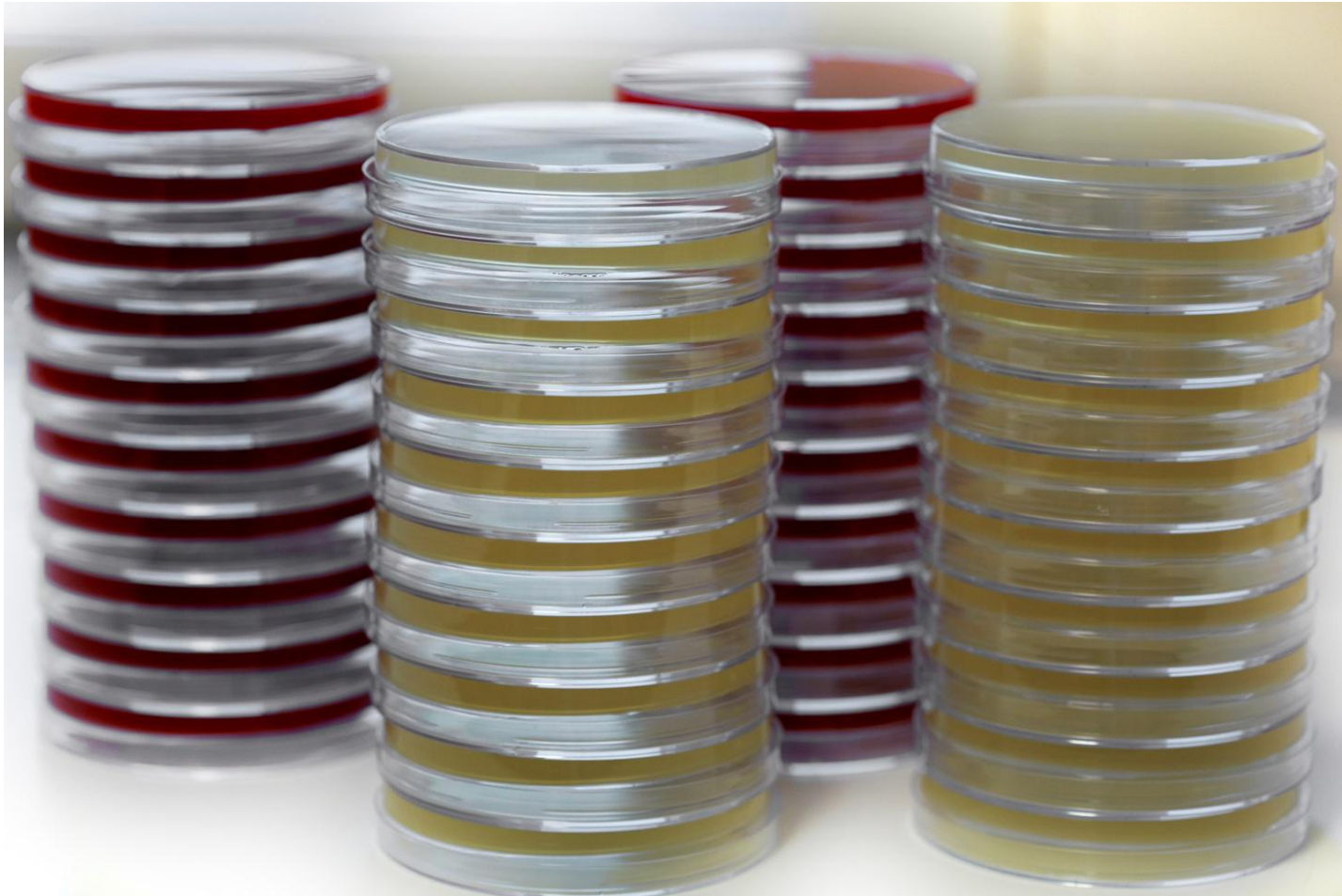


**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ & ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΑΛΚΙΔΑΣ
Ελένη Βαλκάνου**

**Προσδιορισμός Μικροβιακής Αντοχής
Μέθοδος Διάχυσης με Δίσκους
(Disk Diffusion Method)**

Θρεπτικά υποστρώματα



Θρεπτικά υποστρώματα

- Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο Mueller-Hinton agar (MH)
- Για τους μικροοργανισμούς που δεν αναπτύσσονται εύκολα χρησιμοποιείται MH & ενσωματώνεται 5% αίμα προβάτου χωρίς ινωδογόνο

Υποστρώματα / Μικροοργανισμός

Μικροοργανισμοί	Υποστρώματα
Enterobacteriaceae <i>Staphylococcus spp.</i>	Mueller-Hinton agar
<i>Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella multocida</i> & <i>Mannheimia haemolytica</i>	Mueller-Hinton agar + 5% αίμα προβάτου με ινωδογόνο
<i>Histophilus somni</i> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Σοκολατούχο Mueller- Hinton agar

Προετοιμασία υποστρώματος

- Προετοιμασία υποστρώματος σύμφωνα με τον κατασκευαστή
- Το αίμα προστίθεται όταν το υπόστρωμα έχει αποστειρωθεί και έχει κρυώσει στους 42-45 C, ακολουθεί καλή ανάμιξη και μοιράζεται στα τρυβλία με άσηπτο τρόπο
- Διάμετρος τρυβλίου 90 mm (~25 ml υποστρώματος - πάχος υποστρώματος 4 mm)

Έλεγχος ποιότητας Mueller Hinton Agar

- Μεγάλες ή μικρές συγκεντρώσεις **δισθενών κατιόντων** διαπιστώνονται, εάν κατά την εξέταση της ***P. Aeruginosa* ATCC 27853** με δίσκο γενταμικίνης προκύψει ζώνη αναστολής εκτός των ορίων : 16-21 mm
- Μεγάλες συγκεντρώσεις **θυμίνης & θυμιδίνης** στο υπόστρωμα διαπιστώνονται, εάν κατά την εξέταση του ***E. faecalis* ATCC 29212** με **τριμεθοπρίμη ή σουλφοναμίδες ή τριμεθοπρίμη & σουλφομεθοξαζόλη** προκύψει ζώνη αναστολής <20mm

Αποθήκευση των τρυβλίων του ΜΗΑ

- Τα τρυβλία πριν χρησιμοποιηθούν δεν θα πρέπει να έχουν σταγόνες υγρασίας
- Προσοχή να μην στεγνώνονται υπερβολικά
- Αν δεν χρησιμοποιηθούν άμεσα θα πρέπει να αποθηκεύονται σε σακούλες κλειστές στο ψυγείο

Εναιώρημα ενοφθαλμισμού

Θολερότητα ισοδύναμη
με το πρότυπο δ/μα
0.5 McFarland *

*αντιστοιχεί σε $\sim 1-2 \times 10^8$
CFU/mL για την *E. coli*



Επιλέγονται καλά μεμονωμένες αποικίες, από μη εκλεκτικό υπόστρωμα, που ενοφθαλμίστηκε την προηγούμενη ημέρα



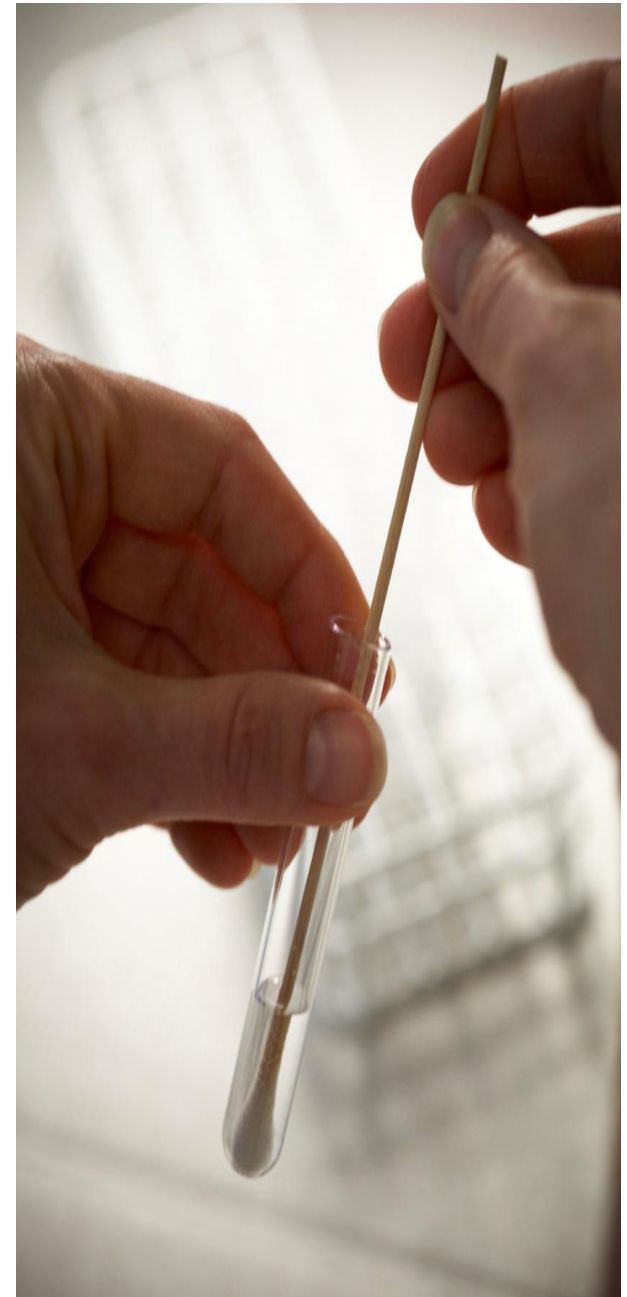
Προετοιμασία εναιωρήματος ενοφθαλμισμού

- Διαλύονται περισσότερες από μία αποικίες (συνήθως 3-4 μεσαίου μεγέθους) σε 4ml 0.9% ορού, έτσι ώστε να δημιουργηθεί εναιώρημα όμοιας θολερότητας με το πρότυπο δ/μα 0.5 McFarland – σύγκριση σε ασπρόμαυρο φόντο
- Εάν δεν επιτευχθεί η απαιτούμενη θολερότητα προστίθενται περισσότερες αποικίες
- Εάν γίνει πιο πυκνό το εναιώρημα προστίθεται ορός
- Μπορεί να ελεγχθεί η θολερότητα με φωτόμετρο: στα 625 nm η απορρόφηση θα πρέπει να είναι από 0,08-0,13

Ενοφθαλμισμός τρυβλίων

Το εναιώρημα ενοφθαλμισμού θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε 15 λεπτά από την παρασκευή του

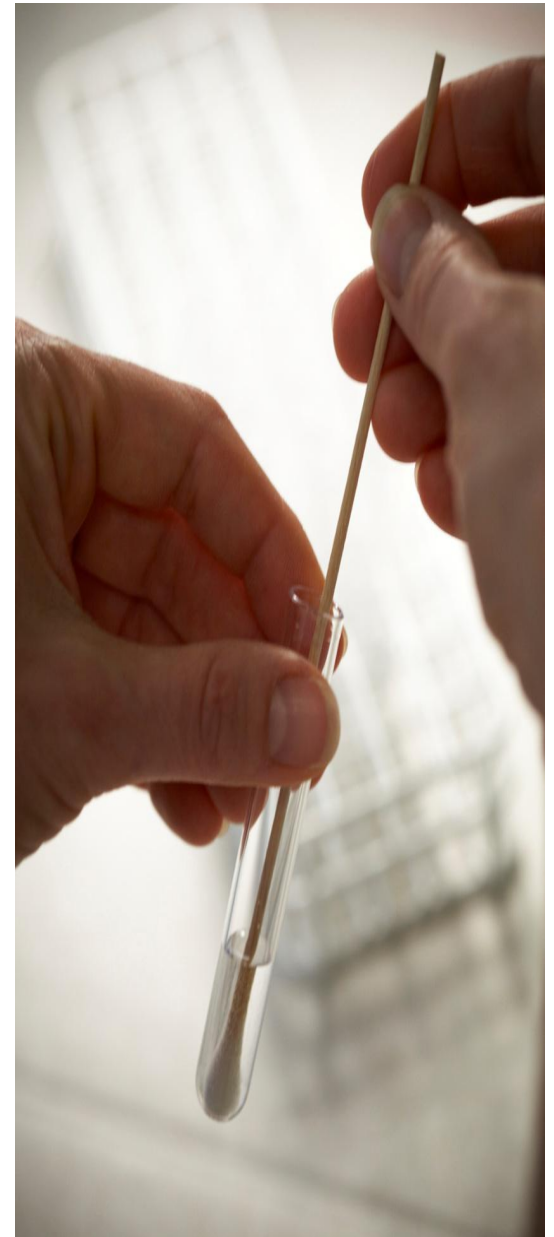
βυθίζεται ο βαμβακοφόρος στυλεός και περιστρέφεται αρκετές φορές προκειμένου να εμποτιστεί το βαμβάκι



Ενοφθαλμισμός τροβλίων

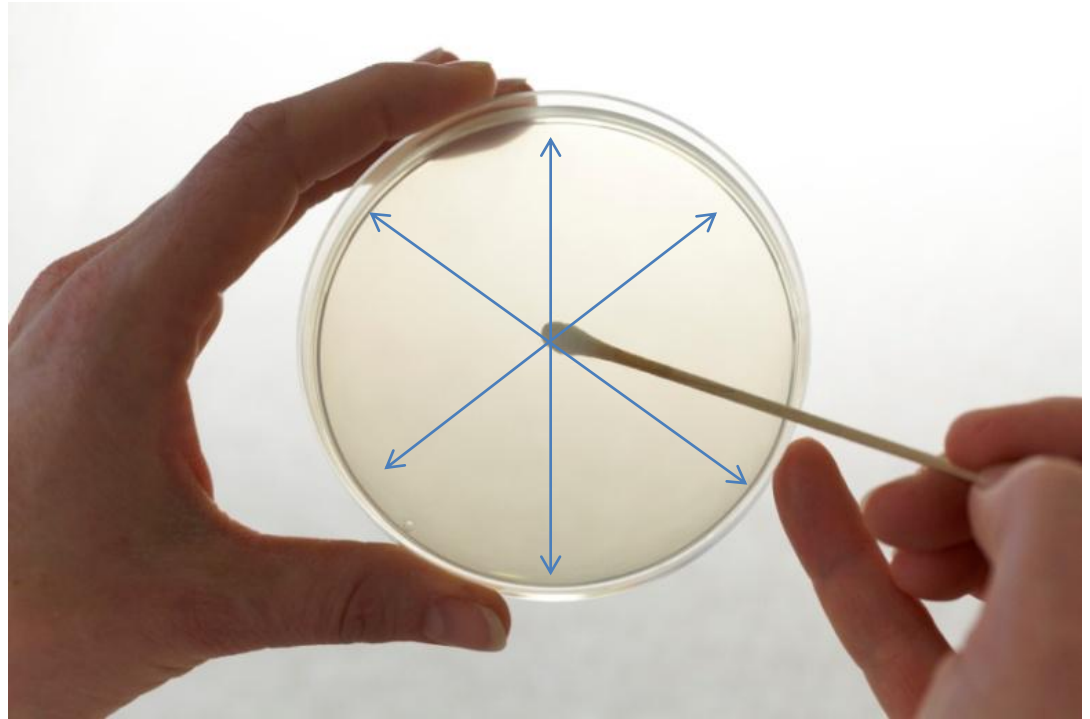
Πιέζεται το βαμβάκι στα στεγνά τοιχώματα του σωλήνα, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του υγρού

διότι η υπερβολική ανάπτυξη του μικροοργανισμού στα τροβλία θα είχε σαν αποτέλεσμα μικρότερες ζώνες αναστολής από τις αναμενόμενες





Ενοφθαλμισμός τρυβλίων

Με τον βαμβακοφόρο
στυλεό, καλύπτεται
ολόκληρη η επιφάνεια με
παράλληλες συνεχείς
γραμμές από την μία άκρη
του τρυβλίου στην άλλη,
προς τρεις διαφορετικές
κατευθύνσεις,
περιστρέφοντας το τρυβλίο
κατά 60 C κάθε φορά



Στο τέλος, με το
βαμβακοφόρο στυλεό
ενοφθαλμίζεται η περιφέρεια
του τρυβλίου, κοντά στο
τοίχωμά του.

Ενοφθάλμισμα

- Είναι σημαντικό το εναιώρημα ενοφθαλμισμού να μην είναι πιο πυκνό από το πρότυπο δ/μα 0.5 McFarland αλλά και η ποσότητα του ενοφθαλμίσματος να μην είναι πολύ μεγάλη.
- Ελέγχονται οι ζώνες αναστολής των στελεχών αναφοράς αν βρίσκονται εντός ορίων 
αν οι ζώνες που προκύπτουν είναι μικρότερες από τα όρια 
τότε το εναιώρημα ενοφθαλμισμού ήταν πυκνότερο ή η ποσότητα που ενοφθαλμίστηκε μεγαλύτερη.
- Θα πρέπει να πιέζεται το βαμβάκι στα στεγνά τοιχώματα του σωλήνα λίγο πιο έντονα, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του υγρού (προσοχή να μην στεγνώσει τελείως το βαμβάκι)

Αποθήκευση των δίσκων των αντιβιοτικών

- Οι δίσκοι των αντιβιοτικών θα πρέπει να αποθηκεύονται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Οι δίσκοι που βρίσκονται σε χρήση μπορούν να βρίσκονται σε σφραγισμένο περιέκτη, στους 4-8 C, με κατάλληλο ξηραντικό υλικό (για την απομάκρυνση της υγρασίας) μακριά από το φως.
- Για να αποφευχθεί η απορρόφηση υγρασίας από τους δίσκους, θα πρέπει ο περιέκτης να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν ανοιχθεί.
- Να μην χρησιμοποιούνται οι δίσκοι μετά την ημερομηνία λήξης τους.

Εναπόθεση των δίσκων

- γίνεται ≤ 15 λεπτά από τον ενοφθαλμισμό του τρυβλίου
- εφάπτονται με την επιφάνεια του υποστρώματος
- τοποθετούνται έτσι ώστε οι ζώνες αναστολής να μην υπερκαλύπτουν η μία την άλλη γιατί δεν θα μπορούν να μετρηθούν οι διάμετροι



Επώαση των τρυβλίων

- Η επώαση θα πρέπει να ξεκινά μέσα σε 15 λεπτά από την εναπόθεση των δίσκων
- Με την άμεση τοποθέτηση των τρυβλίων στον επωαστικό κλίβανο αποφεύγεται η πρώιμη διάχυση του αντιβιοτικού, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεγαλύτερες ζώνες από τις αναμενόμενες.
- Δεν θα πρέπει να τοποθετούνται πολλά τρυβλία το ένα πάνω στο άλλο, γιατί η άνιση κατανομή της θερμοκρασίας μέσα στον κλίβανο θα μπορούσε να επηρεάσει το μέγεθος της ζώνης αναστολής
- Το ΜΗ επωάζεται στον αέρα & το ΜΗ με αίμα σε ατμόσφαιρα με 3-7% CO₂.

Συνθήκες επώασης

Μικροοργανισμοί	Συνθήκες επώασης
<i>Enterobacteriaceae</i>	35 ± 2 °C στον αέρα για 16-18h
<i>Staphylococcus spp.</i>	35 ± 2 °C στον αέρα για 16-18h
<i>Pasteurella multocida & Mannheimia haemolytica</i>	35 ± 2 °C στον αέρα για 16-18h
<i>Streptococcus spp.</i>	35 ± 2 °C στον αέρα με 3-7% CO ₂ για 20-24h
<i>Histophilus somni</i>	35 ± 2 °C στον αέρα με 3-7% CO ₂ για 20-24h
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	35 ± 2 °C στον αέρα με 3-7% CO ₂ για 20-24h

Κανόνας των 15-15-15 λεπτών

- Το εναιώρημα ενοφθαλμισμού θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε **15 λεπτά** από την παρασκευή του
- Η εναπόθεση των δίσκων να γίνει μέσα σε **15 λεπτά** από τον ενοφθαλμισμό των τρυβλίων
- Έναρξη επώασης σε **15 λεπτά** από την εναπόθεση των δίσκων

Έλεγχος ποιότητας της δοκιμής

Μικροοργανισμός	ATCC
<i>E. coli</i>	25922
<i>P. aeruginosa</i>	27853
<i>S. aureus</i>	29213
<i>E. faecalis</i>	29212
<i>S. pneumoniae</i>	49619

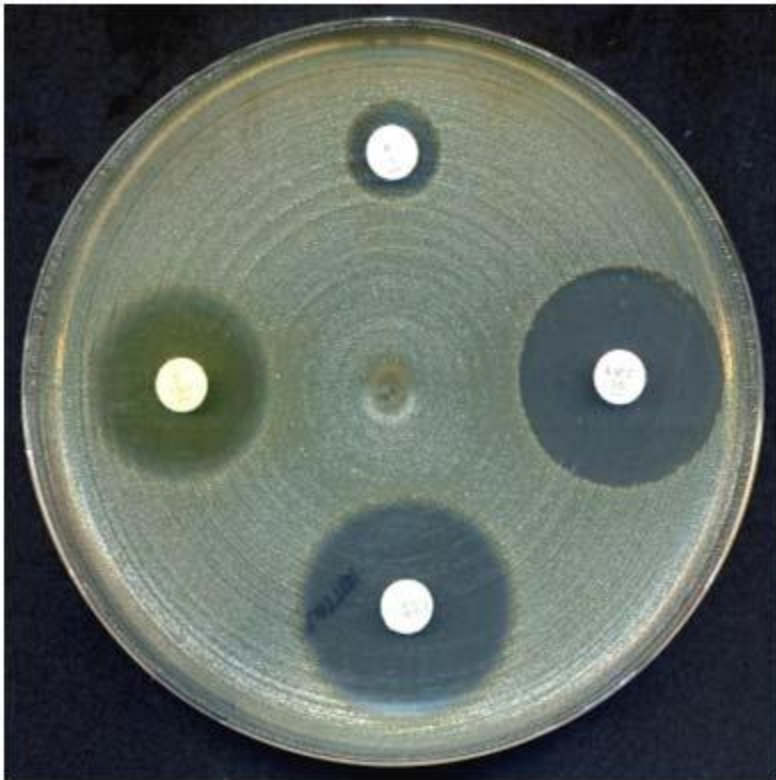
Έλεγχος των τρυβλίων μετά την επώαση

- Εφόσον το ενοφθάλμισμα ήταν το κατάλληλο & έγινε σωστά ο ενοφθαλμισμός του τρυβλίου, θα πρέπει η ανάπτυξη του μικροοργανισμού να είναι ομοιογενής σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου
- Όταν υπάρχει ομοιογένεια στην ανάπτυξη σχηματίζονται κυκλικές ζώνες αναστολής
- Εάν υπάρχουν μεμονωμένες αποικίες, αυτό σημαίνει ότι το ενοφθάλμισμα ήταν πολύ ελαφρύ & η εξέταση θα πρέπει να επαναληφθεί.

Η ανάπτυξη θα πρέπει να είναι
ομοιογενής & συνεχής



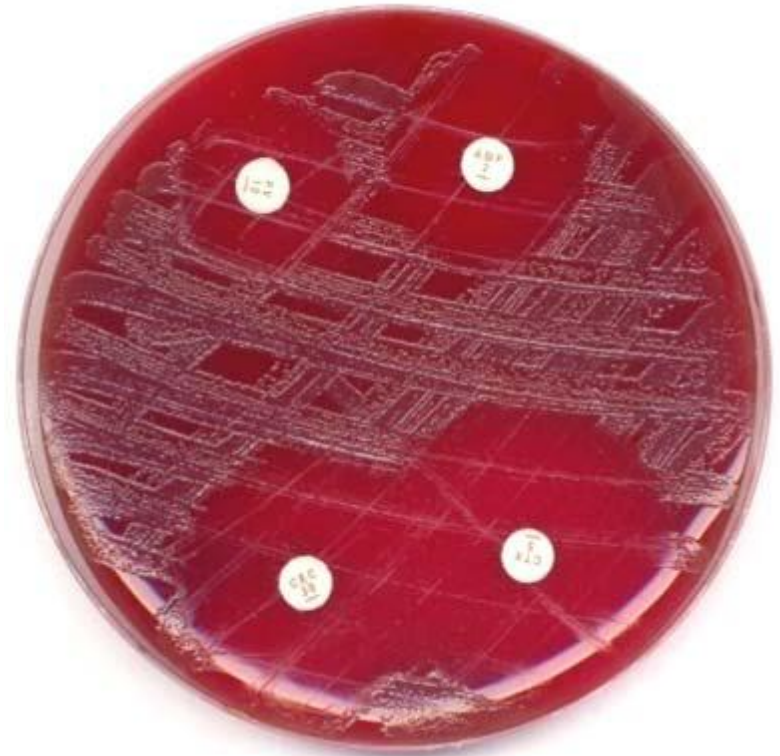
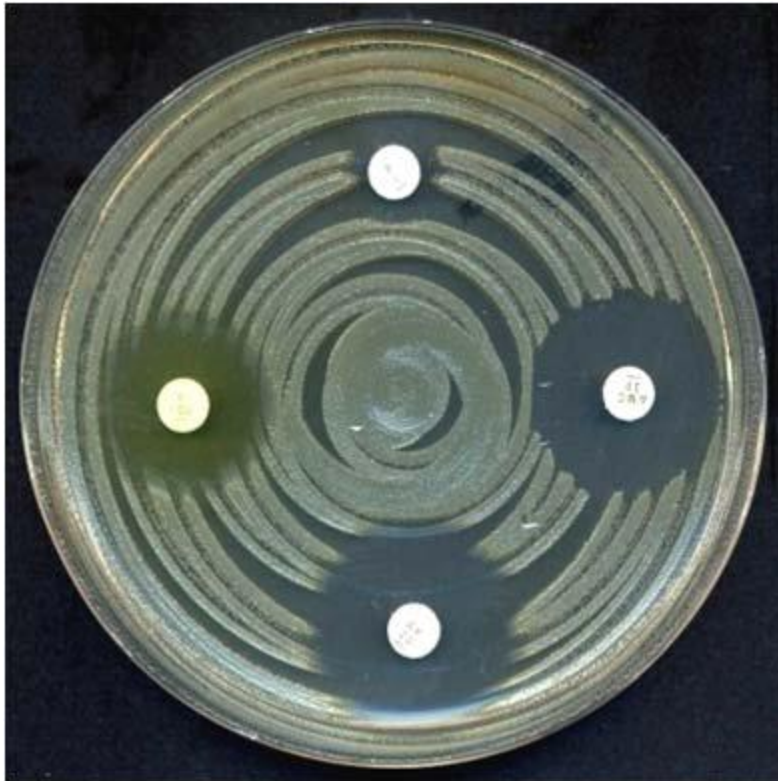
Η ανάπτυξη θα πρέπει να είναι ομοιογενής & συνεχής



Λανθασμένος ενοφθαλμισμός

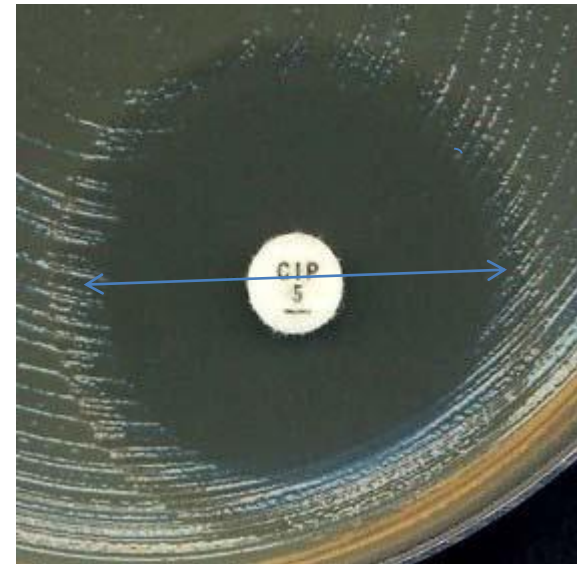


Λανθασμένος ενοφθαλμισμός

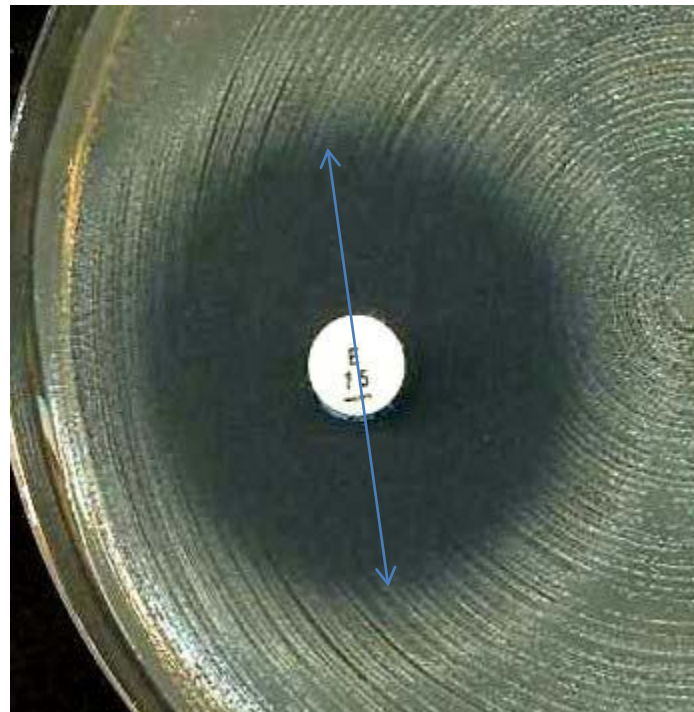


Ανάγνωση ζώνης αναστολής

- Οι ζώνες αναστολής θα πρέπει να μετρώνται στο όριο, όπου υπάρχει πλήρης αναστολή
- Η ανάγνωση γίνεται με γυμνό οφθαλμό και με το τρυβλίο σε απόσταση 30 cm από τα μάτια
- Παράδειγμα :
ciprofloxacin/*E.coli*



Ανάγνωση ζώνης αναστολής *Staphylococcus aureus* / Erythromycin



Μέτρηση ζώνης αναστολής - ΜΗ

- Μέτρηση των ζωνών αναστολής από την πίσω πλευρά σε μαύρο φόντο με ανακλών φως

-καλύτερα να απομακρύνεται το καπάκι όταν έχει υγρασία



Μέτρηση ζώνης αναστολής – ΜΗ με αίμα

- Μέτρηση της ζώνης αναστολής από την επάνω πλευρά χωρίς το καπάκι με ανακλών φως



Μέτρηση ζώνης αναστολής

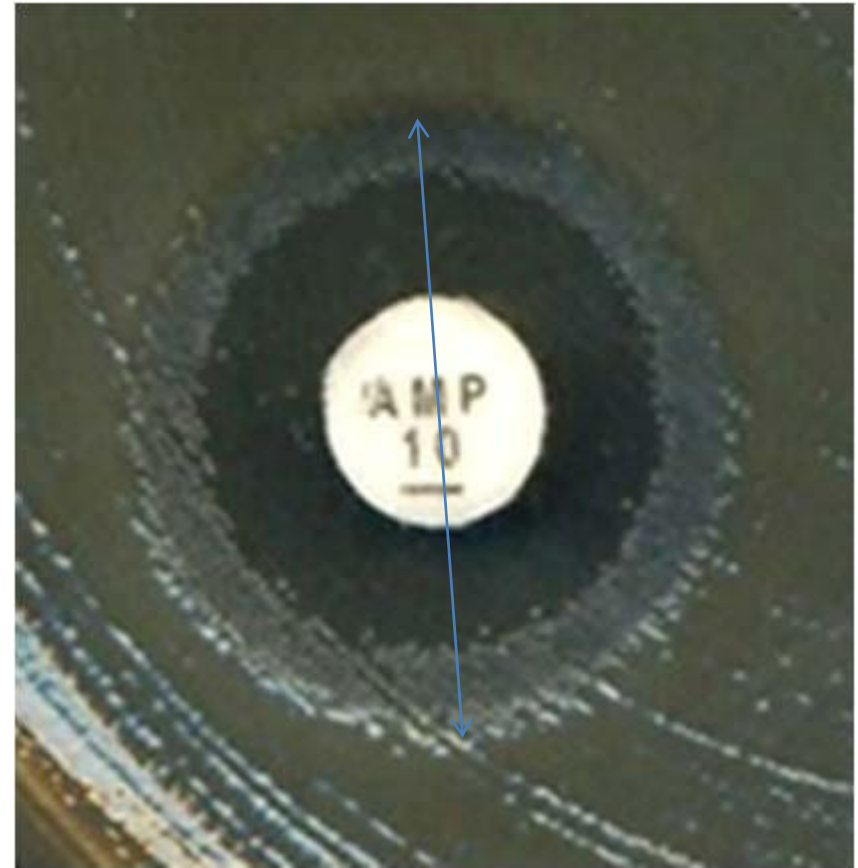
- Δεν μετρώνται οι ζώνες αναστολής απέναντι στο φως και δεν χρησιμοποιείται μεγεθυντικός φακός
- Η μέτρηση των ζωνών γίνεται με χάρακα ή παχύμετρο ή αυτόματο μετρητή
- Σε περίπτωση που υπάρχουν εμφανείς αποικίες μέσα στη ζώνη αναστολής, γίνεται ανακαλλιέργεια από τις αποικίες, ελέγχεται η καθαρότητα & εάν απαιτείται επαναλαμβάνεται η δοκιμή

Εξαιρέσεις κατά την μέτρηση των ζωνών αναστολής

Μικροοργανισμός	Αντιβιοτικό	Μέτρηση ζώνης
<i>Proteus spp.</i>	Για όλα τα αντιβιοτικά	Δεν λαμβάνεται υπόψη η εξάπλωση
<i>Streptococcus spp</i>	Για όλα τα αντιβιοτικά	Μετράται η ζώνη αναστολής & όχι η ζώνη αιμόλυσης
Όλοι οι μικροοργανισμοί	Trimethoprim Trimethoprim-sulfamethoxazole	Θα πρέπει να μην λαμβάνεται υπόψη ελαφρά ανάπτυξη μέχρι το δίσκο ($\leq 20\%$), μέσα στην ορατή ζώνη αναστολής
Enterobacteriaceae	Αμπικικιλίνη	Δεν θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ανάπτυξη , που εμφανίζεται ως εσωτερική ζώνη σε ορισμένες παρτίδες MH agar
<i>Staphylococcus spp.</i>	Cefoxitin	Θα πρέπει οι ζώνες αναστολής να ελέγχονται προσεκτικά για μεμονωμένες αποικίες

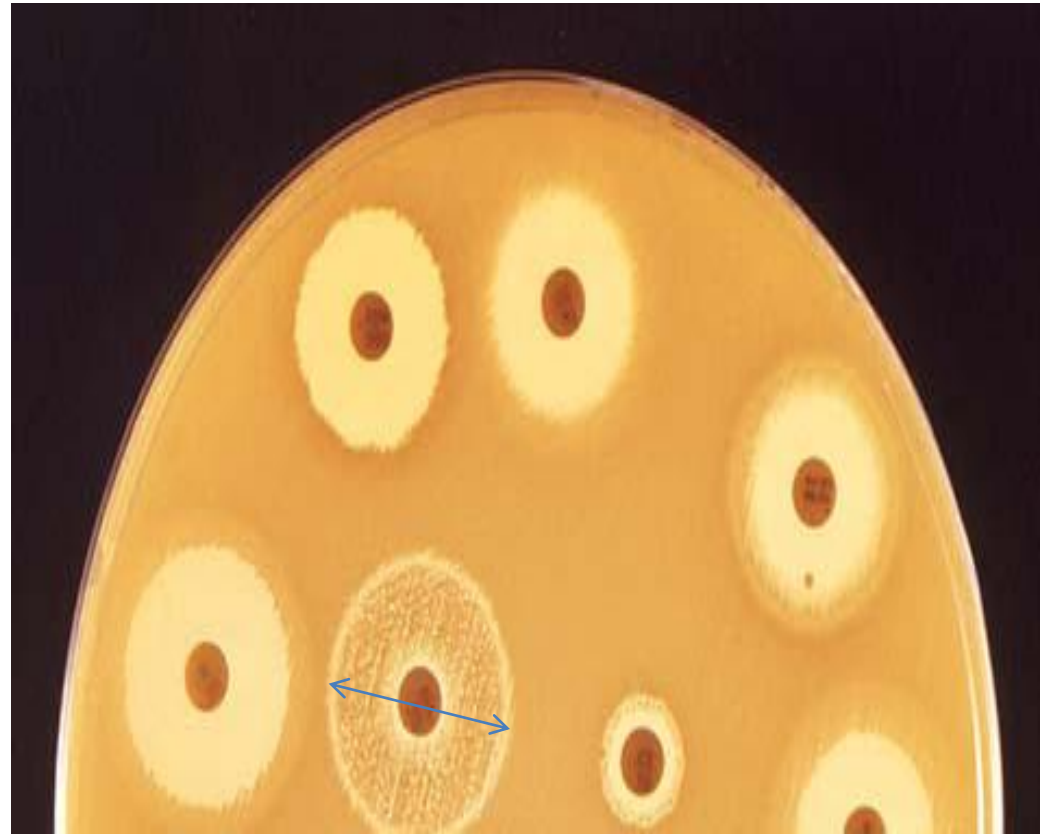
Εντεροβακτηριοειδή & αμπικιλίνη Εξαίρεση

- Σε ορισμένες παρτίδες Mueller-Hinton agar μπορεί να υπάρξει ανάπτυξη, σαν εσωτερική ζώνη, κατά την μέτρηση της ζώνης αναστολής
- Σε αυτές τις περιπτώσεις θα πρέπει να μετράται η εξωτερική ζώνη



Μέτρηση ζώνης τριμεθοπρίμης - σουλφοναμιδών

- Ελαφρά ανάπτυξη (20% ή λιγότερο της συνολικής) δεν λαμβάνεται υπόψη και μετράται το πιο εμφανές όριο για τον καθορισμό της διαμέτρου της ζώνης αναστολής



Αποτελέσματα

- Πριν εκδοθούν τα αποτελέσματα των εξεταζόμενων στελεχών, ελέγχονται οι ζώνες αναστολής των στελεχών αναφοράς, εάν είναι εντός των αποδεκτών ορίων.
- Μετρώνται οι ζώνες αναστολής (σε mm) και κατατάσσονται σύμφωνα με τους πίνακες ως ευαίσθητα, ενδιάμεσα ή ανθεκτικά στελέχη (S-susceptible, I-intermediate and R-resistant).

➤ Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals CLSI M31-A3

➤ Eucast : www.eucast.org

➤ EURL -AR : www.crl-ar.eu

Σας ευχαριστώ πολύ !