	≥ 19
Ofloxacină	5	≤ 12	13–15	≥ 16

Mediul AGV nu se folosește pentru determinarea sensibilității pneumococilor la trimetoprim / sulfametoxazol, deoarece conține o cantitate mărită de timină și timidină ce micșorează activitatea lor antimicrobiană in vitro.

Controlul calității

Se folosește *S. pneumoniae* ATCC 49619. Procedura și interpretarea corespund procedurii de lucru cu inoculumul prelevat. Rezultatele se apreciază după criteriile date în *tabelul nr. 4*.

Tabelul nr. 4

Diametrele zonelor de inhibiție ale tulpinilor de referință *S. pneumoniae* ATCC 49619

Agent antimicrobian	Diametrul zonei de inhibiție <i>S. pneumoniae</i> ATSS 49619, mm
Penicilină (disc cu oxacilină)	8–12
Eritromicină	25–30
Azitromicină	19–25
Claritromicină	25–31
Tetraciclină	27–31
Trimetoprim/sulfametoxazol	20–28
Cloramfenicol	23–27
Ofloxacină	16–21
Clindamicină	19–25

9. Determinarea sensibilității la antibiotice a *Haemophilus* SPP

Haemophilus spp. se caracterizează printr-o sensibilitate naturală la majoritatea preparatelor antibacteriene, inclusiv beta-lactamice.

Activitate antimicrobiană pentru *H. influenzae* posedă antibioticele: aminopenicilinele (ampicilină, amoxicilină); ureidopeni-

cilenele (piperacilina); penicilinele inhibitoare (amoxicilină-clavulanat, ampicilină/sulbactam, piperacilină / tazobactam, ticarcilină/clavulanat); cefalosporine generația II (cefuroxim, cefaclor), generația III (ceftriaxonă, cefotaximă, cefoperazonă), generația IV (cefepimă; cefpirom):

- ★ carbapeneme; macrolide (azitromicină, claritromicină);
- ★ tetraciline (tetraciclina, doxaciclină); ftorhionolone (ciprofloxacină, ofloxacină, pefloxacină, levofloxacină); rifampicină; cloramfenicol; co-trimoxazol.

★ excepție importantă este lipsa eficacității **cefalosporinelor de generația I** pentru *Haemophilus* spp.

O deosebită importanță clinică are rezistența dobândită la **ampicilină** legată de producerea beta-lactamazei plasmidice. Cu excepția ampicilinei, aceste enzime frecvent hidrolizează cefalosporinele de generația I, dar nu sunt active în ceea ce privește preparatele generațiilor II–III. Frecvența rezistenței la alte antibiotice poate varia considerabil.

Antibioticele **macrolide** nu se evidențiază printr-un nivel mare de activitate în privința *Haemophilus* spp., cu toate acestea, printre ele există diferențe neînsemnate (activitate mai pronunțată este caracteristică pentru claritromicină și azitromicină).

Până în prezent nu au fost obținute tulpini clinice de *H. influenzae* rezistente la cefalosporinele de generațiile III–IV, carbapeneme și ftorhionolone.

Tabelul nr. 5

Preparatele antibacteriene pentru determinarea sensibilității *Haemophilus influenzae*

Sursa de izolare	Preparatele I rând	Preparatele de rezervă
Locusuri nesterile	Ampicilină Ampicilină/sulbactam Co-trimoxazol	Cefalosporine Tetraciclina Macrolide Cloramfenicol Ftorhionolone

Sânge, LCR	Ampicilină Cefalosporine III Carbapeneme Cloramfenicol	
------------	---	--

10. Metoda determinării sensibilității genului *Haemophilus* la antibiotice

Rezultatele cercetărilor comparative au demonstrat că la determinarea sensibilității tulpinilor de hemofile nu putem folosi mediul AGV cu adaosuri și geloză-ciocolată (GC) pe bază de AGV.

Conform recomandărilor NCCLS, pentru determinarea sensibilității genului *Haemophilus* se folosește numai mediul HTM (*Haemophilus* Test Medium), ce conține toți factorii de creștere necesari pentru hemofili. HTM constă din geloză Mueller-Hinton cu adaos de extract din drojzii și factori X și Y. HTM – mediu comercializat de producători străini, ce este dificil de preparat în laboratoare.

În lipsa HTM, determinarea sensibilității bacteriilor genului *Haemophilus* pe alte medii nu se efectuează, deoarece este mare frecvența rezultatelor false.

Particularitățile determinării sensibilității *Haemophilus influenzae*

1. Pentru pregătirea inoculumului se prepară o suspensie din cultură pe mediul GC de 18–24 ore în bulion Mueller-Hinton sau soluție fiziologică sterilă. Densitatea inoculumului trebuie să corespundă etalonului turbidității 0,5 Mac Farland.

Din momentul etalonării culturii, plăcile trebuie însămânțate în maximum 15 minute cu ajutorul tampoanelor din vată sterile.

2. În rezultatul zonelor mari de inhibiție a creșterii hemofilelor, se depun nu mai mult de 4 discuri pe o placă cu diametrul 90–100 mm.

3. Se incubează plăcile în atmosferă cu concentrația mărită de CO₂ (5–10%) în exicator sau CO₂ – incubator timp de 16–18 ore.

4. Pentru interpretarea rezultatelor se folosesc criteriile specifice, deosebite de criteriile interpretării rezultatelor determinării sensibilității microorganismelor nepretențioase.

Tabelul nr. 6

Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii *Haemophilus influenzae*

Agent antimicrobian	Conținut per rondela, mg	Diametrul zonei de inhibiție, mm		
		R	I	S
Ampicilină	10	≤ 18	19-21	≥ 22
Amoxicilină	20/10	≤ 19	—	≥ 20
Meropenem	10	.*	.*	≥ 20
Imipenem	10	.*	.*	≥ 16
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75	≤ 10	11-15	≥ 16
Cefotaximă	30	—	—	≥ 26
Ceftriaxonă	30	.*	.*	≥ 26
Ceftazidimă	30	.*	.*	≥ 26
Cloramfenicol	30	≤ 25	26-28	≥ 29
Azitromicină	15	.*	.*	≥ 12
Claritromicină	15	≤ 10	11-12	≥ 13
Tetraciclină	30	≤ 25	26-28	≥ 29
Ciprofloxacină	5	.*	.*	≥ 21

Notă: * Tulpini rezistente nu au fost izolate.

Controlul calității

Se folosesc două tulpini: *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 și *E. coli* ATCC 35218 (la testarea penicinelor inhibito-roprotectoare). Procedura și interpretarea corespund procedurii de lucru cu inoculul prelevat. Rezultatele se apreciază după criteriile date în **tabelul nr. 7.**

**Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii tulpinilor de referință
Haemophilus influenzae ATCC 49247 și E. coli ATCC 35218
(NCCLS, 1999)**

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă mg	H. influenzae ATSS 49247	E. coli ATSS 35218
Ampicilină	10	13-21	
Amoxicilină / clavulanat	20/10	15-23	18-22
Trimetoprim / sulfameto- zazol	1,25/23,75	24-32	
Meropenem	10	20-28	
Imipenem	10	21-29	
Cefotaxim	30	31-39	
Ceftriaxonă	30	31-39	
Cloramfenicol	30	31-40	
Azitromicină	15	13-21	
Claritromicină	15	11-17	
Tetraciclină	30	14-22	
Ciprofloxacină	5	34-42	

Fiecare lot de plăci e necesar să fie verificat la creșterea microorganismelor testate. Pentru aceasta se folosește tulpina de referință H. influenzae ATSS 10211 de 24 ore, din care se prepară suspensie microbiană ce corespunde etalonului de turbiditate 0,5 Mac Farland. Din suspensia obținută se pregătesc diluțiile succesive 1:10. Apoi se însămânțează câte 0,1ml suspensie din diluțiile -5,- 6, -7 pe plăcile HTM. Dacă proprietățile nutritive ale mediului corespund, atunci creșterea microorganismelor trebuie să fie evidențiată din diluțiile -6 și -7.

Anexe

Anexa nr. 1

Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii (mm) pentru Enterobacteriaceae spp.

Agent antimicrobian	Conținut per rondelă μg	Diametrul zonei de inhibiție, mm		
		Rezistent \leq	Intermediar	Sensibil \geq
Ampicilină	10	≤ 13	14–16	≥ 17
Carbenicilină	100	≤ 19	20–22	≥ 23
Ticarcilină	75	≤ 14	15–19	≥ 20
Mezlocilină	75	≤ 17	18–20	≥ 21
Piperacilină	100	≤ 17	18–20	≥ 21
Ampicilină/sulbatam	10/10	≤ 11	12–14	≥ 15
Amoxicilină/clavulanat	20/10	≤ 13	14–17	≥ 18
Tiraclină/clavulanat	75/10	≤ 14	15–19	≥ 20
Piperacilină/tazobactam	100/10	≤ 17	18–20	≥ 21
Cefalotină	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefazolină	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefaclor	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefamandol	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefuraxim Na	30	≤ 14	15–22	≥ 23
Cefuraxim axetil	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefoxitin	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefotetan	30	≤ 12	13–15	≥ 16
Cefmetazol	30	≤ 12	13–15	≥ 16
Cefoperazon	75	≤ 15	16–20	≥ 21
Cefotaxim	30	≤ 14	15–22	≥ 23
Ceftriaxonă	30	≤ 13	14–20	≥ 21
Ceftazidimă	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefpodoxim	5	≤ 15	16–18	≥ 19
Cefpodoxină	10	≤ 17	18–20	≥ 21
Ceftibutenă	30	≤ 17	18–20	≥ 21
Cefepimă	30	≤ 14	15–17	≥ 18

Aztreonam	30	≤ 15	16-21	≥ 22
Moxalactam	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Imipenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16
Meropenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16
Streptomicină	10	≤ 11	12-14	≥ 15
Canamicină	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Gentamicină	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Tobramicină	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Netilmicină	30	≤ 12	13-14	≥ 15
Amicacină	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Sizomicină	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Acid nalidixic	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Norfloxacină	10	≤ 12	13-16	≥ 17
Cinoxacină	100	≤ 14	15-18	≥ 19
Enoxacină	10	≤ 14	15-17	≥ 18
Pefloxacină	5	≤ 12	13-16	≥ 16
Ofloxacină	5	≤ 12	13-15	≥ 16
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Lomefloxacina	10	≤ 18	19-21	≥ 22
Tetracilină	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Doxiciclină	30	≤ 12	13-15	≥ 16
Minociclină	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Cloramfenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Co-trimoxazol	1.25/ 23.75	≤ 10	11-15	≥ 16
Nitrofurantoină	300	≤ 14	15-16	≥ 17

Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii pentru microorganismele nefermentative

Antibiotice	Per rondela (μg)	Diametrele zonelor de inhibiție (mm)		
		rezistente	intermediare	sensibile
Carbenicilină				
P. aeruginosa	100	≤ 13	14-16	≥ 17
Altele ^{A)}	100	≤ 19	20-22	≥ 23
Ticarcilină				
P. aeruginosa	75	≤ 14	-	≥ 15
Altele ^{B)}	75	≤ 14	15-19	≥ 20
Azlocilină (P. aeruginosa)	75	≤ 17	-	≥ 18

Mezlocilină				
P. aeruginosa	75	≤ 15	–	≥ 16
Altele ¹⁾	75	≤ 17	18–20	≥ 21
Piperacilina				
P. aeruginosa	100	≤ 17	–	≥ 18
Altele ¹⁾	100	≤ 17	18–20	≥ 21
Ampicilin/subactam	10/10	≤ 11	12–14	≥ 15
Ticarcilin/clavulanat				
P. aeruginosa	75/10	≤ 14	–	≥ 15
Acinetobacter spp.	75/10	≤ 14	15–19	≥ 20
Piperacilin/tazobactam				
P. aeruginosa	100/10	≤ 17	–	≥ 18
Acinetobacter spp.	100/10	≤ 17	18–20	≥ 21
Cefoperazonă	75	≤ 15	16–20	≥ 21
Cefotaxim	30	≤ 14	15–22	≥ 23
Ceftriaxon	30	≤ 13	14–20	≥ 21
Ceftazidim	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefepim	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefpirom				
Aztreonam	30	≤ 15	16–21	≥ 22
Moxalactam	30	≤ 14	15–22	≥ 23
Imipinem	10	≤ 13	14–15	≥ 16
Meropenem	10	≤ 13	14–15	≥ 16
Gentamicina	10	≤ 12	13–14	≥ 15
Tobramicină	10	≤ 12	13–14	≥ 15
Netilmicină	30	≤ 12	13–14	≥ 15
Amicacină	30	≤ 14	15–16	≥ 17
Sizomicină	10	≤ 12	13–14	≥ 15
Norfloxacină	10	≤ 12	13–16	≥ 17
Pefloxacină	5	≤ 12	13–16	≥ 16
Ofloxacină	5	≤ 12	13–15	≥ 16
Ciprofloxacină	5	≤ 15	16–20	≥ 21
Lomefloxacină	10	≤ 18	19–21	≥ 22
Cloramfenicol	30	≤ 12	13–17	≥ 18
Co-trimoxazol	1.25/ 23.75	≤ 10	11–15	≥ 16

Notă: 1) Metoda disco difuzimetrică este standardizată numai pentru *P. aeruginosa* și *Acinetobacter* spp, la examinarea antibioticorezistenței altor microorganisme nefermentative e necesar de a utiliza metoda diluțiilor succesive.

Diametrele zonelor de inhibiție (mm) *Staphylococcus* spp.

Antibiotice	Per rondela (μg)	Diametrele zonelor de inhibiție (mm)		
		rezistente	intermediare	sensibile
Benzilpenicilină	10 UI	≤ 28	–	≥ 29
Oxacilină	1	≤ 10	11–12	≥ 13
Ampicilină	10	≤ 28	–	≥ 29
Ampicilină/sulbactam	10/10	≤ 11	12–14	≥ 15
Amoxicilină/clavulanat	20/10	≤ 19	–	≥ 20
Ticarcilină/clavulanat	75/10	≤ 22	–	≥ 23
Piperacilină/tazobactam	100/10	≤ 17	–	≥ 18
Cefalotină	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefazolină	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefaclor	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefamandol	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefuroxim Na	30	≤ 14	15–22	≥ 23
Cefuroxim axetil	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefoxitină	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefotetan	30	≤ 12	13–15	≥ 16
Cefmetazol	30	≤ 12	13–15	≥ 16
Cefoperazon	75	≤ 15	16–20	≥ 21
Cefotaxim	30	≤ 14	15–22	≥ 23
Ceftriaxon	30	≤ 13	14–20	≥ 21
Ceftazidim	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefixim	5	≤ 15	16–18	≥ 19
Cefpodoxim	10	≤ 17	18–20	≥ 21
Ceftibuten	30	≤ 17	18–20	≥ 21
Cefepim	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Cefpirom		–		
Moxalactam	30	≤ 14	15–22	≥ 23
Imipinem	10	≤ 13	14–15	≥ 16
Meropenem	10	≤ 13	14–15	≥ 16
Canamicină	30	≤ 13	14–17	≥ 18

Gentamicină	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Tobramicină	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Netilmicină	30	≤ 12	13-14	≥ 15
Amicacină	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Sizomicină	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Norfloxacină	10	≤ 12	13-16	≥ 17
Enoxacină	10	≤ 14	15-17	≥ 18
Pefloxacină	5	≤ 12	13-16	≥ 16
Ofloxacină	5	≤ 12	13-15	≥ 16
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Lomefloxacina	10	≤ 18	19-21	≥ 22
Tetraciclină	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Doxiciclină	30	≤ 12	13-15	≥ 16
Minociclină	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Eritromicină	15	≤ 13	14-22	≥ 23
Claritromicină	15	≤ 13	14-17	≥ 18
Roxitromicină	15	≤ 16	17-21	≥ 22
Azitromicină	15	≤ 13	14-17	≥ 18
Spiramicină	100	≤ 20	19-23	≥ 24
Lincomicină	15	≤ 17	18-20	≥ 21
Clindamicină	2	≤ 14	15-20	≥ 21
Vancomicină	30	-	-	≥ 15
Cloramfenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Co-trimoxazol	1.25/23.75	≤ 10	11-15	≥ 16
Nitrofurantoină	300	≤ 14	15-16	≥ 17
Acid fuzidic	10	≤ 15	16-21	≥ 22
Rifampină	5	≤ 16	17-19	≥ 20

Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii *Enterococcus* spp.

Antibiotice	Per rondela (μg)	Diametrele zonelor de inhibiție (mm)		
		rezistente	intermediare	sensibile
Benzilpenicilină	10 UI	≤ 14	-	≥ 15
Ampicilină	10	≤ 16	-	≥ 17
ALTE PREPARATE				
Cloramfenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Tetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Doxiciclină	30	≤ 12	13-15	≥ 16
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21

Norfloxacină	10	≤ 12	13-16	≥ 17
Nitrofurantoină	300	≤ 14	15-16	≥ 17
Vancomicină	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Streptomicină (nivel mare)	300	≤ 6	7-9	≥ 10
Gentamicină (nivel mare)	120	≤ 6	7-9	≥ 10

Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii (mm) Streptococcus spp., cu excepția S. pneumoniae

Antibiotice	Per rondela (μg)	Diametrele zonelor de inhibiție (mm)		
		rezistente	intermediare	sensibile
Benzilpenicilină ¹	10 UI	≤ 19	20-27	≥ 28
Ampicilină ²	10	≤ 18	19-25	≥ 26
Cefotaximă	30	≤ 25	26-27	≥ 28
Ceftriaxon	30	≤ 24	25-26	≥ 27
Eritromicină	15	≤ 15	16-20	≥ 21
Claritromicină	15	≤ 16	17-20	≥ 21
Roxitromicină				
Azitromicină	15	≤ 13	14-17	≥ 18
Spiramicină				
Clindamicină	2	≤ 15	16-18	≥ 19
Tetraciclina	30	≤ 18	19-22	≥ 23
Ofloxacină ³	5	≤ 12	13-15	≥ 16
Cloramfenicol	30	≤ 17	18-20	≥ 21
Vancomicină	30	-	-	≥ 17

Notă:

- 1) Tulpinile *S. pyogenes* rezistente la peniciline nu sunt descrise.
- 2) Criteriile metodei difuzimetrice sunt acceptabile numai pentru streptococii β-hemolitici.
- 3) Criteriile metodei difuzimetrice și diluțiilor succesive sunt acceptabile numai pentru streptococii beta-hemolitici

Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii pentru tulpinile de referință cu necesități nutritive obișnuite

Antibiotice	Per rondelă, μg	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Benzilpenicilină	6 (10 UI)	-	26-37	-
Ampicilină	10	16-22	27-35	-

Ampicilină/sulbactam	10/10	20-24	29-37	-
Oxacilină	1	-	18-24	-
Carbencilină	100	23-29	-	18-24
Ticarcilină	75	24-30	-	22-28
Ticarcilină/clavulanat	75/10	25-29	29-37	20-28
Azlocilina	75	-	-	24-30
Mezlocilină	75	23-29	-	19-25
Piperacilina	100	24-30	-	25-33
Piperacilină/tazobactam	100/10	24-30	27-36	25-33
Cefazolină	30	23-29	29-35	-
Cefalotină	30	15-21	29-37	-
Cefaclor	30	23-27	27-31	-
Cefamandol	30	26-32	26-34	-
Cefuroxim	30	20-26	27-35	-
Cefoxitim	30	23-29	23-29	-
Cefotetan	30	28-34	17-23	-
Cefixim	5	23-27	-	-
Cefpodoxim	10	23-28	19-25	-
Ceftibuten	30	27-35	-	-
Cefoperazon	75	28-34	24-33	23-29
Cefotaxim	30	29-35	25-31	-
Ceftazidim	30	25-32	16-20	22-29
Ceftriaxon	30	29-35	22-28	17-23
Cefepim	30	29-35	23-29	24-30
Aztreonam	30	28-36	-	23-29
Imipinem	10	26-32	-	20-28
Meropenem	10	28-34	29-37	27-33
Acid nalidixic	30	22-28	-	-
Cinoxacină	100	26-32	-	-
Enoxacină	10	28-36	22-28	22-28
Norfloxacină	10	28-35	17-28	22-29
Ciprofloxacină	5	30-40	22-30	25-33
Ofloxacină	5	29-33	24-28	17-21
Lomefloxacină	10	27-33	23-29	22-28
Amicacină	30	19-26	20-26	18-26
Gentamicină	10	19-26	19-27	16-21
Netilmicină	30	22-30	22-31	17-23
Tobramicină	10	18-26	19-29	19-25
Canamicină	30	17-25	19-26	-
Eritromicină	15	-	22-30	-

Azitromicină	15	-	21-26	-
Claritromicină	15	-	26-32	-
Clindamicină	2	-	24-30	-
Cloramfenicol	30	21-27	19-26	-
Tetraciclină	30	18-25	24-30	-
Doxiciclină	30	18-24	23-29	-
Rifampină	5	8-10	26-34	-
Nitrofurantoină	300	20-25	18-22	-
Co-trimoxazol (1/19)	1.25/23.75	24-32	24-32	-
Vancomicină	30	-	17-21	-

scrieți pe rând în spațiile libere din tabelul de mai jos:

Antibiotic	Indicații	Contraindicații
Amoxicilină		
Amoxicilină + acid clavulanic		
Clindamicină		
Cloramfenicol		
Doxiciclină		
Rifampină		
Tetraciclină		
Vancomicină		

Determinarea beta-lactamazelor cu spectru larg (BLSL) la tulpinile de enterobacteriaceae prin metode fenotipice

Recomandările privind determinarea BLSL prin metode fenotipice se atribuie numai tulpinilor *Klebsiella* spp. și *E.coli*. Însă producerea de BLSL poate fi înregistrată, practic, la toate speciile din familia Enterobacteriaceae și la alte microorganisme gramnegative. Luând în considerare răspândirea enzimelor din această grupă, este binevenit să fie efectuat scринingul la toate tulpinile de Enterobacteriaceae izolate în laborator, cu ulterioara folosire a examinărilor speciale de confirmare la orice tulpină, care, conform datelor testării preventive, manifestă sensibilitate redusă măcar la un preparat din cefalosporinele de generația III (CMI > 2 mg/l, sau micșorarea echivalentă a diametrului zonei de reținere a creșterii (*tabelul*)).

Criteriile de determinare a tulpinilor *Klebsiella* spp. și *E.coli*, probabil producătoare de BLSL

Agent antimicrobian	Diametrul zonei de inhibiție, mm	CMI, mg/l
Cefpodoxim	≤ 17	≥ 8,0
Ceftazidim	≤ 22	≥ 2,0
Aztreonam	≤ 27	≥ 2,0
Cefotaxim	≤ 27	≥ 2,0
Ceftriaxon	≤ 25	≥ 2,0

Scринingul nu prevede efectuarea unui studiu special. El se bazează pe analiza datelor înregistrate din practica de rutină. În acelaș timp, pentru un scринing eficient, în examinările microbiologice de rutină, este necesar să se includă câteva antibiotice din cefalosporine, chiar dacă folosirea unora din ele în calitate de preparate terapeutice nu este planificată. La preparatele mai sensibile la hidroliza BLSL sunt clasate cefpodoxima și ceftazidima. Respectiv, aceste preparate trebuie incluse în setul pentru determinarea sensibilității

Enterobacteriaceae. În lipsa posibilităților de testare a cefpodoximei, setul minim de cefalosporine de generația III, folosite pentru determinarea sensibilității microorganismelor gramnegative, trebuie să includă cefotaxima, ceftriaxona și ceftazidima.

Cu cât mai multe cefalosporine sunt folosite pentru testare, cu atât mai veridice vor fi rezultatele determinării BLSL. Unele tulpini pot manifesta un grad înalt de rezistență la toate preparatele antibacteriene (PA), la altele se înregistrează o mărire neînsemnată a CMI la 1-2 PA din șirul cefalosporinelor.

După determinarea tulpinii suspecte la producerea de BLSL, se recomandă să fie efectuat un test de confirmare.

Testele ce confirmă producerea de BLSL. Toate testele fenotipice de confirmare a producerii de BLSL sunt variante ale metodelor standarde de determinare a sensibilității la PA și se bazează pe inhibiția BLSL cu clavulanat. La efectuarea acestor teste se compară sensibilitatea microorganismelor examinate la diferite cefalosporine de generația III și la combinarea acestor antibiotice cu acidul clavulonic.

Metoda difuzimetrică prevede folosirea discurilor standarde cu conținutul obișnuit de cefotaximă și ceftazidimă (30 μg) sau discurilor cu cefpodoximă (10 μg), la fel discurile ce conțin combinațiile: cefotaximă + clavulanat, ceftazidimă + clavulanat (30/10 μg) sau cefpodoximă + clavulanat (10/10 μg). Este binevenită folosirea concomitentă a discurilor cu cefotaximă și discurilor cu ceftazidimă și combinațiile lor cu clavulanatul.

Tehnica efectuării. Metoda de pregătire a suspensiei microbiene și însămânțare a plăcilor se efectuează conform standardelor. Pe suprafața plăcii se depun discurile cu cefalosporine și combinația lor cu acidul clavulonic. Plăcile se incubează la 35°C pentru 18-20 ore.

Interpretarea rezultatelor. Diferența diametrelor zonelor de reținere a creșterii pentru discurile cu cefpodoximă / acid clavulonic și cefpodoximă cu 6 mm și mai mult, pentru discurile cu cefotaximă / acid clavulonic și cefotaximă, ceftazidimă / acid clavulonic și ceftazidimă - cu 5 mm și mai mult ne denotă producerea BLSL de

către culturile testate. Rezultatul este pozitiv dacă diferențele indicate sunt înregistrate măcar pentru o pereche de discuri.

Controlul calității. Pentru a efectua controlul calității este necesar de a folosi 2 tulpini (martor pozitiv și martor negativ):

- martor negativ: testarea tulpinii martor de *E.coli* neproductoare de β -lactamaze. Diferența diametrelor zonelor discurilor cu inhibitor și fără el nu trebuie să depășească 2,0 mm;
- martor pozitiv: testarea tulpinii martor de *K. pneumoniae*, productoare de BLSL. Diferența diametrelor zonelor discurilor cu cefpodoximă / acid clavulonic și cefpodoximă ≥ 6 mm, cu cefotaximă / acid clavulonic și cefotaximă > 3 mm, cu ceftazidimă / acid clavulonic și ceftazidimă ≥ 5 mm.

Cu regret, nici una din metodele microbiologice tradiționale, bazate pe aprecierea fenotipică a microorganismelor, nu asigură determinarea BLSL în 100% din cazuri. Situația se complică considerabil în caz de prezență concomitentă a câtorva determinante de rezistență, fenomen constat destul de frecvent la microorganisme. Exemplu, la producerea BLSL și hiperproducerii β -lactamazei cromosomiale din clasa C, rezistența ultimelor la clavulanat maschează prezența BLSL.

Determinarea rezistenței stafilococilor la meticilină și alte antibiotice β -lactamice prin metoda de screening

Din momentul apariției, în anii 70, a stafilococilor meticileno-rezistenți și, în primul rând, a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* meticileno-rezistenți (MRSA) până în prezent, sunt unii dintre principalii agenți ai infecțiilor nosocomiale. Frecvența MRSA în structura infecțiilor stafilococice, în ultimii ani, a crescut brusc în toată lumea (exemplu, în SUA – de la 2% a.1975 până la 35% a.1996).

Rezistența stafilococilor la oxacilină (meticilină) poate fi condiționată de trei mecanisme de bază:

- hiperproducerea de proteină ce leagă penicilina (PLP)- PLP-2a (enzimă ce participă la sinteza peretelui celular), codată de gena cromosomală „mec A” – rezistență clasică la meticilină (oxacilină);
- hiperproducerea de β -lactamază;
- modificarea PLP.

Din punct de vedere clinic, este important de diferențiat tulpinile cu tipul de rezistență clasică („mec A” – condiționată) de tulpinile cu alte două tipuri de rezistență rar întâlnite, ce determină un nivel mic sau de limită a rezistenței. Aceasta se explică prin faptul că în infecțiile provocate de tulpini cu rezistență mec A – condiționată, terapia cu antibiotice β -lactamice (peniciline, cefalosporine, carbapeneme) va fi ineficientă. În afară de aceasta, aceste tulpini frecvent sunt rezistente practic la toate celelalte clase de antibiotice, cu excepția glicopeptidelor (vancomicina, tei-coplanina).

Estimarea sensibilității *Staphylococcus aureus* la PA β -lactamice trebuie să includă efectuarea a două teste de determinare a sensibilității:

- la benzilpenicilină sau determinarea sintezei β -lactamazelor (penicilazelor);
- la oxacilină sau determinarea PLP-2a, sau genei de codificare tes A.

Determinarea sensibilității la benzilpenicilină sau sintezei beta-lactamazelor (penicilinazelor)

Determinarea sensibilității *Staphylococcus aureus* la benzilpenicilină puțin este dificilă, deoarece sinteza β -lactamazei la acest microorganism este un proces inductibil (producerea enzimei se intensifică după contactul cu antibioticul). De aceea la folosirea metodelor standarde de determinare a sensibilității microorganismelor la antibiotice (diluțiilor succesive și difuzimetrică) este posibilă obținerea rezultatelor false.

Această problemă poate fi rezolvată prin folosirea metodei de determinare nemijlocită a β -lactamazei, bazată pe folosirea discurilor cu nitrocefina. Nitrocefina prezintă o cefalosporină cromogenă ce ușor se supune hidrolizei sub acțiunea tuturor β -lactamazelor cu formarea produsului colorat.

Tehnica efectuării. Pentru examinare se folosește placa pe care a fost determinată sensibilitatea tulpinii examinate de *Staphylococcus aureus* la benzilpenicilină și / sau oxacilină. De la hotarul zonei de reținere a creșterii, în jurul discului cu oxacilină, cu ajutorul ansei bacteriologice, se ia o cantitate mică de cultură și se aplică pe discul cu nitrocefina, preventiv umezit. Discul se incubează la temperatura camerei până la 1 oră.

Interpretarea rezultatelor. Apariția culorii roșii confirmă sinteza β -lactamazei de către tulpina microbiană examinată.

Tulpina, ce sintetizează β -lactamază, este considerată ca rezistentă la penicilinele naturale și semisintetice (cu excepția oxacilinei), indiferent de rezultatele concrete ale examinării la PA enumerate.

Determinarea sensibilității la oxacilină

La determinarea sensibilității la oxacilină, cu ajutorul metodelor standarde, trebuie să avem în considerare unele particularități:

- pentru pregătirea, inoculumului se aplică numai metoda directă de suspendare a coloniilor;

- timpul de incubare, până la momentul evidenței rezultatelor determinării sensibilității la oxacilină, trebuie să constituie nu mai puțin de 24 ore.

Este necesar de a folosi discuri ce conțin 1 μg de oxacilină; la evidența rezultatelor e necesar de atras atenția chiar și la coloniile unice, mici de stafilococi, determinate în limitele ariei de reținere a creșterii.

Scringul pe geloză, pentru evidențierea meticilinorezistenței, este o metodă înalt sensibilă și specifică, accesibilă în condiții rutine de muncă în laboratoarele microbiologice. Însă el poate fi folosit numai pentru tulpinile de *Staphylococcus aureus*.

Tehnica efectuării. Pentru efectuarea scringului se pregătesc, preventiv, plăci de geloză Mueller-Hinton, ce conțin 4% NaCl și 6,0 μg / ml oxacilină. Clorura de sodiu se adaugă în cantitate necesară până la autoclavare. Soluția de lucru de oxacilină se adaugă la mediu după autoclavare și răcire până la 45–50°C. Pentru prepararea soluției de oxacilină se folosește substanța PA cu activitate cunoscută.

Suspensia microbiană se pregătește numai după metoda suspendării directe din câteva colonii de acelaș tip, izolate, crescute pe placa de geloză nutritivă neselectivă, în soluție fiziologică sterilă și adusă la turbiditatea corespunzătoare etalonului 0,5 Mac Farland (1,5–108 UFC/ml).

Însămânțarea plăcilor: se imersează tamponul de vată în inoculum etalonat. Se scurge excesul de lichid prin rotire fermă a tamponului pe peretele tubului. Se descarcă tamponul în striuri paralele, pe o suprafață limitată (diametrul 10–15 mm) sau peste toată suprafața mediului cu oxacilină.

Incubarea: tulpinile de *Staphylococcus aureus* se incubează la temperatura 35°C pentru 24 ore complete, iar stafilococii coagulonegativi – pentru 48 ore.

Citirea rezultatelor. După termostatare, plăcile se examinează minuțios în fluxul de lumină și determinăm:

- prezența creșterii vizibile a mai mult de 1 colonie sau creștere sub formă de val, în locul aplicării culturii, denotă rezistența tulpinii date la oxacilină (meticilină);

- în lipsa creșterii pe locul aplicării culturii, tulpina examinată se socotește sensibilă la meticilină (oxacilină);

- în caz de rezultate nesigure, la fel și pentru tulpinile izolate de la bolnavii cu tratament clinic inefficient și bolnavii cu infecții serioase, este necesar de a determina CMI a oxacilinei și gena *tesA* prin metoda desfășurată.

Controlul calității. Examinările se efectuează prin controlul obligatoriu al culturilor testate pe geloză Mueller-Hinton cu 4% NaCl fără oxacilină (cultura se aplică la fel ca și pe geloză cu oxacilină).

Paralel cu tulpinile testate se examinează și tulpinile de control al stafilococilor meticilenorezistenți și meticilinosensibili. Tulpinile de control (pot fi oferite de către Institutul de chimioterapie antibacteriană): *S. aureus* ATCC 38591 – rezistent; *S. aureus* ATCC 29213 – sensibil.

Interpretarea rezultatelor. Tulpinile de stafilococ rezistente la oxacilină, trebuie privite ca rezistente la TOATE PA β -lactamice.

Rezultatele determinării sensibilității stafilococilor la oxacilină și alte PA β -lactamice pot fi contraversate. Cu toate acestea, rezultatele determinării sensibilității la oxacilină sunt decisive.

Determinarea sensibilității stafilococilor la PA β -lactamice, cu excepția benzilpenicilinei și oxacilinei, este nerațională.

Recomandări pentru clinicieni privind tratamentul pe baza rezultatelor examinărilor:

La izolarea tulpinilor de stafilococi penicilino- și meticilinosensibili, primele se socotesc sensibile la toate PA β -lactamice, iar preparatele de elecție vor fi penicilinele naturale și aminopenicilinele.

La determinarea sintezei β -lactamazei și sensibilității la oxacilină, microorganismul este rezistent la penicilinele naturale, însă este sensibil la oxacilină, penicilinele inhibitoroprotectoare și cefalosporine de generațiile I–III, ce sunt preparate de elecție în cazul

dat. În privința acestor tulpini, de asemenea, vor fi active cefalosporinele de generația IV și carbapenemele, însă făcând o comparație cu preparatele de elecție, ele nu prezintă avantaje.

La determinarea meticilinorezistenței, tulpina se socoate rezistentă la TOATE PA β -lactamice. În acest caz, pentru tratament se folosesc preparate din alte grupe, preparatele de elecție fiind glicopeptidele.

***S. aureus* rezistent la vancomicină**

Date despre existența *S. aureus* vancomicinorezistenți au apărut în a.1996, după prima publicație despre izolarea *S. aureus* meticilinorezistent cu sensibilitate scăzută la vancomicină (CMI 8 mg/l) din material clinic. Deși are importanță CMI la vancomicină, ce corespunde diapazonului de rezistență moderată, luând în considerare ineficacitatea clinică a vancomicinii, tulpina dată a fost înregistrată ca VRSA (*S. aureus* vancomicinorezistent). La această tulpină nu a fost găsit nici un mecanism de rezistență la vancomicină, din cele deja cunoscute; a fost determinată numai îngroșarea peretelui celular și mărirea concentrației proteinelor ce leagă penicilina 2 și 2a. Apoi, una după alta, au urmat informațiile despre izolarea, din materialul clinic, a tulpinilor de *S. aureus* cu CMI la vancomicină 8 mg/l. Aceste tulpini au fost numite VISA (*S. aureus* cu sensibilitate scăzută la vancomicină).

În rezultatul examinărilor mai aprofundate ale vancomicinorezistenței la MRSA, în urma scriningului a mai mult de 2000 tulpini din diverse staționare, au fost determinate de la 1% până la 25% (!) tulpini cu rezistență eterogenă (inductivă) la vancomicină. Astfel de tulpini pot fi predecesorii VRSA.

Până în prezent specialiștii nu pot determina ce termen să folosească (VRSA sau VISA). Faptul aceasta se explică prin aceea, că deși CMI corespunde diapazonului de rezistență moderată, ne lovim de ineficiență clinică în terapia infecțiilor provocate de VRSA și VISA. Cu alte cuvinte, în lipsa rezistenței din punct de vedere far-

macologic, aceste tulpini sunt rezistente la vancomicină din punct de vedere clinic și biologic.

Mulți specialiști propun metodele proprii de screening al vancomicinorezistenței la stafilococi, însă, până în prezent, nu sunt elaborate standarde generale. Astfel, foarte importantă este elaborarea metodelor diagnostice de laborator și monitoringului vancomicinorezistenței, îndeosebi la pacienții ce primesc sau au primit vancomicină/teicoplanină sau în caz de ineficacitate a terapiei cu aceste preparate. Este necesar de elaborat metode de control al infecțiilor VRSA, de a lua măsuri de izolare a bolnavilor și purtătorilor, pentru preîntâmpinarea răspândirii VRSA. În afară de aceasta, politica folosirii antibioticelor trebuie să prevadă micșorarea prescrierii neargumentate a vancomicinei.

În Moldova, până în prezent, nu a fost descrisă nici o tulpină de *S. aureus* cu sensibilitate diminuată la vancomicină. Probabil, aceasta se datorește folosirii reduse a vancomicinei în practica medicală.

Supravegherea epidemiologică a rezistenței la preparatele antibacteriene

Supravegherea epidemiologică a rezistenței microorganismelor prezintă un proces sistematic, permanent de colectare și analiză a datelor pentru aprecierea cantitativă a răspândirii antibioticorezistenței și dinamica ei temporară.

Scopul și sarcinile. Scopul supravegherii epidemiologice a rezistenței microbiene este obținerea informației necesare pentru elaborarea și aplicarea metodelor mai eficiente în tratamentul bolilor infecțioase, stoparea apariției și răspândirii rezistenței microbiene la nivel local, regional, național și internațional. Recomandațiile privind organizarea antibioticorezistenței sunt elaborate de OMS și Societatea medicilor microbiologi și infecționiști din Europa.

În supravegherea epidemiologică a antibioticorezistenței microorganismelor, trebuie acordată atenție asupra:

- maladiilor infecțioase, depistate frecvent, ce sunt însoțite de o letalitate înaltă, a formelor nosologice în care infectarea cu tulpini rezistente ale agentului patogen conduce la scăderea sigură a eficacității terapeutice;
- maladiilor infecțioase predispuse la răspândire epidemică, ce pot conduce la apariția erupțiilor epidemice (salmonelozele, șigelozele etc.);
- înregistrarea și analiza datelor morbidității și mortalității infecțioase provocate de tulpini rezistente.

Datele minime recomandabile pentru efectuarea supravegherii epidemiologice a antibioticorezistenței trebuie să includă:

- codul unic de identificare a pacientului (inițialele, numărul fișei individuale, poliței de asigurare etc.);
- data de naștere a pacientului;
- genul pacientului;
- locul de trai;

- tipul instituției medicale;
- denumirea secției, clinicii etc.;
- specificul instituției (terapeutic, chirurgical etc.);
- data spitalizării pacientului;
- simptomele de bază sau particularitățile tabloului clinic;
- maladia infecțioasă depistată la pacient;
- data apariției simptomelor infecției sau stabilirea diagnosticului;
- caracterul infecției (extraspitalicească sau nosocomială);
- tipul prelevatului;
- data și timpul colectării prelevatului;
- date despre antibioticoterapia precedentă;
- date despre terapia antimicrobiană recentă;
- date despre vindecarea maladii.

În practică, prin supraveghere epidemiologică a antibioticorezistenței, se subînțelege folosirea datelor microbiologice obținute rutina, folosirea datelor suplimentare despre pacient, ce pot fi culese din prelucrarea ulterioară, analiza și interpretarea rezultatelor analizelor.

Pentru analiza volumului mare de informație, acumulată în timpul monitoringului epidemiologic al antibioticorezistenței, se recomandă de folosit programe speciale computerizate (ex. WHONET ș.a.), care permit a forma în laboratoarele microbiologice o bază de date ce conține informația necesară, de a analiza și oferi rezultatele monitoringului epidemiologic. Un avantaj suplimentar al majorității programelor este montarea sistemii experte, ce semnalizează apariția unor fenotipuri neobișnuite de rezistență.

Pe lângă informația specificată mai sus, pentru efectuarea analizei și calcularea indicilor epidemiologici corespunzători, pot fi necesare următoarele date statistice medicale:

- pentru instituțiile curative de staționar:
 - numărul de paturi – în total și în diferite secții ale staționarului;
 - numărul cazurilor spitalizate;

- cifra medie a zilelor pat – în total și în diferite secții ale staționarului;

- numărul examinărilor microbiologice – în total și în diferite secții ale staționarului.

– pentru instituțiile de ambulator și policlinici:

- numărul de medici ce expediază prelevate pentru examinări microbiologice;

- numărul populației deservite;

- cifra medie de solicitări;

- numărul examinărilor microbiologice.

Datele statistice enumerate pot fi folosite:

- în calitate de control al rezultatelor monitoringului epidemiologic (numărul așteptat de tulpini microbiene de o specie anumită izolate într-o perioadă anumită);

- pentru stratificarea rezultatelor (indicii comparabili a frecvenței meticilinorezistenței în diferite staționare, în funcție de numărul de paturi sau cazurilor spitalizate);

- în calitate de numitor la calcularea indicilor statistici (ex., frecvența pneumonici extraspitalicești provocată de tulpini *S. Pneumoniae* penicilinorezistente la 100 cazuri spitalizate, frecvența meticilinorezistenței la 1000 zile-pat);

- pentru extrapolarea rezultatelor, folosindu-se datele statistice regionale sau naționale (numărul general al populației, numărul după grupele de vârstă etc.).

În scopul obținerii datelor veridice despre antibioticorezistență în analiză se include numai prima tulpină microbiană de aceeași specie, izolată de la bolnavul din focarul de infecție concret. Toate microorganismele identice primei tulpini, izolate în următoarele investigații microbiologice ale prelevatelor obținute din focarul de infecție, trebuie excluse din analiză.

Pentru determinarea identității tulpinilor cu scop de evidențiere a izolatelor repetate se folosesc câteva criterii.

Temporar – în examinare se include numai prima tulpină izolată a speciei date, indiferent dacă a fost sau nu determinată de

dezvoltarea rezistenței la microorganismul dat, la un oarecare PA, în timpul tratamentului.

Fenotipul sensibilității – în acest caz, în analiză poate fi inclus izolatul repetat al speciei date de microorganisme, cu condiția diferențelor majore în antibioticosensibilitate ($R \rightarrow S$ sau $S \rightarrow R$) la un oarecare PA, în comparație cu primul izolat. Deosebirile minime în antibioticosensibilitate ($R \rightarrow I$, $I \rightarrow R$, $I \rightarrow S$ sau $S \rightarrow I$) probabil se datorește manifestărilor variabilității fenotipice a exprimării unui mecanism anumit de rezistență sau rezultatului unor probleme metodice la determinarea sensibilității – nu pot servi ca bază pentru includerea izolatului repetat în analiză.

În afară de acestea, sunt propuse și alte criterii pentru determinarea izolatelor repetate, însă ele nu depășesc după exactitate, veridicitate și simplitatea folosirii la cele enumerate mai sus și nu sunt ptevăzute în recomandările MS, ESCARS și NCCLS.

Date despre antibioticorezistența unui microorganism concret sau a unui grup de microorganisme la un PA concret pot fi prezentate în felul următor:

1. Divizarea populațiilor de microorganisme după criteriile de sensibilitate, conform indicelui de frecvență (după CMI sau după diametrul ariei de reținere a creșterii), prezentate în variantă de tabel sau grafic (sub formă de histogramă). Acest tip de prezentare a datelor este cel mai precis și reprezentativ. Pe baza datelor despre gradul de sensibilitate (divizarea valorilor CMI) se pot fi calculați indicii cumulativi de sensibilitate a tulpinilor la PA concret: CMI50, CMI90 și diapazonul valorilor CMI.

- CMI50 – CMI ce inhibă 50% tulpini din populația de microorganisme examinată;
- CMI90 – CMI ce inhibă 90% tulpini din populația de microorganisme examinată.

2. Frecvența depistării tulpinilor rezistente (R), tulpinilor cu sensibilitate intermediară (I) și tulpinilor sensibile (S) în populația de microorganisme examinată. Astfel de date calitative sunt mai puțin veridice decât indicatorii cantitativi de repartizare particulară a

tulpinilor după gradul de sensibilitate și nu permit de a determina tendința precoce în apariția și răspândirea antibioticorezistenței.

3. Frecvența depistării microorganismelor rezistente la anumite PA sau anumite mecanisme de rezistență la unele forme nosologice anumite, în funcție de vârsta pacienților, sex, în anumite populații de pacienți, în anumit interval de timp etc.

Rezultatele supravegherii epidemiologice a antibioticorezistenței pot fi prezentate sub formă de indicatori cu diferit nivel de complexitate:

Simplu. Frecvența (%) rezistenței la un PA concret la microorganismul genului dat, exemplu, frecvența izolării MRSA printre toate tulpinile examinate de *S. aureus*.

Mediu. Frecvența (%) rezistenței la un anumit PA la microorganismul genului dat, izolat dintr-un prelevat anumit, exemplu, frecvența izolării tulpinilor de *E.coli* ciprofloxacinarezistente, izolate din urină.

Compuse. Frecvența (%) rezistenței în infecțiile de un tip anumit, exemplu, frecvența izolării tulpinilor de *E.coli* în infecțiile extraspitalicești ale tractului urinar.

Foarte compuse. Frecvența infecțiilor de un anumit tip, provocate de un anumit microorganism rezistent în subdiviziunea indicată, de exemplu, frecvența cazurilor de bacteriemie provocate de MRSA și dezvoltate în secția de terapie intensivă la 1000 zile de aflare în staționar.

După posibilități, indicii frecvenței rezistenței trebuie să fie prezentați sub forma numărului de cazuri într-o anumită populație, într-un anumit interval de timp.

Recomandări practice pentru efectuarea analizei datelor și interpretarea rezultatelor. Dacă numărul tulpinilor de o singură specie este mai mic de 10, atunci datele sumare ale sensibilității lor nu se recomandă să fie prezentate. La interpretarea unor astfel de rezultate, pentru elaborarea ulterioară a standardelor terapiei empirice, există câteva soluții:

- concentrarea câtorva specii ale unui gen (prezentarea datelor despre microorganismele genului în întregime *Shigella* – *Shigella spp.*);

- concentrarea datelor despre sensibilitate pe câțiva ani precedenți;

- analiza datelor despre sensibilitate a câtorva instituții ce se află într-o regiune;

- folosirea datelor publicate anterior.

Scopul primordial al supravegherii epidemiologice este prezentarea informației organelor respective ale Ministerului Sănătății și Protecției Sociale pentru elaborarea măsurilor de control și reținerea dezvoltării și răspândirii antibioticorezistenței, optimizarea terapiei antibacteriene a infecțiilor cu localizare anumită la diferite categorii de pacienți. În funcție de nivelul de organizare a supravegherii epidemiologice a antibioticorezistenței, rezultatele pot fi prezentate pentru informație internă clinicienilor și administrației instituției curative concrete, sub formă de informație pentru instituțiile Ministerului Sănătății (la nivel raional, orașencesc etc.), publicarea datelor despre antibioticorezistență (nivel național), la fel pentru integrarea lor în sistemul european sau internațional de date despre rezistența antimicrobiană. Îndeosebi, prezentarea acestor date pentru acces liber în rețeaua Internet, ce permite completarea oportună și corectarea informației prezentate la comunicarea datelor noi.

Bibliografie

1. Решедько Г.К. Определение чувствительности к антибиотикам: методы, результаты, оценка //Клиническая антимикробная химиотерапия., том 1, 1999, №3, с.113–116.
2. Сидоренко С.Е., Колупаев В.Е. Антибиотикограмма: диско-диффузионный метод. Интерпретация результатов. Sanofi Pasteur, 1999, 32 с.
3. Стецок О.У. Зависимость фармакодинамических параметров антибиотиков от условий определения чувствительности бактериальных возбудителей внебольничных и госпитальных инфекций: Автореф. дис. ... кан. мед. наук. Смоленск, 2000, 22 с.
4. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. МР для микробиологов //Клин. микробиол. антимикроб химиотер. том 2, 2000, №2, с. 93–109.
5. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*. МР для микробиологов //Клин. микробиол. антимикроб химиотер., том 2, 2000, №1, с. 88–98.