

**PREPORUKE ZA ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI
BAKTERIJA NA ANTIMIKROBNE LEKOVE
PREMA CLSI 2009**

Novi Sad, 2009

IZRADA ANTIBIOGRAMA

1. Reagensi za disk-difuzioni test

1. Podloga - preporu uje se upotreba Mueller Hinton (MH) agara, za neprobirljive aerobne i fakultatino anaerobne patogene.

1.1. Priprema MH agara:

1.1.1. MH agar se priprema od komercijalne dehidrirane podloge prema uputstvu proizvo a a;

1.1.2. Nakon autoklaviranja, ostaviti da se ohladi na 45-50°C u vodenom kupatilu;

1.1.3. Sipati sveže pripremljenu i ohla enu podlogu u staklene ili plasti ne petri plo e ravnog dna na nivelisanoj horizontalnoj površini da bi se dobila ravnomerna debljina podloge od oko 4 mm (za Petri plo e 150 mm – 60 do 70 ml podloge, a za petri plo e 100 mm –25 do 30 ml podloge);

1.1.4. Agar ostaviti na sobnoj temperaturi da se ohladi i ukoliko se plo e ne koriste istog dana , lagerovati ih u frižider na t 2-8°C;

1.1.5. Plo e treba iskoristiti u roku od 7 dana nakon pripreme;

1.1.6. Reprezentativni uzorak iz svake serije treba testirati na sterilnost inkubiranjem na 30-35°C/24 sata ili duže.

1.2. pH podloge

Poželjan je pH 7.2 – 7.4 na sobnoj temperaturi nakon o vrsnu a podloge. Nizak pH dovodi do toga da neki AML gube na dejstvu (aminoglikozidi, kinoloni i makrolidi), dok drugi imaju poja ano dejstvo(tetraciklini). Ako je pH visok, mogu se o ekivati suprotni efekti.

1.3. Vlažnost podloge

Površina treba da je vlažna, ali ne smeju biti prisutne kapljice na površini podloge ili na poklopcu petri plo e kada se plo e zasejavaju. Ukoliko je prisutna preterana vlažnost, podloge pre upotrebe staviti u termostat na 35° u toku 10 do 30 minuta.

1.4. Efekti timidina ili timina

Treba koristiti MH agar sa najmanjom koli inom timidina. Podloge koje sadrže velike koli ine timidina ili timina mogu smanjiti inihibitorni efekat sulfonamida i trimetoprima daju i manje zone inihibicije odnosno lažno rezistentne rezultate. Ako se pojave problemi sa kontrolom kvaliteta sulfonamida i trimetoprima, proveriti MH agar. Za evaluaciju nove serije MH agara koristiti ATCC sojeve *Enterococcus faecalis* 29212 ili 33186 sa SxT diskovima. Podloge koje su zadovoljavaju e da e jasnu zonu inihibicije od 20 mm.

1.5. Efekti varijacije dvovalentnih katjona

Varijacije u sadržaju Mg i Ca katjonima e uticati na rezultate testiranja aminoglikozida i tetraciklina kod sojeva *Pseudomonas aeruginosa*. Previsok sadržaj katjona e smanjiti veli ine zona, a prenizak e dati neprihvatljivo velike zone inihibicije. Testiranje performansi MH agara mora potvrditi kontrolne granice navedene u tabeli za kontrolu kvaliteta.

2. Antibiotiski diskovi

Koriste se komercijalno pripremljeni papirni diskovi sa odgovaraju om koncentracijom AML-a.

2.1. uvanje diskova

2.1.1 Pakovanja uvati na 8°C ili nižoj ili u frizu na -14°C ili niže. Neotvorena pakovanja diskova koji sadrže antibiotike iz klase beta laktama treba da se uvaju smrznuta, sem male radne koli ine, koja može da se uva u frižideru najviše nedelju dana. Neki labilni antibiotici (npr. imipenem, cefahlor i kombinacije sa klavulanskom kiselinom) mogu zadržati ve u stabilnost ako se uvaju smrznuti do dana upotrebe.

2.1.2. Neotvorene posude sa diskovima izvaditi iz frižidera ili zamrziva a 1-2 sata pre upotrebe i ostaviti na sobnoj temperaturi. Ovim se svodi na minimum kondenzacija koja se javlja pri kontaktu toplog vazduha i hladnih diskova.

2.1.3. Izva eni diskovi iz zatvorenog pakovanja se uvaju u vrsto zatvorenim posudama, da se onemogu i ulaz vlage.

2.1.4. Aparat za plasiranje diskova (dispenser) uvati u frižideru kada nije u upotrebi

2.1.5. Koristiti samo diskove u roku trajanja nazna enom na proizvo a koj etiketi. Diskove isteklog roka baciti na dan isteka roka upotrebe.

3. Mc Farland standard za pripremu inokuluma

Za standardizaciju gustine inokuluma koristiti komercijalne McFarland standarde od 0.5. U nedostatku komercijalnog standarda, koristiti njegov opti ki ekvivalent.

3.1. Priprema nekomercijalnog standarda

3.1.1. Alikvot od 0.5 ml 0.048 mol/l BaCl₂ (1.175 % w/v BaCl₂ · 2 H₂O) se dodaje u 99,5 ml 0.18 mol/l H₂SO₄ (1 % w/v) uz stalno mešanje da se napravi rastvor.

3.1.2. Ta na gustina standarda se proveriti spektrofotometrom da se utvrdi absorbanca. Absorbanca na 625 nm, sa svetlosnim putem od 1 cm i odgovaraju om kivetom, treba da je od 0.08 do 0.10 za Mc Farland standard.

3.1.3. Rastvor barijum sulfata razdeliti u epruvete sa zavrtnjem veli ine iste kao one koje se koriste za kultivaciju ili razre ivanje bakterijskog inokuluma, u koli ini od 4-6 ml.

3.1.4. Epruvete vrsto zatvoriti i uvati u mraku, na sobnoj temperaturi.

3.1.5. Pre svake upotrebe standard promu kati na vorteksu i proveriti da li je zamu enje ravnomerno. Ako se pojave ve e estice, standard zameniti

3.1.6. Barijum sulfatne standarde menjati ili proveravati njihove opti ke gustine jednom mese no.

2. Izvođenje disk difuzionog testa

1. Priprema inokuluma

Postoje dve metode za pripremu inokuluma: metod porasta i metod direktne suspenzije kolonija

1.1. Metod porasta

1.1.1. Izabrati 3-5 pojedinačnih kolonija iste morfologije. Vrh svake dote i ezom i prebaci u epruvetu koja sadrži 4-5 ml odgovarajućeg tečnog podloge (npr. triptikaza soja bujon).

1.1.2. Bujonsku kulturu inkubirati na 35°C dok se ne dostigne turbiditet od 0.5 McFarlanda (obično 2-6 sati)

1.1.3. Turbiditet nakon toga podesiti sterilnim FR do turbiditeta koji vizuelno odgovara 0.5 McFarland standardu, što odgovara suspenziji koja sadrži $1-2 \times 10^8$ CFU/ml za E.coli ATCC 25922. Adekvatno svetlo je potrebno za vizuelno poređenje epruveta sa inokulumom i 0,5 McFarland standardom prema kartonu sa belom pozadinom i crnim linijama.

1.2. Metoda direktne suspenzije kolonija

1.2.1. Odabrati nekoliko izolovanih kolonija, poraslih nakon 18-24h inkubacije, najbolje sa neselektivne podloge (kao što je krvni agar), napraviti suspenziju u fiziološkom rastvoru ili bujonu, da odgovara turbiditetu od 0.5 McFarlandu.

1.2.2. Ovaj metod je preporučen za zahtevne organizme, kao npr. Haemophilus spp., Neisseria spp. i streptokoke, kao i za testiranje osetljivosti stafilokoka na oksacilin.

2. Inokulacija test ploče

2.1. U roku od 15 minuta nakon podešavanja inokuluma uroniti sterilan pamučni bris u epruvetu sa suspenzijom, rotirati ga nekoliko puta i prevesti je iz epruvete pritisnuti ga vrsto uz unutrašnji zid da se otkloni višak inokuluma sa brisa.

2.2. Brisom preko i preko prosušene cele površine MH agara, ponavljaju i ovu proceduru još 2 puta, rotiraju i ploču u svaki put za 60°, da bi se inokulum ravnomerno naneo. Na kraju, pre i brisom preko ivica ploče.

2.3. Ostaviti poklopac ploče 2 do 3 minuta, ali ne duže od 15 minuta, da se upije višak vlage.

Napomena: izbegavati preguste inokulume; nikada ne koristiti nerazređene prekone ne bujonske culture ili druge nestandardizovane inokulume za nanošenje na ploču.

3. Postavljanje diskova na zasejane agar ploče

3.1. Diskove pravilno rasporediti po površini agara, tako da rastojanje ne bude manje od 24 mm od centra do centra diska. To znači ne više od 12 diskova na Petri ploču od 150 mm, odnosno ne više od 5 diskova na Petri ploču dijametra 100 mm. Svaki disk po postavljanju lagano pritisnuti da bi se obezbedio potpuni kontakt sa površinom agara. Obzirom da antibiotik difunduje skoro trenutno, ne treba ga premeštati nakon dodira sa površinom agara, već staviti novi disk na drugo mesto na agaru.

3.2. Ploču prevrnuti i staviti u termostat na 35°C u roku od 15 minuta nakon postavljanja diskova.

Ne koristiti inkubator sa pojaanom koncentracijom CO₂ (osim za *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* i streptokoke) jer CO₂ može uticati na veličinu zone inhibicije za neke antibiotike.

4. Očitavanje i interpretacija rezultata

4.1. Svaku ploču pregledati nakon 16-18 sati inkubacije. Ako je ploča zadovoljavajuće zasejana i razređena inokuluma korektno, zone inhibicije će biti ujednaeno kružnog oblika i rast će biti u vidu konfluentnog tepiha. Ako su prisutne pojedinačne kolonije, inokulum je previše razređen i test se mora ponoviti. Mere se preporučuju u zoni potpune inhibicije rasra, koji se mogu proceniti golim okom.

4.2. Zone se mere do najbližeg celog milimetra, koristeći klize i merač kao lenjir, koji se prilažnja na pozadinu prevrnute ploče. Ploču držati iznad crne pozadine i osvetliti je reflektovanim svetlom. Ako je u pitanju krvni agar, zone se mere sa gornje površine agara osvetljenog reflektovanim svetlošću, sa skinutim poklopcem. Kada se testira stafilokok na oksacilin ili enterokok na vankomicin, inkubacija treba da je 24 sata, da bi osetljivost bila dokazana. Propuštena svetlost (ploča se drži prema svetlu) se koristi kod ispitivanja zona oko oksacilina i vankomicina u cilju otkrivanja slabog rasta oksacilin ili vankomicin-rezistentnih kolonija unutar zona inhibicije. Bilo kakav primetan porast unutar zona inhibicije ukazuje na rezistenciju na oksacilin ili vankomicin.

4.3. Ivica zone definiše područje u kome nema očitljivog, vidljivog porasta koje se može zapaziti golim okom. Slab porast sitnih kolonija, koji se može uočiti samo u lupe na ivici zone inhibiranog rasta se ignoriše. Ipak, kada pojedinačne kolonije rastu unutar jasne zone inhibicije, test treba ponoviti sa istom kulturom ili subkulturom dobijenom od pojedinačne kolonije sa primarne ploče (da li je kontaminacija drugim organizmom ili su u pitanju rezistentni organizmi). Ako se utvrdi da je u pitanju isti soj, izmeriti unutrašnju zonu koja je bez kolonija. Sojevi *Proteus* spp. mogu rojiti u vidu tankog vela oko određenih antibiotika i to treba ignorisati. Na krvnom agaru meriti zonu inhibicije rasta, a ne zonu hemolize. U slučaju SxT, antagonisti u podlozi mogu omogućiti slab porast, koji se ne uzima u obzir, već se mere samo očitljive ivice prilikom određivanja prečnika zona.

4.4. Veličina zona inhibicije se interpretira prema uputstvu proizvođača diskova, odnosno prema uputstvu datom u ovom priručniku.

3. Kategorije osetljivosti

3.1. Osetljiv: infekcija uzrokovana ovim sojem može biti adekvatno lečena dozom AML-a koja se preporučuje za taj tip infekcije i infektivnu vrstu, ukoliko to nije na drugi način kontraindikovano.

3.2. Intermedijaran: ova kategorija uključuje izolate sa MIC-ovima antibiotika koji su približni uobičajenim koncentracijama u krvi i tkivima i za koje nivoi odgovora mogu biti niži nego za osetljive izolate. Kategorija intermedijarnog ukazuje na kliničku efikasnost u delovima tela gde se lekovi fiziološki koncentrišu (npr. kinoloni i laktami u urinu) ili kada se mogu koristiti više doze lekova od uobičajenih (npr. laktami). Ova kategorija takođe uključuje pufer zonu, što bi trebalo da spreči i da zbog malih nekontrolisanih tehničkih faktora dođe do velikih odstupanja u interpretaciji, naročito za lekove sa uskim granicama farmakotoksičnosti.

3.3. Rezistentan: rezistentni sojevi nisu inhibirani uobičajenim nivoima dostignutih sistemskih koncentracija leka kada se primenjuju normalno propisane doze; i / ili mogu imati prenikajuću zonu koja pada u domen gde je verovatno postojanje specifičnih mehanizama mikrobne rezistencije (npr. laktamaze) i gde klinička efikasnost nije pouzdana u lečenju.

PREPORUKE ZA IZBOR ANTIMIKROBNIH LEKOVA ZA TESTIRANJE I NA IN IZVEŠTAVANJA DOBIJENIH REZULTATA

Antimikrobni lekovi za testiranje bakterija dati su u tabelema koje se odnose na pojedine bakterijske vrste. Antimikrobni lekovi svrstani su u grupe A, B, C i U.

Grupa A: Označava lekove koji se primarno (rutinski) testiraju i izveštavaju.

Grupa B: Označava AML koji su klinički značajni, naročito za intrahospitalne infekcije i primarno se ispituju, ali se izveštavaju selektivno i to u slučajevima kada postoji:

- rezistencija sojeva na antibiotike iste klase iz grupe A;
- indikacija za primenu antibiotika kod određenih uzoraka (npr. cefalosporini III generacije za enterobakterije izolovane iz likvora ili SxT za izolate iz urina);
- polimikrobna infekcija ili infekcija koja se javlja istovremeno na više mesta;
- alergija, nepodnošljivost ili izostanak terapijskog odgovora na antibiotik iz grupe A;
- za potrebe kontrole intrahospitalnih infekcija kao epidemiološki marker;

Grupa C: Označava alternativne ili dodatne antibiotike koje treba testirati u ustanovama koje imaju endemske ili epidemijske sojeve rezistentne na više antibiotika iz prethodnih grupa (posebno ako su iz iste grupe npr. beta laktami ili aminoglikozidi); kod pacijenata alergičnih na primarne antibiotike; u terapiji nekih infekcija (npr. chloramfenikol za ekstraintestinalne izolate salmonela ili vankomicin rezistentne izolate enterokoka); za potrebe kontrole intrahospitalnih infekcija, kao epidemiološki marker.

Grupa U: Označava antibiotike koji se koriste jedino ili primarno u lečenju infekcija urinarnog trakta i ne treba ih rutinski izveštavati za izolate sa drugih mesta infekcije

Napomena: Oznaka “ili” izmeđ u pojedinih agenasa označava lekove kod kojih je unakrsna rezistencija i unakrsna osetljivost skoro potpuna. Rezultati za jedan agens mogu se koristiti da se predvide rezultati za drugi agens, koji je sa njim povezan sa “ili”. Na primer, izolat neke enterobakterije koja ne produkuje ESBL, osetljiv na cefotaksim, može se smatrati osetljivim i na ceftriakson. Kada izmeđ u lekova u jednoj kućici tabele nema “ili”, testiranje jednog ne može se koristiti da se predvidi rezultat za druge.

ENTEROBACTERIACEAE

Uslovi testiranja:

Podloga: Mueller Hinton agar (MH agar)

Inokulum: Direktna suspenzija kolonija gustine 0.5 McFarland

Inkubacija: Aerobna, 35±2°C, 16-18 sati

Kontrola kvaliteta: (minimalni zahtevi)

E. coli ATCC 25922

E. coli ATCC 35218

Preporuke za antibiogram

Grupa A	Grupa B	Grupa C	Grupa U
Ampicilin ^{a,d}	Amikacin	Aztreonam ^e Ceftazidim ^e	Ofloksacin Norfloksacin
Cefalotin ^b Cefazolin ^b	Amoksisilin-klavulan.kis Ampicilin-sulbaktam Piperacilin-tazobaktam	Hloramfenikol ^{d,g}	Nitrofurantoin
Gentamicin	Cefuroksim	Tetraciklin ^c	
	Cefepim		
	Cefoksitin		
	Ceftriakson ^{d,e,f} ili Cefotaksim		
	Ciprofloksacin ^d		
	Ertapenem Imipenem Meropenem		
	Trimetoprim-sulfametoksazol ^d		

KOMENTARI

- Ampicilin reprezentuje i osjetljivost na amoksisilin
- Cefalotin reprezentuje osjetljivost na cefaleksin, cefahlor i cefadroksil. Cefazolin, cefpodoksim, cefuroksim mogu da se testiraju i pojedina no, jer neki izolati mogu biti osjetljivi na ove antibiotike kada su rezistentni na cefalotin.
- Mikroorganizmi koji su osjetljivi na tetraciklin smatraju se osjetljivim i na doksiciklin. Me utim, neki sojevi koji su intermedijerni ili rezistentni na tetraciklin mogu biti osjetljivi na doksiciklin.

- d) Izolate Salmonella i Shigela spp iz fecesa rutinski testirati i izveštavati za ampicilin, fluorokinolone i trimetoprim-sulfametoksazol. Hloramfenikol i cefalosporine tre e generacije testirati i izveštavati za ekstraintestinalne izolate ovih mikroorganizama.
- e) Rezultati ispitivanja osetljivosti enterobakterija (naro ito Klebsiella spp, E. coli i Proteus mirabilis*) na antibiotike disk difuzionim testom, mogu ukazati na sposobnost ispitivanog soja da produkuje beta laktamaze proširenog spektra (ESBL), ako su zone inhibicije za cefalosporine tre e generacije i aztreonam manje od uobi ajenih zona inhibicije za osetljive sojeve. Prema CLSI to zna i da treba posumnjati na produkciju ESBL kod ispitivanog soja ako su zone inhibicije za **ceftazidim*** (30µg) **22mm**, **ceftriakson** (30µg) **25mm**, **cefotaksim*** (30µg) i **aztreonam** (30µg) **27mm**. Za ove sojeve treba uraditi potvrdni test za dokazivanje ESBL. Za sojeve koji produkuju ESBL izvestiti da su rezistentni na sve peniciline, cefalosporine i aztreonam.

Potvrdni test (prema CLSI)

Podloga, veli ina inokuluma i uslovi inkubacije su isti kao kod disk difuzionog testa.

Postavljanje diskova: stavljaju se diskovi ceftazidima i cefotaksima, kao i diskovi ceftazidima i cefotaksima sa dodatkom klavulanske kiseline.

Rezultat testa: pove anje zone inhibicije za 5 mm oko diskova sa cefalosporinima i klavulanskom kiselinom u odnosu na zonu inhibicije oko diskova sa cefalosporinima, dokazuje produkciju ESBL.

Komentar: sojevi koji produkuju ESBL se smatraju rezistentnim na sve peniciline, cefalosporine i monobaktame bez obzira na rezultat testa *in vitro!*

Kontrola kvaliteta: E. coli ATCC 25922: zona inhibicije oko diskova bez klavulanske kiseline je 2 mm u odnosu na zonu inhibicije oko diskova sa klavulanskom kis.

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603: pove anje zone inhibicije za 5 i više mm za ceftriakson i 3 i više mm za cefotaksim.

Enterobacter spp, Citrobacter sppi Serratia spp mogu razviti rezistenciju na cefalosporine tre e generacije u roku 3 do 4 dana od po etka terapije, te se savetuje testiranje ponovljenih izolata.

- f) Cefotaksim i ceftriakson testirati i izveštavati za izolate iz likvora umesto cefalotina i cefazolina.
- g) Nije za rutinsko izveštavaje za izolate iz urina.

Osetljivost enterobakterija na karbapeneme

Enterobakterije koje su rezistentne na 1 ili više cefalosporina III generacije (cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim) ili imaju povišene MIC ili smanjene zone inhibicije za karbapeneme, mogu proizvoditi karbapenemaze, iako su zone inhibicije u disk-difuzionom testu u granicama koje odgovaraju osetljivim izolatima. U tom slučaju primeniti skrining i potvrdni test za dokazivanje produkcije karbapenemaza (modifikovani Hodge test).

Za Enterobacteriaceae (osim za *Proteus*, *Providencia* i *Morganella* ija smanjena osetljivost može biti posledica prisustva drugih mehanizama rezistencije) koriste se:

Skrining test - disk difuzioni test: meropenem 16- 21mm, ertapenem 19- 21mm- zone koje ukazuju na produkciju karbapenemaza, bez obzira što su u granicama za osetljive izolate. Imipenem disk je slabiji pokazatelj produkcije karbapenemaza .

Potvrdni test - modifikovani Hodge-ov test:

1. Pripremiti standardnu suspenziju od 0.5 McFarlanda *E. coli* ATCC 25922 u fiziološkom rastvoru i razrediti 1: 10. Inokulisati MH agar kao za disk-difuzioni test i ostaviti da se suši 3-10 minuta. Postaviti odgovaraju i broj ertapenem ili meropenem diskova na podlogu.
2. Koriste i ezu ili bris, uzeti 3 do 5 kolonija mikroorganizma koji se testira ili kontrolnog soja (*K. pneumoniae* ATCC BAA 1705- pozitivna kontrola za modifikovani Hodge test, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706- negativna kontrola) uzgajenih preko no i na krvnom agaru. Inokulisati ove bakterije u pravoj liniji od ivice diska u dužini od 20 do 25mm.
Kapacitet male Petri šolje: 1 disk, 1kontrolni soj, 1 test izolat
Kapacitet velike Petri šolje: 1-4 diska, 2 kontrolna soja, 1-6 test izolata
3. Inkubacija: $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 16- 20 h
4. Pozitivan rezultat = soj proizvodi karbapenemazu: pojava rasta *E. coli* oko linije kontrolnog soja ili test organizma
Negativan rezultat = soj ne proizvodi karbapenemazu: nema pojava rasta oko linije test organizma ili kontrolnog soja
5. **Za sojeve pozitivne u skrining testu sa diskovima meropenema ili ertapenema i pozitivne u modifikovanom Hodge testu uraditi MIC pre izveštavanja o osetljivosti na karbapeneme.**
6. Izveštavanje: Za izolate koji su pozitivni u modifikovanom Hodge testu, ali su osetljivi na karbapeneme (ertapenem MIC $2\mu\text{g/mL}$; imipenem MIC $4\mu\text{g/mL}$ ili meropenem MIC $4\mu\text{g/mL}$) izvestiti MIC za karbapeneme bez interpretacije, sa sledećim komentarom: "Ovaj soj proizvodi karbapenemaze. Klinička efikasnost karbapenema nije utvrđena za lečenje infekcija izazvanih enterobakterijama koje pokazuju osetljivost na karbapeneme (na prim. ertapenem MIC $2\mu\text{g/mL}$; imipenem MIC $4\mu\text{g/mL}$ ili meropenem MIC $4\mu\text{g/mL}$) ali pokazuju produkciju karbapenemaza in vitro." Ukoliko je modifikovani Hodge test negativan, interpretirati MIC-ove za karbapeneme prema važećim CLSI interpretativnim kriterijumima.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Uslovi testiranja:

Podloga: Mueller Hinton agar (MH agar)

Inokulum: Direktna suspenzija kolonija gustine 0.5 McFarland

Inkubacija: Aerobna, 35±2°C, 16-18 sati

Kontrola kvaliteta: (minimalni zahtevi)

E. coli ATCC 25922

E. coli ATCC 35218

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Preporuke za antibiogram

Grupa A	Grupa B	Grupa U
Ceftazidim	Amikacin	Ofloksacin Norfloksacin
Gentamicin	Cefepim	
Piperacilin	Ciprofloksacin	
	Imipenem Meropenem	
	Piperacilin-tazobaktam	

KOMENTARI

1. Osetljivost izolata *P. aeruginosa* kod pacijenata sa cisti nom fibrozom može se odrediti disk difuzionom metodom uz inkubaciju plo a od 24 sata
2. *P. aeruginosa* može postati rezistentan na sve antibiotike tokom produžene terapije. Rezistencija se može razviti u roku 3 do 4 dana od po etka terapije, tako da je opravdano ispitivanje ponovljenih izolata.
3. Kod pacijenata sa teškim infekcijama izazvanim *P. aeruginosa*, u terapiju treba uklju iti maksimalne doze antipseudomonasnih penicilina (karboksi ili ureidopenicilini) i razmotriti dodatak drugog antimikrobnog leka (kombinacije sa aminoglikozidima i fluorokinolonima)

ACINETOBACTER SPP

Uslovi testiranja:

Podloga: Mueller Hinton agar (MH agar)

Inokulum: Direktna suspenzija kolonija gustine 0.5 McFarland

Inkubacija: Aerobna, 35±2°C, 20-24 sata

Kontrola kvaliteta: (minimalni zahtevi)

E. coli ATCC 25922

E. coli ATCC 35218

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Preporuke za antibiogram

Grupa A	Grupa B	Grupa C
Ampicilin-sulbaktam	Amikacin	Kolistin**
Ceftazidim	Piperacilin-tazobaktam	Polimiksin B**
Gentamicin	Cefepim	
Ciprofloksacin	Cefotaksim Ceftriakson	
Imipenem Meropenem	Tetraciklin*	
	Trimetoprim- sulfametoksazol	

KOMENTARI

* Mikroorganizmi koji su osetljivi na tetraciklin smatraju se osetljivim i na doksiciklin. Me utim, neki sojevi koji su intermedijerni ili rezistentni na tetraciklin mogu biti osetljivi na doksiciklin.

** Osetljivost se odre uje dilucionim metodom (MIC).

BURKHOLDERIA CEPACIA I STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA

Uslovi testiranja:

Podloga: Mueller Hinton agar (MH agar)

Inokulum: Direktna suspenzija kolonija gustine 0.5 McFarland

Inkubacija: Aerobna, 35±2°C, 20-24 sata

Kontrola kvaliteta: (minimalni zahtevi)

E. coli ATCC 25922

E. coli ATCC 35218

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Preporuke za antibiogram

	Burkholderia cepacia	Stenotrophomonas maltophilia
GRUPA A	Trimetoprim-sulfametoksazol	Trimetoprim-sulfametoksazol
GRUPA B	Ceftazidim	Ceftazidim*
	Meropenem	

* Disk difuzioni test je nepouzdan, testirati MIC

STAPHYLOCOCCUS SPP

Uslovi testiranja:

Podloga: Mueller Hinton agar (MH agar)

Inokulum: Direktna suspenzija kolonija gustine 0.5 McFarland

Inkubacija: Aerobna, 35±2°C, 16-18 h; 24h za koagulaza negativne stafilokoke, cefoksitin (Fox) i vankomicin

Kontrola kvaliteta: (minimalni zahtevi)

S. aureus ATCC 25923 (disk difuzioni test)

S. aureus ATCC 29213 (MIC)

E. coli ATCC 35218 (za laktam/ laktamaza inhibitorne kombinacije)

Preporuke za antibiogram

Grupa A	Grupa B	Grupa C	Grupa U
Cefoksitin ^a (Fox)	Tetraciklin ^d	Hloramfenikol ^b	Norfloksacin
Penicilin ^a (P)	Linezolid	Fusidinska kiselina	Nitrofurantoin
Eritromicin ^b ili Azitromicin ^b	Rifampin ^e	Ciprofloksacin ^g ili Ofloksacin ^g	
Klindamicin ^{b,c}	Vankomicin ^f	Gentamicin	
Trimetoprim- sulfametoksazol			

KOMENTARI

- a) Za izolate kod kojih je **P = S** soj Staphylococcus spp je osetljiv i na druge peniciline, laktam/ laktamaza inhibitorne kombinacije, cefalosporine i karbapeneme. Za sojeve koji imaju zonu inhibicije za penicilin > 29 mm, pre izveštavanja o njihovoj osetljivosti na penicilin, treba uraditi test za dokazivanje inducibilne - laktamaze (nitrocefinski test nakon indukcije cefoksitinom). Pozitivan - laktamaza test predvi a rezistenciju na penicilin, amino, karboksi i ureidopeniciline.
- P = R i Fox = S** soj Staphylococcus spp. je rezistentan na penicilinaza labilne peniciline, ali je osetljiv na penicilinaza stabilne peniciline, laktam/ laktamaza inhibitorne kombinacije, cefalosporine i karbapeneme.
- P = R i Fox = R** bez obzira na rezultat in vitro testa, svi penicilini, cefalosporini, karbapenemi i drugi beta laktami kombinovani sa inhibitorima beta laktamaza su klini ki neefikasni i rezultate izdavati sa komentarom: **“Izolovani soj Staphylococcus spp. je rezistentan na sve trenutno dostupne beta laktamske antimikrobne lekove!”**

Disk difuzioni skrining test za predviđanje rezistencije stafilokoka uslovljene mecA genom

AML (konc. leka)	Organizam	Pre-nik zone inhibicije u mm		Komentar
Cefoksitin (30µg)	S. aureus	21	22	Za S. aureus ija je zona za cefoksitin 21 izvestiti kao oksacilin R Za S. aureus ija je zona za cefoksitin 22 izvestiti kao oksacilin S
Cefoksitin (30µg)	Koag. Neg. Staph.	24	25	Za KNS ija je zona za cefoksitin 24 izvestiti kao oksacilin R Za KNS ija je zona za cefoksitin 25 izvestiti kao oksacilin S

- b) Nije za rutinsko izveštavanje za izolate iz urina
- c) Za izolate rezistentne na eritromicin, a osetljive ili umereno osetljive na klindamicin, uraditi disk difuzioni test za dokazivanje inducibilne rezistencije na klindamicin. Inducibilna rezistencija na klindamicin može se otkriti pomoću u diska klindamicina od 2µg koji se u rutinskom disk difuzionom testu stavlja pored diska eritromicina od 15µg na rastojanju od 15-26 mm od ivice diska eritromicina. Nakon inkubacije, pojava prave crte između u zona ova dva diska ukazuje na inducibilnu rezistenciju na klindamicin. Za takav soj izvestiti da je klindamicin rezistentan uz komentar da ovaj antibiotik može biti efikasan kod nekih pacijenata.
- d) Mikroorganizmi koji su senzitivni na tetraciklin smatraju se senzitivnim i na doksiciklin. Međutim intermedijerni rezistentni sojevi na tetraciklin mogu pokazati osetljivost na doksiciklin.
- e) Ne treba da se koristi sam u terapiji
- f) Disk difuzioni metod nije pouzdan za testiranje osetljivosti na vankomicin. Odrediti MIC za sve izolate stafilokoka.
- g) Stafilokoki mogu razviti rezistenciju na fluorokinolone u roku od 3-4 dana od početka terapije, ponovljeno testiranje može biti korisno.

ENTEROCOCCUS

USLOVI TESTIRANJA:

Podloga: Mueller Hinton agar (MH agar)

Inokulum: direktna suspenzija kolonija gustine 0,5 McFarland

Inkubacija: aerobna, 35 ± 2° C, 16-18 sati; **24 sata** za **vankomicin**

KONTROLA KVALITETA:

S. aureus ATCC 25923

OPŠTI KOMENTARI

1. **UPOZORENJE!** Za Enterococcus spp cefalosporini, aminoglikozidi, klindamicin i SxT mogu pokazati aktivnost *in vitro*, ali su klini ki neefikasni. Ne bi trebalo izveštavati da su izolati enterokoka osetljivi na ove antibiotike.

2. Sinergizam izme u ampicilina, penicilina ili vankomicina i aminoglikozida (gentamicin i streptomycin) može da se predvidi upotrebon aminoglikozida visoke doze u skrining testu. Druge aminoglikozide ne treba testirati jer im aktivnost prema enterokoku nije bolja od gentamicina i streptomicina.

Preporuke za antibiogram

Grupa A	Grupa B	Grupa C	Grupa U
Penicilin ^a Ampicilin	Vankomicin	Gentamicin* (visoke doze)	Ciprofloksacin Norfloksacin
	Linezolid	Streptomycin* (visoke doza)	Nitrofurantoin
			Tetraciklin ^b

*samo u skrining testu za odre ivanje visokog nivoa rezistencije

a) Osetljivost na penicilin može da se koristi za predvi anje osetljivosti na ampicilin, amoksisilin, ampicilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanska kiselina, piperacilin i piperacilin-tazobaktam za sojeve koji ne produkuju -laktamaze. Sojevi osetljivi na ampicilin ne mogu se smatrati osetljivim i na penicilin. Ukoliko se traži osetljivost na penicilin, treba ga testirati.

Rezistencija enterokoka na ampicilin i penicilin uslovljen aprodukcijom -laktamaza ne može se pouzdano utvrditi rutinskim disk difuzionim testom. Preporu uje se izvo enje nitrocefinskog testa za izolate iz krvi i likvora. Pozitivan test ukazuje na rezistenciju na penicilin, kao i na amino-, karboksi- i ureidopeniciline.

Kombinovana terapija ampicilinom, penicilinom ili vankomicinom (za osetljive sojeve) sa aminoglikozidima je obi no indikovana kod ozbiljnih infekcija, kao što je endokarditis, ukoliko nije dokazan visok nivo rezistencije na gentamicin i streptomycin.

b) Izveštavati za vankomicin rezistentan Enterococcus faecium.

Disk difuzioni skrining test za odre ivanje osetljivosti na visoke doze aminoglikozida

Grupa	AML	Sadržaj u disku	Pre nik zone inhibicije u mm			Ekviv. MIC		Komentar
			R	N	S	R	S	
C	Gentamicin	120 µg	6	7-9	10	>50 0	50 0	Za zonu 7-9: test je neubedljiv (N) i potrebno je uraditi potvrdni test agar dilucionom metodom
C	Streptomycin	300 µg	6	7-9	10	-	-	

Rezultate osetljivosti na velike doze aminoglikozida (gentamicin i streptomycin) ne izveštavati u nalazu antibiograma na uobi ajeni na in, ve kao komentar klini aru da li e se kombinovanom terapijom sa ampicilinom ili penicilinom posti i o ekivani baktericidni efekat.

Za kontrolu kvaliteta rada koristiti *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

USLOVI TESTIRANJA:

Podloga: Mueller Hinton agar sa 5% ovije krvi

Inokulim: direktna suspenzija kolonija gustine 0,5 McFarland

Inkubacija: 35 ±2°C, 5% CO₂, 20-24 sata

KONTROLA KVALITETA:

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Preporuke za antibiogram

Grupa A	Grupa B	Grupa C
Eritromicin ^{a,b}	Klindamicin ^b	Hloramfenikol ^b
Penicilin ^c (oksacilin disk)	Ofloksacin	Rifampin ^e
SxT	Tetraciklin ^d	Linezolid
	Vankomicin	
	Cefepim* Cefotaksim* Ceftriakson*	Amoksicilin* Amoksicilin- klavulanska kiselina*
	Meropenem*	Cefuroksim*
		Ertapenem* Imipenem*

* Osetljivost se određuje dilucionom metodom (MIC).

a) Osetljivost i rezistencija na azitromicin se može predvideti na osnovu testiranja eritromicina.

b) Rutinski ne izveštavati za izolate iz urinarnog trakta

c) Sojevi sa zonom inhibicije za oksacilin 20mm su osetljivi na penicilin. Ako je zona inhibicije 19mm treba odrediti MIC za penicilin i ceftriakson ili cefotaksim ili meropenem (E test) jer se ona javlja kako kod rezistentnih i sojeva sa intermedijernim stepenom osetljivosti tako i kod određenih osetljivih sojeva.

Za izolate iz likvora osetljivost na penicilin i cefotaksim ili ceftriakson ili meropenem treba rutinski odrediti dilucionom metodom. Za ove izolate treba odrediti osetljivost na vankomicin dilucionom ili disk difuzionom metodom.

d) Organizmi koji su osetljivi na tetraciklin se smatraju osetljivim i na doksiciklin.

e) Ne koristi se sam u terapiji.

STREPTOCOCCUS – beta hemoliti ki

USLOVI TESTIRANJA:

Podloga : Mueller Hinton agar sa 5% ov ije krvi

Inokulum: direktna suspenzija kolonija gustine 0,5 McFarland

Inkubacija: 35±2°C, 5% CO₂, 20-24 sata

KONTROLA KVALITETA:

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Preporuke za antibiogram

GRUPA A	GRUPA B	GRUPA C
Eritromicin ^{a, b} Klinamicin ^{b, d}	Cefepim ili Cefotaksim ili Ceftriakson	Hloramfenikol ^b
Penicilin ^c ili Ampicilin ^c	Vankomicin	Ofloksacin
		Linezolid

a) Testiranjem eritromicina može se predvideti osetljivost i rezistencija na azitromicin.

b) Ne izveštavati rutinski za izolate iz urina.

c) Izolati streptokoka osetljivi na penicilin mogu se smatrati osetljivim i na: ampicilin, amoksicilin, amoksicilin-klavulanska kiselina, ampicilin-sulbaktam, cefahlor, cefepim, cefotaksim, ceftriakson, cefalotin, ertapenem, imipenem, meropenem i posebno testiranje ovih antibiotika nije potrebno.

Ispitivanje osetljivosti *S. pyogenes* i *S. agalactiae* na penicilin i druge laktamske antibiotike nije neophodno za potrebe kliničara, kao ni na vankomicin, jer nije poznato da postoji rezistencija na njih.

d) Inducibilna rezistencija na klindamicin može se dokazati disk-difuzionim testom (videti komentar pod "c" kod stafilokoka).

STREPTOCOCCUS SPP – viridans grupa

USLOVI TESTIRANJA:

Podloga : Mueller Hinton agar sa 5% ov ije krvi

Inokulum: direktna suspenzija kolonija gustine 0,5 Mcfarland

Inkubacija: 35±2°C, 5% CO₂, 20-24 sata

KONTROLA KVALITETA:

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Preporuke za antibiogram

GRUPA A	GRUPA B	GRUPA C
Penicilin ^{a,*} ili Ampicilin ^{a,*}	Cefepim Cefotaksim Ceftriakson	Hloramfenikol ^b
	Vankomicin	Klindamicin ^{b,d}
		Eritromicin ^{b,c}
		Linezolid

* Sojeve izolovane iz primarno sterilnih podru ja (likvor, krv) treba ispitati dilucionom metodom (MIC).

a) Izolati streptokoka osetljivi na penicilin mogu se smatrati osetljivim i na: ampicilin, amoksicilin, amoksicilin-klavulanska kiselina, ampicilin-sulbaktam, cefahlor, cefepim, cefotaksim, ceftriakson, cefalotin, ertapenem, imipenem, meropenem i posebno testiranje ovih antibiotika nije potrebno.

Sojevi sa intermedijernim stepenom osetljivosti na penicilin ili ampicilin mogu zahtevati kombinovanu terapiju sa aminoglikozidima za postizanje baktericidnog efekta.

b) Ne izveštavati rutinski za izolate iz urina.

c) Testiranjem eritromicina može se predvideti osetljivost i rezistencija na azitromicin.