



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE  
PENTRU MICROBIOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE  
„CANTACUZINO”  
Splaiul Independenței 103, București, 050096  
LABORATORUL NAȚIONAL DE REFERINȚA PENTRU ITS

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Sef laborator	Manager calitate	Director LNR
Nume prenume	Dr. Dan IONESCU		
Semnatura*			
Data			

\* Semnatura se aplică pe documentul original

## PROCEDURA SPECIFICĂ

### TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE – METODA DIFUZIMETRICĂ PENTRU *N.GONORRHOEAE*

Cod:

Editia :

Revizia :

Data aplicării :

**Avertisment** Documentul de față este proprietatea I.N.C.D.M.I. « CANTACUZINO »  
Reproducerea și difuzarea documentului sunt în exclusivitate dreptul I.N.C.D.M.I. «CANTACUZINO»  
Copiile sunt numerotate și controlate.

Exemplar nr : \_\_\_\_\_

Destinatarul: \_\_\_\_\_

Exemplar :  controlat  necontrolat

<b>I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS</b>	<b>PROCEDURA SPECIFICĂ</b>	Exemplar nr.
	<b>TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE-METODA DIFUZIMETRICĂ</b>	Ediția:
	<b>PENTRU N.GONORRHOEAE</b>	Revizia:
	cod :	Data aplicării:

### INDICATORUL APROBARILOR SI REVIZIILOR

Revizia/ Data	Elementele modificarii (capitol, pagina, alineat)	Elaborat (nume, prenume, semnatura*)	Verificat (nume, prenume, semnatura*)	Aprobat (nume, prenume, semnatura*)

\* Semnatura se aplică reviziei curente

<b>I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS</b>	<b>PROCEDURA SPECIFICĂ</b>	Exemplar nr.
	<b>TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE-METODA DIFUZIMETRICĂ</b>	Editia:
	<b>PENTRU N.GONORRHOEAE</b>	Revizia:
	cod :	Data aplicării:

## CUPRINS

INDICATORUL APROBARILOR SI REVIZIILOR.....	2
CUPRINS .....	3
1. SCOP .....	4
2. DOMENIUL DE APLICARE .....	4
3. DOCUMENTE DE REFERINTA.....	4
4. DEFINITII SI PRESCURTARI.....	4
4.1. Definitii N.A.....	4
4.2. Prescurtari.....	4
5. DESCRIEREA ACTIVITATII .....	4
5.1. Condiții prealabile .....	4
5.2. Resurse necesare .....	4
5.3. Execuția testării .....	5
6. RESPONSABILITATI .....	6
7. FORMULARE / INREGISTRARI, DOCUMENTE CONEXE.....	6
7.1. FORMULARE / INREGISTRARI .....	6
7.2. DOCUMENTE CONEXE .....	6
8. ANEXE .....	6

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>PROCEDURA SPECIFICĂ</b> <b>TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE-METODA DIFUZIMETRICĂ</b> <b>PENTRU N.GONORRHOEAE</b>  cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

## 1. SCOP

Procedura descrie operațiunile necesare pentru testarea sensibilității la antibiotice a *N.gonorrhoeae* prin metoda difuzimetrică, utilizând microcomprimate impregnate cu antibiotic.

## 2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura este utilizată pentru depistarea tulpinilor de *N.gonorrhoeae* rezistente la unul sau mai multe antibiotice și pentru asigurarea unui tratament corect al infecției gonococice. Se execută de către personalul autorizat din cadrul Laboratorului ITS din I.N.C.D.M.I. Cantacuzino, pe tulpini izolate din produse patologice umane, purificate și caracterizate biochimic.

## 3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- 3.3.1. Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World – WHO 2003
- 3.3.2. Genital Tract Culture Manual – 2002, Toronto Mount Sinai Hospital, Microbiology Dept.
- 3.3.3. Manual of Clinical Microbiology - 7th ed., 1999 – Murray et al.
- 3.3.4. Clinical Practice in STD – 1989, Robertson et al.
- 3.3.5. Laboratory Methods for the Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases – 1987, Wentworth- Judson
- 3.3.6. NCCLS M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing

## 4. DEFINITII SI PRESCURTARI

### 4.1. Definitii N.A.

### 4.2. Prescurtari

SF = solutie salina fiziologica

TFS = Tampon Fosfat Salin

ID/SN ID/SN = numar de identificare/numar de serie

## 5. DESCRIEREA ACTIVITATII

### 5.1. Condiții prealabile

- 5.1.1. Temperatura camerei de lucru trebuie să fie de +20+25°C.
- 5.1.2. Pregătirea postului de lucru și asigurarea condițiilor de biosiguranta
- 5.1.3. Verificarea funcționării aparatelor și dispozitivelor necesare procedurii (termostat +37°C, 5% CO<sub>2</sub> sau exicator cu plicuri generatoare de CO<sub>2</sub> sau lumânare)
- 5.1.4. Reactivii care vor fi utilizați ser fiziologic (SF), tampon fosfat salin (TFS) și mediul de cultură pentru testarea sensibilitatii la antibiotice se aduc la temperatura de lucru. Plăcile cu mediu vor fi ținute în termostat până când suprafața mediului se usucă complet.

### 5.2. Resurse necesare

#### 5.2.1. Tulpini bacteriene :

- tulpina de testat – cultura de 18-24h pe mediu neselectiv
- tulpina de referinta ***Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226** (cultura de 18-24h pe mediu neselectiv), pentru controlul testarii in ziua de lucru

5.2.2. Mediu GC agar base completat cu 1% IsoVitaleX sau cu un supliment echivalent (fără hemoglobină sau alte derivate de sânge) pentru testarea sensibilitatii la antibiotice la ***N. gonorrhoeae***

5.2.3. Discuri impregnate cu antibiotice pentru antibiograma difuzimetrica controlate cf. recomandarilor ultimului standard NCCLS M100 : Penicilina – 10 U, Tetraciclina – 30 µg, Ceftriaxona - 30 µg, Cefixim - 30 µg

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>PROCEDURA SPECIFICĂ</b> <b>TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE-METODA DIFUZIMETRICĂ</b> <b>PENTRU N.GONORRHOEAE</b>  cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

Ciprofloxacin 5 µg, Ofloxacin 5 µg, Spectinomycin 100 µg.

5.2.4. Alte materiale : tuburi 12 / 120mm sterile, ansa bacteriologica sterilă plastic, standardul 0,5 McFarland, pipete gradate de 1 sau 2 ml sterile si pipetoare, tampoane de bumbac sterile, pense iris pentru aplicarea antibioticelor, stativ pentru tuburi, pipete Pasteur, rigla gradata pentru citirea rezultatelor antibiogrammei, hârtie neagră pentru citirea diametrului de inhibitie pe fond intunecat.

5.2.5. Echipamente :

- Termostat + 35.5 +37°C 5% CO<sub>2</sub>
- Microscop
- Hotă cu flux laminar
- Excicator cu lumânare sau plicuri generatoare de CO<sub>2</sub>
- Vortex

### 5.3. Execuția testării

Execuția operațiilor în succesiunea lor și rezultatele se înregistrează în : Fisa de lucru Testarea sensibilității la antibiotice *N.gonorrhoeae* cod : și Formularul de înregistrare rezultate cod :

5.3.1. Se prepara suspensii de cultură în SF sau TFS sterile, cu o turbiditate egală cu cea a standardului McFarland 0.5, pornind de la cultura de 18-24h a tulpinii de testat și a tulpinii de referință *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226 pe mediu GC neselectiv  
Se rulează un tampon peste colonii și se introduce în tubul cu TFS/SF omogenizându-se bine suspensia prin vortexare sau agitare puternică.

Notă :

- Tulpinile de referință QC păstrate în cultură sau în congelator (-20°C sau -70°C), trebuie subcultivate cel puțin odată înainte de testare

5.3.2. Se ajustează turbiditatea suspensiilor bacteriene la valoarea 0.5 McFarland (10<sup>8</sup> CFU/ml). Pentru a se evita pierderea viabilității, prepararea suspensiei etalonate și însămânțarea pe mediu trebuie făcute în maximum 20min. Pentru același motiv, se vor prepara maximum 5 suspensii odată.

5.3.3. Se insamantează plăcile cu mediu GC pentru antibiogramă utilizând tampoane noi. După imbibare, se apasă tamponul de peretii tubului pentru îndepărtarea excesului. Se însămânțează placa cu tamponul, rotind-o cu câte 60° de 3 ori. În timpul inoculării nu se mai reîmbibă tamponul. Se marchează plăcile insamantate cu T pentru tulpina de testat și cu R pentru tulpina de referință.

În practica zilnică se calculează numărul de plăci necesare în funcție de numărul de tulpini și de antibioticele utilizate, ținând cont de faptul că se utilizează 1 placă pentru maximum 3-4 antibiotice.

**Pentru a nu afecta viabilitatea bacteriilor din suspensie, însămânțarea nu se întârzie mai mult de 15 min.**

5.3.4. Se lasă plăcile să se usuce acoperite, pe masă, 3-5min, până când lichidul inoculului este absorbit în mediu, deoarece suprafața mediului trebuie să fie uscată când se aplică discurile.

5.3.5. Se aplică discurile (echilibrate timp de o oră la temperatura camerei) cu pensa, pe placa și se presează ușor discul de suprafața mediului. Nu se aplică mai mult de 4 discuri pe o placă. Se plasează discurile echidistant față de marginile plăcii și între ele. Odată ce discul a luat contact cu agarul, el nu mai trebuie mișcat.

5.3.6. Se incubează placa inversată, timp de 18 – 24 h plăcile la +37°C, în atmosfera umedă cu 5% CO<sub>2</sub>.

5.3.7. Se măsoară diametrele zonelor de inhibitie pentru tulpina de referință cu ajutorul riglei gradate, pe spatele plăcii cu mediul insamantat, în lumina reflectată, pe un fond întunecat. Rezultatele se notează în mm în Formularul de înregistrare rezultate cod :.

5.3.8. Se măsoară diametrele zonelor de inhibitie pentru tulpina de testat în același mod. În cazul marginilor duble, citește marginea interioară. Rezultatele se notează în mm în Formularul de înregistrare rezultate cod :

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>PROCEDURA SPECIFICĂ</b> <b>TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE-METODA DIFUZIMETRICĂ</b> <b>PENTRU N.GONORRHOEAE</b>  cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

### 5.3.9. Controlul calitatii (QC) pentru testarea sensibilitatii in ziua de lucru:

- 5.3.9.1. Se valideaza rezultatele testarii prin compararea diametrelor măsurate pentru tulpina de referinta cu limitele admise specificate in standardul NCCLS.
- 5.3.9.2. Daca diametrele pentru tulpina de referinta se inscriu intre limitele admise, se procedeaza la compararea rezultatelor pentru tulpina de testat cu valorile standard pentru S, I si R din tabelul NCCLS, conform criteriilor de interpretare specificate in Formularul de inregistrare rezultate și se înregistrează rezultatul sub forma S,I, R în formular.

## 6. RESPONSABILITATI

Procedura este efectuată de către asistent medical.

Verificarea execuției procedurii este efectuată de către șeful de laborator.

## 7. FORMULARE / INREGISTRARI, DOCUMENTE CONEXE

### 7.1. FORMULARE / INREGISTRARI

- 7.1.1. FIȘĂ DE LUCRU TESTAREA SENSIBILITATII LA ANTIBIOTICE *NEISSERIA GONORRHORAE*  
cod:
- 7.1.2. FORMULAR DE INREGISTRARE REZULTATE SENSIBILITATE ANTIBIOTICE *NEISSERIA GONORRHOEAE* cod :
- 7.1.3. FIȘĂ DE PREPARARE SI CONTROL MEDII cod :

### 7.2. DOCUMENTE CONEXE

- 7.2.1. PROCEDURA SPECIFICA IDENTIFICARE/CONFIRMARE *NEISSERIA GONORRHOEAE*  
IZOLATĂ DIN SECREȚII cod:
- 7.2.2. INSTRUCȚIUNE DE LUCRU PREPARAREA MEDIILOR DE CULTURĂ, CRIOPROTECȚIE ȘI  
LIOFILIZARE PENTRU *N.GONORRHOEAE* cod :

## 8. ANEXE

- Anexa 1 FIȘĂ DE LUCRU TESTAREA SENSIBILITATII LA ANTIBIOTICE *NEISSERIA GONORRHORAE*  
cod :
- Anexa 2. FORMULAR DE INREGISTRARE REZULTATE SENSIBILITATE ANTIBIOTICE *NEISSERIA GONORRHOEAE* cod :

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>PROCEDURA SPECIFICĂ</b>	Exemplar nr.
	<b>TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE-METODA DIFUZIMETRICĂ</b>	Editia:
	<b>PENTRU N.GONORRHOEAE</b>	Revizia:
	cod :	Data aplicării:

ANEXA 1

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>FIȘĂ DE LUCRU</b> <b>TESTARE SENSIBILITATE LA ANTIBIOTICE</b> <b>NEISSERIA GONORRHOEAE</b> Nr.             din data de : cod :
-------------------------------------	---

Nr.Proba	Data primirii	Diagnostic prezumptiv	Conditii transport: temp./timp	Observatii

Preparare suspensie densitate McFarland 0.5 din cultura pura 24h

Tulpina de testat [ ]  
Tulpina de referinta [ ]

Insamantare placi cu mediu pt. antibiograma Lot             Nr.placi

Uscare pe masa 3-5min. [ ]

Aplicare discuri cu antibiotice

Penicilina 10u [ ]  
Tetraciclina 30 µg [ ]  
Spectinomocina 100µg [ ]  
Ceftriaxon 30 µg [ ]  
Cefixin 5µg [ ]  
Ciprofloxacin 5µg [ ]  
Ofloxacin 5µg [ ]

Incubare 24h la 37°C, în atmosferă umedă, 5%CO<sub>2</sub>.

Masurare diametre zone de inhibitie

Tulpina de referinta [ ]  
Tulpini de testat [ ]

Inregistrarea rezultatelor in Formular rezultate Cod:

Verificat :

Operator :

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>PROCEDURA SPECIFICĂ</b> <b>TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE-METODA DIFUZIMETRICĂ</b> <b>PENTRU N.GONORRHOEAE</b>  <b>cod :</b>	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

ANEXA 2

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>FORMULAR ÎNREGISTRARE REZULTATE</b> <b>TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE-METODA DIFUZIMETRICĂ PENTRU N.GONORRHOEAE</b> <b>Cod :</b>
--	---

Nr. Tulpina:		Prelevat:			Varsta:			
Identificare:								
Numele executantului:		Verificat:		Data testarii:			Data raportarii rezultatelor:	
Doza disc	Antibiotic	Criterii de interpretare (mm)			Diametrul zonei de inhibite citit pentru tulpina de testat	Tulpina CQ NCCLS <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226		Interpretare  S = SENSIBIL I = INTERMEDIAR SENSIBIL R = REZISTENT
		S	I	R		Limite admise	Ø citat	
10 U	Penicilina	≥ 47	27 – 46	≤ 26		26 – 34 mm		
30 µg	Tetraciclina	≥ 38	31 – 37	≤ 30		30 – 42 mm		
100 µg	Spectinomocina	≥ 18	15 – 17	≤ 14		23 – 29 mm		
30 µg	Ceftriaxon**	≥ 35	**	**		39 – 51 mm		
5 µg	Cefixim**	≥ 31	**	**		27 – 46 mm		
5 µg	Ciprofloxacina	≥ 41	28 – 40	≤ 27		48 – 58 mm		
5 µg	Ofloxacin	≥ 31	25 - 30	≤ 24		43 – 51 mm		