

Cuprins

1. Norme de protecție a muncii. Dotări minimale ale laboratorului de microbiologie: utilizarea corectă și circuitul probelor
2. Recoltarea și manipularea probelor biologice și patologice (sânge, urina, materii fecale, LCR, exsudat) în vederea diagnosticului de laborator
3. Metodele de distrugere a organismelor patogene. Dezinfecția. Sterilizarea. Controlul sterilizării
4. Examenul microscopic direct al preparatelor native și colorate. Tehnica realizării și colorării frotiurilor. Colorații uzuale
5. Metode de izolare și cultivare a bacteriilor. Medii de cultură uzuale.
6. Antibiograma difuzimetrică: tehnica de realizare și interpretare.
7. Determinarea CMI. Criterii de decizie asupra necesității efectuării antibiogramei
8. Identificare fungilor patogeni cu implicații în patologia dentară
9. Diagnostic serologic (depistarea și dozarea Ac) depistarea Ag microbiene. Metode specifice de identificare a microflorei dentare
10. Protozoologie: Reprezentanți (Rhizopoda, Flagelata, Sporozoa, Infuzoria); tehnici de laborator de evidențiere
11. Examenul coproparazitologic. Helmintologie –Plathelminthes
12. Helmintologie – Nematelminthes.
13. Cultivarea virusurilor. Metode de laborator în diagnosticul în infecțiilor virale
14. Evaluare finală (lucrări practice)

LP2.

NORME DE PROTECȚIE A MUNCII. DOTĂRILE MINIMALE ALE LABORATOARELOR DE MICROBIOLOGIE : UTILIZAREA CORECTĂ ȘI CIRCUITUL PROBELOR

(ORDIN nr. 1.301 din 20 iulie 2007 pentru aprobarea Normelor privind funcționarea laboratoarelor de analize medicale. EMITENT: MINISTERUL SANATATII PUBLICE PUBLICAT ÎN: MONITORUL OFICIAL nr. 617 din 6 septembrie 2007)

1. Hotă de siguranță biologică
2. Lampă UV
3. Balanță
4. Termostat (cu temperatură reglabilă)
5. Microscop binocular
6. Lupă de laborator
7. Frigider
8. Congelator (prevăzut cu încuietoare)
9. Baie de apă cu temperatură reglabilă
10. pH-metru sau indicator pH
11. Bec de gaz
12. Etuvă
13. Autoclav
14. Anse bacteriologice
15. Pipete automate
16. Termometre
17. Instalație de apă purificată*)
18. Sistem de etalonare a inoculului pentru antibiogramă.

Laboratoare de analize medicale care efectuează culturi pentru diagnosticul tuberculozei și/sau micobacteriozelor:

1. Hotă de siguranță biologică și protecție suplimentară
2. Autoclavă de laborator verticală, cu accesorii (electric sau cu gaz)
3. Balanță semianalitică (sensibilitate 1 mg)
4. Balanță pentru echilibrat tuburi de centrifugă
5. Dulapuri termostat sau cameră-termostat cu capacitate de 6-8 mc (20.000-30.000 culturi/an)
6. Centrifugă cu accesorii (reglare automată a vitezei, cronometru, dispozitiv de securitate împotriva demarajului intempestiv și protecție pentru evitarea formării de aerosoli în laborator)
7. Instalație de apă purificată*)
8. Etuvă
9. Frigider-dulap pentru medii de cultură
10. Frigider pentru prelevate
11. pH-metru
12. Sticlărie specifică de laborator
13. Anse bacteriologice
14. Bec de gaz
15. Ceas de laborator
16. Coșuri pentru păstrarea eprubetelor cu medii
17. Uscător pentru lame, cu termostat.

LP 3

RECOLTAREA ȘI MANIPULAREA PROBELOR BIOLOGICE ȘI PATOLOGICE (SÂNGE, URINA, MATERII FECALE, LCR, EXSUDAT) ÎN VEDEREA DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR

Informații generale

Recoltarea și transportul produselor patologice, etape ale diagnosticului microbiologic, sunt efectuate de către medicul clinician și/sau asistent. Rezultatele investigațiilor microbiologice depind în mare măsură de calitatea recoltării.

Ghidul trebuie cunoscut și respectat de întreg personalul deoarece rezultatul primit de la laborator reflectă calitatea recoltării. În plus, la recoltare se va ține cont și de următoarele aspecte:

- recoltarea se face după o prealabilă pregătire a pacientului; pacientul trebuie să fie informat în legătură cu analiza ce urmează a se face și cu modul corect de recoltare;
- recipientele pentru recoltare sunt sterile, de unică folosință și adaptate investigației;
- se recoltează produsul patologic înaintea administrării antibioticului;
- se recoltează din zone și în momentul în care este cel mai probabil a găsi bacteria care a produs infecția;
- probele trimise la laborator trebuie să reprezinte realul produs patologic (ex.: sputa, nu saliva etc);
- se recoltează o cantitate suficientă de produs patologic;
- în secțiile din spital suprafața pe care sunt puse recipientele cu produse patologice va fi total separată de masa de tratament;
- este obligatorie prezenta în locurile de recoltare a containerelor cu pereți rigizi pentru depozitarea temporară a deșeurilor înțepătoare;
- exteriorul recipientului trebuie dezinfectat dacă a fost contaminat în timpul recoltării;
- se notează pe recipient numele pacientului și proveniența sa, tipul produsului patologic, data și ora recoltării;
- fiecare produs patologic va fi însoțit de un buletin ce conține informații despre proba recoltată și pacient (vezi cererea de analize pentru microbiologie);
- transportul se face cât mai repede la laborator pentru a preveni degradarea produsului patologic;
- se vor folosi medii de transport care asigură o bună supraviețuire a bacteriilor.

Mai jos sunt sintetizate modul de recoltare și transport al celor mai frecvente produse patologice, în funcție de situsul anatomic.

1. Abces deschis:

- mod de recoltare - dezinfectați cu alcool etilic 70% sau betadina. Dacă este necesar, irigați leziunea cu o soluție salină non-inhibitorie. Aspirați cu o seringă sterilă (de preferat) sau profund din leziune cu un tampon steril.
- cantitate - > 1 ml sau 2 tamponane din același loc.
- transport - < 2 ore.
- observații - se recomandă recoltarea cu seringă sterilă prin aspirație sau biopsie. Dacă se recoltează cu tamponul, este obligatorie recoltarea a două tamponane din profunzimea leziunii (1 tampon pentru însămânțare și 1 tampon pentru frotiul Gram). Se va folosi mediul de transport Stuart sau Amies. Sistemul anaerob de transport este obligatoriu pentru a asigura supraviețuirea bacteriilor anaerobe implicate în procesul infecțios. Aceleași recomandări la recoltare se aplică pentru: vezicule, pustule, plăgi, furuncule, arsuri, ulcere de decubit, fistule etc.

2. Abces închis:

- mod de recoltare - aspirați cu o seringă sterilă. Transferați imediat tot materialul într-un sistem anaerob.
- cantitate - > 1 ml.

- transport - < 2 ore, sistem anaerob de transport.
- observații - în caz de gangrenă se recolteaza și hemocultura în același timp.

3. Cavitate bucală:

- mod de recoltare - curatați cu grijă marginea gingiei și suprafața dintelui, pentru a îndepărta saliva și resturile alimentare. Folosiți un scaler periodontal și îndepărtați secreția din leziuni. Transferați aseptice într-un sistem anaerob de transport.
- transport - sistem anaerob de transport < 2 ore.
- observații - leziunile periodontale trebuie procesate numai în laboratoarele dotate pentru izolarea și identificarea agenților specifici.

4. Exsudat nazal: - mod de recoltare - umeziti tamponul in ser fiziologic steril. Insetati 2 cm si rotiti tamponul.

- cantitate - un tampon pentru fiecare nara.
- transport - < 2 ore.
- observatii - exsudatul nazal este recomandat in principal pentru depistarea purtatorilor de *Stafilococcus aureus*.

5. Exsudat faringian:

- mod de recoltare - deprimati baza limbii cu un apasator steril. Stergeti cu tamponul ferm, dar nu brutal, amigdalele si peretele posterior al farigelui - zone inflamate, ulcerate, depozite purulente.
- cantitate - un tampon.
- transport - < 2 ore.
- observatii - recoltarea se face inainte de ingestia alimentelor sau toaleta cavitatii bucale. Se evita atingerea tamponului de baza limbii sau palatul moale. Se va preciza in biletul de trimitere suspiciunea clinica de candidoza. Se recolteaza doua tamponuri de la nivelul depozitului pseudomembranos. Se va preciza in biletul de trimitere suspiciunea clinica de angina si stomatita Vincent. Se vor recolta doua tamponuri din acelasi loc. Se va preciza in biletul de trimitere daca identificarea *S.aureus* este in scop epidemiologic (purtator).

6. LCR:

- mod de recoltare - dezinfectati cu betadina, 3 badijonari succesive; respectati timpul de actiune al antisepticului.
- transport - < 15 minute.
- observatii - se recolteaza concomitent si hemocultura.

7. Materii fecale - Coprocultura:

- mod de recoltare - coprorecoltor cu mediul de transport CARY BLAIR.
- cantitate - 5-10 g.
- transport - < 1 ora (daca nu se recolteaza in recipient cu mediul Cary Blair).
- observatii - recoltarea se face inaintea inceperii tratamentului cu antibiotice. Din scaunul proaspat emis se recolteaza portiuni cu mucus, sange. Cand acestea lipsesc, se recolteaza boluri fecale din trei locuri diferite. Prelevare cu sonda Nelaton: se adapteaza o seriga cu care se fac 1-2 aspiratii. Tampon rectal: tamponul se umezeste in solutie salina izotona (nu geluri lubrifiante!), se introduce prin sfincterul anal 1,5 cm prin rotire lenta. Mentionati suspiciunea clinica pentru care solicitati coprocultura.

8. Ochi - conjunctiva:

- mod de recoltare - cate un tampon separat pentru fiecare ochi. Tamponul este umezit in ser fiziologic steril. Rotiti tamponul si insamantati-l direct pe mediile de cultura.
- transport - insamantare directa pe mediile de cultura (chocolate, geloza-sange), frotiuri pentru examenul microscopic direct. Placile insamantate se trimit la laborator < 15 min.
- observatii - se recolteaza inainte de: toaleta fetei, terapie antimicrobiana topica sau sistemica. Se recolteaza de la nivelul ambelor conjunctive. Ochiul neinfestat serveste drept control. Insamantarea se face imediat, majoritatea germenilor avand viabilitate redusa.

9. Ochi - corneea:

- mod de recoltare - raclat din mai multe arii ale ulcerului cornean. Solutie anestezică locală.
- transport - însămânțare directă pe mediile de culturi (BHI, chocolate), frotiuri pentru examenul

microscopic direct. Placile însamantate se trimit la laborator < 15 min.

10. Sange - hemocultura:

- mod de recoltare - dezinfectati locul venopunctiei cu betadina, 3 badijonari succesive, concentric, din centru spre periferie. Permeteti antisepticului sa actioneze. Nu palpați locul venopunctiei. Indepărtați iodul cu alcool 70%.

- transport - flacoane pentru sistemul automat (ex.: BactAlert). Dezinfectați capacele de cauciuc cu alcool 70%. Inoculați fiecare flacon fără a depasi semnul de pe eticheta. Transportati imediat.

- observatii - Sepsis acut: 3 seturi, 3 venopunctii separate, la interval de 10 minute, inainte de a incepe antibioticoterapia. Endocardita acuta: 3 seturi, 3 venopunctii separate in primele 1-2 ore de evolutie; incepeti terapia. Endocardita subacuta: 3 seturi, 3 venopunctii separate la interval de 15 minute in prima zi. Daca rezultatul la 24 ore este negativ, recoltati inca trei seturi. Endocardita în timpul tratamentului cu antibiotice: 3 seturi, 3 venopunctii separate, zilnic, 3 zile succesiv. Se recolteaza imediat inaintea inceperii urmatoarei doze de antibiotic. Nu se recolteaza cand concentratia serica a antibioticului este maxima. Febra de origine necunoscuta: 2-3 seturi, venopunctii separate la cel puțin o ora interval. Daca rezultatul la 24-36 ore este negativ, se repeta recoltarea. **NU SE RECOLTEAZA DE LA NIVELUL CATETERULUI !!!**

11. Sputa:

- mod de recoltare - se va efectua periajul dinților, clătirea energică a gurii și gargară cu apă. Pacientul tușeste și expectorează într-un recipient steril (cu gatul larg și cu un capac care se inchide ermetic).

- cantitate - > 3 mL.

- transport - < 2 ore.

- observatii - se recolteaza sputa sub directa indrumare a asistentei. Se explica pacientului diferenta dintre a expectora și a scuipa. Sputa se recoltează dimineața când pacientul face “toaleta bronhiilor”.

12. Secreție traheală:

- mod de recoltare - secreție aspirată în recipient steril.

- cantitate - > 3 mL.

- transport - < 2 ore.

- observatii - se aspira cu ajutorul unei sonde de unica folosinta, atraumatic, aseptice. Se va efectua preoxigenarea bolnavului cu fracție inspiratorie $Fi O_2 = 1$, timp de trei minute.

13. Ureche - secreție otică internă:

- mod de recoltare - timpan perforat: se colecteaza fluidul cu un tampon flexibil cu ajutorul unui speculum auditiv.

- cantitate - tampon cu mediu de transport sau sistem anaerob. Obligativ se recolteaza două tampoane din acelasi loc.

- transport - < 2 ore.

- observatii - in cazul secreției aspirate sau biopsiei se foloseste sistemul de transport anaerob. Culturile de la nivel nazofaringian sau exsudat faringian nu sunt predictive pentru agenții etiologici în otita medie.

14. Ureche - secreție otică externă:

- mod de recoltare - cu un tampon umezit se curăță conductul auditiv extern. Cu un al II-lea tampon se recoltează prin rotire fermă.

- cantitate - obligativ se recolteaza 2 tampoane.

- transport - < 2 ore.

- observatii - pentru secreția otică externă se va efectua rotirea riguroasă a tamponului.

15. Urina - urocultura:

- mod de recoltare - toaleta locala riguroasă cu apa și sapun. Spălați mâinile. Recoltați din jetul mijlociu, fără intreruperea fluxului. Nu contaminați recipientul.

- transport - recipient steril cu gâtul larg (exclus eprubete), se transporta în < 2 ore.

- observatii - prima urina de dimineata sau la cel puțin 4 ore de la ultima micțiune; înaintea începerii tratamentului cu antibiotice. In cazul urmării eficienței tratamentului cu antibiotice, recoltarea se

repetă după 48-96 ore. Dacă fiind intermitența în eliminare, se recomandă 3 recoltări succesive. Controlul se va efectua după 3-5 zile de la întreruperea tratamentului.

16. Urina - cateter vezical:

- mod de recoltare - dezinfectați cu alcool 70% capatul distal al cateterului. Recoltați cu ac și seringă sterile.
- cantitate - 5 mL.
- transport - < 1 ore (urocultor steril).
- observații - menținerea sistemului de drenaj în circuit închis. Nu se desface jonctiunea cateter - tub drenaj pentru recoltare. Nu se colectează din sacul colector pentru urocultură. Din seringă se trece urina în urocultor în condiții aseptice.

17. Tract genital feminin - vaginite:

- mod de recoltare - secreția acumulată în fundul de sac vaginal posterior este detașată cu ajutorul unei valve.
- cantitate - 3 tamponane și 2 lame.
- transport - < 2 ore.
- observații - în cazul suspiciunii infecției cu *Trichomonas vaginalis*, un tampon se umezește în tub steril cu 1 ml soluție salină izotonă (37°C), pentru examen microscopic (preparat proaspăt între lamă-lamelă).

18. Tract genital feminin - endocervicite:

- mod de recoltare - ștergeți suprafața exocolului cu 2-3 comprese sterile pentru a îndepărta secrețiile stagnante. Recoltați prin rotirea ușoară a 2 tamponane introduse succesiv în endocol.
- cantitate - un tampon și 2 lame - sistem anaerob de transport.
- transport - < 2 ore.
- observații - tamponul cu mediul de transport se folosește pentru însămânțare. Lamelele se folosesc pentru examenul microscopic colorat.

19. Tract genital feminin - bartolinite:

- mod de recoltare - prelevați secreția purulentă de la nivelul orificiului conductului glandular.
- cantitate - > 1 mL.
- transport - sistem anaerob.

20. Tract genital feminin - endometrite:

- mod de recoltare - badijonați cu alcool iodat exocolul și canalul cervical; introduceți un cateter; aspirați lichidul endometrial.
- observații - puroiul aspirat prin puncție (abcès) se însămânțează pe medii aerobe și anaerobe.

21. Tract genital masculin - uretra:

- mod de recoltare - prelevați pe tampon scurgerea uretrala spontană sau provocată. Prelevați intrauretral cu tamponul: introduceți blând tamponul, rotiți-l, lăsați-l două secunde și retrageți-l.
- cantitate - tampon cu mediu de transport - două lame pentru examenul microscopic.
- transport - < 2 ore.
- observații - examinarea uretrei și prelevarea probelor se fac la cel puțin două ore după micțiune. Pacienții cu scurgere discretă vor reduce lichidele până în ziua următoare și prelevarea se face înainte de micțiunea matinală. În cazul suspiciunii infecției cu *Trichomonas vaginalis*, prelevarea se va face înaintea micțiunii matinale; tamponul se umezește în tub steril cu 1 ml soluție salină izotonă (37°C), pentru examen microscopic fără întârziere. Probele destinate cultivării gonococilor se însămânțează imediat pe medii speciale, la 37°C.

22. Tract genital masculin - prostata:

- recoltați secreție pe tampon sau în recipient steril.
- cantitate - tampon cu mediu de transport - două lame pentru examenul microscopic.
- transport - < 2 ore.
- observații - sunt relevante probele obținute imediat înainte și după masajul prostatic.

Transportul probelor

Timpul de transfer al probelor către laborator poate fi:

- scurt, când locul de recoltare/clinica este în același loc cu laboratorul;

- mediu, cand locul de recoltare/clinica este in aceeasi localitate cu laboratorul, dar nu in acelasi loc;
- lung (24 ore sau mai mult), cand locul de recoltare/clinica este in alta localitate decat laboratorul si se trimit probele prin posta sau curieri. Aceasta situatie se intalneste mai des in cazul trimiterii probelor pacientilor de la studiile clinice, cand toate probele se colecteaza intr-un laborator de la pacientii situati in centre diferite, localizate geografic diferit.

Exista mai multe tipuri de transport al probelor, in functie de natura produsului si de stabilitatea analitilor care trebuie testati:

- transport in conditii ambientale;
- transport la rece (probe refrigerate);
- transport in gheata carbonica (probe congelate).

Stocarea probelor in laborator

Dupa incheierea procesului analitic, o parte din probe vor fi pastrate o anumita perioada de timp, in conditii bine stabilite, astfel incat sa permita confirmarea rezultatelor, verificarea identitatii probelor sau efectuarea unor teste suplimentare.

Reguli generale:

- procedura de stocare a probelor trebuie să țină cont de stabilitatea analiților;
- probele trebuie intotdeauna să fie păstrate în tuburi închise (pentru a evita evaporarea acestora);
- probele pot fi arhivate in frigidere in tuburile primare, cu conditia ca acestea sa contina gel separator;
- in congelatoare probele sunt pastrate de obicei in tuburi secundare; este posibila arhivarea si in tuburile primare care contin gel, daca producatorul specifica acest lucru;
- se va evita pe cat posibil stocarea sangelui integral; oricum sangele integral destinat obtinerii serului/plasmei nu trebuie pastrat in frigider;
- intervalul de pastrare a probelor este cu atat mai mare cu cat temperatura de arhivare este mai scazuta (exceptii: probele pentru electroforeza lipoproteinelor si determinarea de apolipoproteine A1 si B nu trebuie pastrate la congelator);
- dupa decongelare proba trebuie omogenizata prin miscari de inversiune a tubului, fara a se produce spuma; evitati decongelarea – recongelarea.

LP3

Metodele de distrugere a organismelor patogene. Dezinfecția. Sterilizarea. Controlul sterilizării

Factorii fizici, chimici și biologici acționează asupra microorganismelor în funcție de:

- caracterul speciei,
- compoziția chimică și faza de dezvoltare (vârsta culturii),
- structura microorganismului (formă vegetativă, sporulată sau capsulă),
- densitatea suspensiei bacteriene.

Efectul acțiunii acestor factori este determinat de:

- concentrația și timpul de expunere ;
- concentrația ionilor de H (pH);
- fenomenul de adsorbție sau desorbție.

Efectul poate fi:

- stimulator,
- oprirea multiplicării (bacteriostatic),
- distrugerea bacteriilor (bactericid).

Decontaminarea microbială este sterilizarea prin căldură umedă, prin căldură uscată sau radiații.

Dezinfecția este distrugerea formelor vegetative ale microorganismelor, dar nu în mod necesar și a sporilor. Sterilizarea este distrugerea sau îndepărtarea tuturor microbilor inclusiv a sporilor.

STERILIZAREA

În laboratorul de microbiologie sterilizarea se obține prin următorii agenți:

❖ **Căldură uscată**

- încălzire la roșu,
- flambarea,
- incinerarea,
- aer cald.

❖ **Căldură umedă**

- peste 100⁰C (autoclavare),
- sub 100⁰C (pasteurizare, tindalizarea);

Filtrare.

Radiatii ultraviolete.

Radiatiile gamma și X.

Microunde.

► **Sterilizarea prin căldură uscată**

- **Încălzirea la roșu** - este indicată pentru firul drept, ansa și spatula de însămânțare.
- **Flambarea** - este înfierbântarea obiectului de sterilizat prin trecerea repetată prin flacără, timp de câteva secunde și se recomandă pentru: capilarele pipetelor Pasteur, gura eprubetelor și a flacoanelor.
- **Incinerarea** - este arderea cu reducere la cenușă. În laboratorul de microbiologie este indicată pentru material din plastic, reziduuri organice solide, gunoiul, cadavrele și carcacele animalelor de experiență. Această metodă pune probleme de control al poluării mediului și siguranței microbiologice.

► **Sterilizarea prin aer cald**

- **Etuva** (poupinelul)
- Este o incintă cilindrică sau paralelipipedică cu pereți dubli din tablă, termoizolanți.
- Rezistența electrică și un termostat permit menținerea constantă a temperaturii selectate, uniformizată în incinta de sterilizare printr-un sistem de ventilație.
- Obiectele de sterilizat se așează pe rafturi din sită metalică.

Procedură:

- Se așează obiectele pentru sterilizare pe rafturi, fără a umple incinta, până la refuz, se lasă mici spații între ambalaje, pentru circulația nestingerită a aerului cald.
- Se închide ușa aparatului, se deschid orificiile de ventilație și se conectează aparatul la rețeaua electrică. Etuvele mari au ventilator cu palete, care pornește odată cu rezistența electrică.
- Se monitorizează timpul de sterilizare din momentul când temperatura arată 160°-180°C, care este de o oră.
- Se scot obiectele sterilizate numai după răcirea aparatului.

Indicatii:

- obiecte de laborator din sticlă (eprubete), flacoane, pipete, plăci Petri;
- obiecte din porțelan (mojar, pistile),
- seringi Luer din sticlă,
- instrumentar chirurgical,
- substanțe grase, pulberi.

Contraindicații:

- soluții apoase,
- obiecte din cauciuc sau garnituri din cauciuc,
- seringi din sticlă cu metal,
- țesături și vată din bumbac sau fibră sintetică,
- materiale contaminate din laborator.

► Sterilizarea prin căldură umedă

Sterilizarea la peste 300°C

Se utilizează autoclave în care vaporii de apă saturați realizează:

- 115°C corespunde la 0,5 atm
- 121°C corespunde la 1 atm
- 134°C corespunde la 2 atm

• Autoclavul

Este un cazan cu pereți rezistenți în care, după închiderea etanșă cu un capac masiv, presat cu buloane sau un sistem cabeston, vaporii de apă se comprimă la presiunea necesară sterilizării. Acestea pot fi verticale sau orizontale și sunt indicate pentru sterilizarea soluțiilor și materialelor contaminate din laborator. Se mai sterilizează sticlărie pentru culturi de celulă și aparatele de filtrare.

Vaporii provin din apa aflată în cazanul de presiune și pătrund în camera de sterilizare de jos în sus prin suportul de tablă perforată pe care se așează obiectele de sterilizat. Un manometru controlează presiunea din interiorul cazanului. Un robinet de vaporii, aflat în partea superioară a autoclavului, pune în legătură cazanul cu exteriorul. Al doilea robinet, aflat la partea inferioară, permite evacuarea apei din cazan. O supapă de siguranță evacuează vaporii când presiunea lor depășește limita de securitate. Cazanul este cuprins într-un manșon de tablă groasă, care la partea inferioară formează un loc pentru adaptarea sursei de căldură, sau poate fi conectat la o sursă de curent

Procedura

1. Se toarnă apă în cazan prin incinta de sterilizare, până la 2-3 cm sub nivelul suportului.
2. Se așează pe suport obiectele de sterilizat, în ambalajul lor.
Ambalajele sunt: flacoane, eprubete, coșuri pentru eprubete, flacoane mici, cutii, casolete, hârtie pentru împachetarea unor obiecte, găleți sau saci termorezistenți, pentru materialul de laborator contaminat.
Se introduc flacoanele cu capacul semiînșurubat cutiile întredeschise, casoletele cu orificiile deschise, gălețile fără capac.
3. Se închide etanș capacul strângând buloanele diametral opus în cruce, întâi cu mâna, apoi complet cu pârghie.
4. Se conectează la sursa de căldură.
5. Se deschide robinetul pentru evacuarea aerului.
6. O dată cu vaporii de apă, prin robinetul deschis, se evacuează și aerul din incinta de sterilizare, asigurând o convecție puternică: vaporii în contact cu obiectele reci cedează căldura și se condensează presiunea lor tinde să scadă și atrage altă cantitate de vaporii care transportă și cedează căldura ș.a.m.d.

Aerul este complet evacuat din incinta de sterilizare, când încetează să mai barboteze apa.

7. Închide robinetul de evacuare a aerului.

8. Când presiunea ajunge la valoarea aleasă se reglează sursa de căldură pentru a menține presiunea pe toată durata sterilizării.

9. Se întrerupe sursa de căldură și lasă aparatul să se răcească până când manometrul indică zero atmosfere. Numai în acest moment deschide lent robinetul de vapori, apoi cazanul.

10. Nu se deschide autoclavul cât timp presiunea este peste cea atmosferică pentru că lichidele fierbinti vor fierbe exploziv și se pot sparge flacoanele.

11. Lasă materialele pentru uscare în autoclavul deschis, când materialele ajung sub 80°C pot fi scoase. Aceasta durează în funcție de volumul ambalajelor și vâscozitatea soluțiilor. Flacoanele mari cu mediu agarizat pot necesita și câteva ore.

Dezavantaje în ambalaje pot persista pungi de aer, cantitatea mare de condens în timpul sterilizării, uscarea dificilă după sterilizare impune o serie de precauții (evitarea contactului cu obiecte ambalate în hârtie cu suprafețe nesterile, până la perfecta uscare a ambalajului).

► **Pasteurizarea**

Este o metodă de sterilizare parțială, prin care se distrug numai formele vegetative, deoarece utilizează temperaturi puțin ridicate și de scurtă durată:

- 65°C pentru 30 min,
- 80-90°C pentru 1-2 min,
- 91-95°C pentru câteva secunde.

Scăderea temperaturii se face brusc. Acest procedeu se folosește la sterilizarea laptelui, unde distruge formele vegetative fără a provoca alterarea vitaminelor, a enzimelor, a proteinelor.

► **Tindalizarea** (sterilizarea fracționată) este încălzirea la temperaturi de sub 100°C.

Principiu: în medii ce permit germinarea sporilor, încălzirile repetate omoară atât formele vegetative existente inițial cât și pe cele germinate din spori în intervalele dintre încălziri.

Indicații: sterilizarea unor medii de cultură, alimente.

Necesar:

- autoclav pentru tindalizare la sub 100°C, în vapori fluenți (autoclav cu robinetul pentru vapori deschis);
- boia de apă sau nisip pentru tindalizări sub 100°C.

Procedură:

Substanțele de sterilizat în volume mai mici de 1 litru, se mențin 30-60 min la 80-90°C, 3-8 zile consecutiv, la temperatura impusă de compoziția lor. În intervalele dintre încălziri, recipientele se țin la temperatura camerei pentru germinarea sporilor.

► **Filtrarea** este trecerea unui fluid printr-un corp poros. Filtrele cu porozități convenabile pot debarasa de microorganisme fluidul filtrat, acestea fiind reținute mecanic și electrostatic în porii filtrului. Se recomandă pentru sterilizarea aerului, a unor medii de cultură sau reactivi care nu suportă încălzire.

Filtrele clasice sunt sub forma unor

- lumânări goale pe dinăuntru și închise la capăt (bujii filtrante), confecționate din porțelan (filtre Chamberland), sau
- pământ de infuzorii (filtre Berkefeld)
- plăcile filtrante din azbest impregnat cu caolin (filtre Seitz)
- sticlă poroasă (filtre Schott)
- membrane filtrante din acetat de celuloză cu porozități între 1 și 0,025 μm.
- O membrană cu porozitatea de 0.22 μm reține toate bacteriile.
- Aceste membrane sunt fixate pe un suport perforat din oțel inoxidabil și montate în partea superioară și inferioară a unei pâlnii adaptate la sistemul de filtrare negativă și pozitivă.
- Membrana împreună cu pâlnia montate la recipientul de colectare a fluidului filtrat sunt sterilizate în prealabil în autoclav.
- Filtrele HEPA (High Efficiency Particulate Air Filters) sunt folosite pentru sterilizarea aerului din boxele de siguranță antiepidemică, a celor cu aer laminar etc.

► **Sterilizarea prin radiații ultraviolete (UV)**

Se mai numesc și lămpi germicide sunt tuburi din sticlă specială în care descărcările electrice într-o atmosferă cu vapori de mercur, la joasă presiune; generează radiații UV. Cantitate de ozon produsă de lămpile germicide din spitale și laboratoare nu depășește concentrația periculoasă de o parte la 10 milioane și scade progresiv cu vârsta lămpii. Viața de funcționare a lămpilor germicide uzuale este de 100 ore, dar scade după aprinderi frecvente. Când intensitatea radiației UV produse scade sub 60% din cea nominală, după și din timpul prevăzut, lămpile trebuie schimbate.

Lămpi germicide. Sunt preferate lămpile speciale cu catod rece care au o viață mai lungă. Pentru a menține efectul germicid maximal, lămpile trebuie periodic curățate prin ștergere cu o cârpă moale umezită în alcool, amoniac și apă.

Aceste lămpi se recomandă pentru:

- reducerea încărcăturii microbiene a spațiilor de lucru,
- bariere protectoare între aria cu animale inoculate, boxele de necropsie și persoanele din laborator sau animalele sănătoase,
- laboratoarele care nu au hote le pot folosi pentru repartizarea mediilor de cultură, manipulării aseptice,
- suprafețe din laborator, nu în timpul lucrului.

► **Radiațiile gamma și X.** Sunt radiații ionizante foarte eficiente pentru sterilizare; trebuie să fie folosite cu prudență pentru că pot distruge și celulele umane. Aceste radiații generează radicali liberi, care reacționează chimic cu proteinele și acizii nucleici provocând moartea bacteriei.

► **Microundele** se utilizează pentru reesterilizarea mediilor de cultură care au fost depozitate timp îndelungat; sterilizarea rezultă mai degrabă din căldura produsă de microunde, decât ca un efect direct al lor.

► **Ultrasunetele** sunt bactericide prin fenomenul de cavitație pe care îl produc la trecerea prin apa extra- și intracelulară, determinând dezagregarea structurii bacteriene.

Controlul eficienței sterilizării

Se face prin indicatori: fizici (manometre, termometre), chimici și biologici.

Indicatori chimici pentru sterilizarea prin căldură

Se folosesc substanțe chimice al căror punct de fuziune este cunoscut la care aspectul substanței se schimbă exemplu: floare de sulf 115°C, tiouree 180°C, acid benzoic 121-122°C.

Indicatori biologici

- Fire de bumbac impregnate cu spori de *Bacillus stearothermophilus* (pentru etuve) sau fiole cu suspensie *B. stearothermophilus* (pentru autoclave) au o mai mare fidelitate. După sterilizare se testează viabilitatea sporilor prin însămânțarea lor în medii adecvate.
- Testul Bowie & Dick indică puterea de penetrare a aburului în timpul procesului de sterilizare. Conform legislației în vigoare acest test este obligatoriu pentru autoclave, înainte de efectuarea primei sterilizări. Utilizare: zilnic dacă se sterilizează doar textile; cel puțin o dată pe săptămână dacă se sterilizează și instrumentar; după fiecare reparație a sterilizatorului. Indicatorul din mijlocul pachetului trebuie să vireze uniform și pe toată suprafața schimbându-și culoarea. Se realizează un ciclu de sterilizare complet (cu pre- și postvacuumare) la temperatura de 134°C, timp de 3,5 min. Dacă penetrarea aburului nu a fost uniformă, au existat punji de aer, culoarea benzilor este neuniformă (apar pete mai clare), în această situație, sterilizarea nu a fost eficientă, autoclavul nu trebuie utilizat și se apelează la tehnician pentru verificare. La sfârșitul ciclului complet de sterilizare se extrage din pachet testul și se interpretează rezultatul. Dacă ciclul a fost eficient (absența aerului rezidual sau a pungilor de aer), schimbarea culorii modelului geometric imprimat este uniformă.

DEZINFECȚIA

Este procedeul prin care se distruge microorganismele patogene, fără a fi necesară distrugerea germenilor saprofiți. În laboratorul de microbiologie sunt folosite substanțe chimice pentru dezinfecția: mâinilor, dușumelelor, meselor, cuștilor de animale și a unor produse patologice (sputa, fecale).

Aceste substanțe se numesc:

- **dezinfecțante**, dacă din cauza efectelor iritante sau toxice se pot aplica numai pe suprafețe inerte

- **antiseptice**, dacă toxicitatea este mai redusă, permite aplicarea lor pe tegumente, unele mucoase sau plăgi. Uneori aceeași substanță (cloramina B) în soluții diluate este antiseptic, iar în soluții concentrate este dezinfectant.

Cele mai sensibile la substanțele dezinfectante sunt:

- organismele sub formă vegetativă (bacterii, fungi, protozoare);
- virusurile cu înveliș lipidic;

Relativ rezistente sunt: micobacteriile, virusurile nude.

Rezistente sunt: endosporii bacterieni, sporii fugici.

Un dezinfectant trebuie să îndeplinească următoarele condiții: să acționeze asupra unui număr cât mai mare de agenți patogeni; să producă inactivitatea ireversibilă a germenilor într-un timp cât mai scurt și să acționeze cât mai independent de condițiile de mediu; să fie cât mai stabil, să-și păstreze calitățile cât mai mult timp în condiții obișnuite; să fie ușor de manipulat, ieftin, să nu fie inflamabil sau explozibil.

În laboratorul de microbiologie se folosesc:

❖ Formolul (soluție de aldehydă formică 40 % în apă). Este toxic asupra bacteriilor (forme vegetative și spori), a virusurilor; se folosește sub formă de: vapori (dezinfectia camerelor), lichidă (prin stropire, pulverizare cu vermorelul) sau prin îmbibare (o parte formol comercial 40% și H₂O).

❖ Alcoolul etilic. Alcoolul dublu rafinat (96^o alcoolice) are o acțiune dezinfectantă slabă, coagulează rapid albuminele din mediu care formează astfel un strat protector pentru bacterii. Alcoolul de 70^o acționează mai lent, mai profund și se folosește pentru dezinfectia: mâinilor, instrumentelor. El poate fi obținut din 100 ml alcool de 96^o și 400 ml AD.

❖ Fenolul în stare pură sunt cristale incolore care devin roșietice în contact cu aerul, din cauza oxidării. Se păstrează în vase brune în concentrație de 3-5 %, omoară microbii în 36-60 min. Puterea dezinfectantă a unor substanțe chimice se exprimă în comparație cu cea a fenolului, stabilinduse „indicele fenolic”.

❖ Amestecul sulfocromic trebuie să fie nelipsit de pe masa de laborator, pentru sterilizarea pipetelor, lamelor contaminate. După utilizare amestecul se oxidează, din roșu-portocaliu, devine verde, în acest caz trebuie schimbat.

❖ Sublimatul (bicromura de mercur) este o sare slabă, cristalină, incoloră are putere bactericidă în soluție de 1% este bactericid în 1-10 min, iar în sol. 1/500, omoară formele sporulate în 45-60 min, nu alterează tegumentele și mobilierul, nu este toxic pentru om și animale.

❖ Varul cloros este o pulbere grunjoasă albă, cu miros puternic de clor. Când este proaspăt conține 25% clor. Se adaugă 200-400g var în fiecare kg de spută sau fecale. Se poate obține laptele de var sol. 10%, se folosește pentru dezinfectia sputei, cuști de animale, etc.

❖ Cloramina este o pulbere fină, cristalină, albă, ușor gălbuie cu miros de clor activ. În concentrație de 0,1-5%, distruge sporii, iar 5-10 % pentru distrugerea bacilului Koch.

❖ Apa oxigenată (H₂O₂) sau peroxidul de hidrogen are putere bactericidă prin eliberarea de O₂, se utilizează în concentrația de 3%.

❖ Bazele tari ca hidroxidul de sodiu 2-4%, omoară bacteriile, virusurile

❖ Săpunurile sunt săruri de sodiu ale unor acizi grași, ele acționează prin emulsionarea grăsimilor și îndepărtarea mecanică a murdăriei.

❖ Detergenții au acțiune bactericidă și de emulsionare, se folosesc pentru materialele de laborator, înlocuind săpunul.

○ anionici dau prin disociere, anioni organici toxici, activi mai ales pe bacterii Gram pozitive, pentru spălarea: instrumentarului, a aparatului, pardoselelor, mobilierului, tesăturilor.

○ cationici au acțiune antiseptică mai puternică decât a celor anionici, ex. bromocetul, dezinfectant în sol. 1% și antiseptic în sol. 1‰ .

○ amfolitici se folosesc în sol. apoasă 1% , pentru dezinfectia instrumentarului de laborator, a mobilierului.

LP 4

Examenul microscopic direct al preparatelor native și colorate. Tehnica realizării și colorării frotiurilor. Colorații uzuale

I. Examenul preparatelor native

Preparatele native (umede, necolorate) se pot face dintr-o cultura microbiana sau direct din produs. Ele sunt examinate, de regulă, între lama și lamelă. Se ia cu ansa sau cu o pipeta Pasteur o picatura din cultura lichida sau din cultura suspensionata in solutie salina fiziologica si se depune pe o lama curata si degresata, peste care se pune o lamela curata.

Pentru examinare se plaseaza preparatul nativ pe platina microscopului, se centreaza lumina, se inchide mult diafragma, se coboara condensatorul si se aduce in dreptul preparatului un obiectiv uscat. Se apropie mult de preparat lentila frontala a obiectivului cu ajutorul macrovizei, dupa care se ridica treptat obiectivul pana la aparitia imaginii, care este pusa la punct cu ajutorul vizei micrometrice.

Pe preparatele native sunt evidentiate existenta, forma si mobilitatea microorganismelor (care nu trebuie confundata, inasa, cu miscarile browniene).

Dupa examinare, preparatele care contin germeni vii trebuie puse intr-un cristalizator cu amestec sulfocromic.

Preparatele native pot fi examinate si pe fond intunecat, precum si prin procedeul contrastului de faza.

II. Examenul preparatelor colorate

Preparatele colorate prezinta avantajul ca sunt sterilizate prin fixare, sunt usor de manipulat si de examinat si pot fi pastrate mult timp. Aceste preparate permit diferentierea bacteriilor dupa afinitatea lor pentru anumiti coloranti si pot evidentia unele elemente structurale (cili, capsula, spori, granulatii, etc.) prin coloratii speciale.

Examinarea preparatelor colorate se face astfel: se centreaza lumina, se ridica condensatorul, se lasa diafragma deschisa si se pune o picatura de ulei de cedru pe frotiu.

Cu ajutorul macrovizei se coboara tubul optic si se introduce lentila frontala a imersiei in ulei de cedru pana in imediata apropiere a frotiului. Punerea la punct se face cu ajutorul vizei micrometrice, iar deplasarea lamei pentru schimbarea campurilor microscopice se obtine cu ajutorul carului mobil.

Dupa examinare se ridica obiectivul, se sterge uleiul de cedru de pe imersie si se scoate lama de pe platina microscopului.

Coloranți și metode de colorare

Colorantii folositi in mod curent in bacteriologie sunt substante organice, de obicei colorate, usor solubile, de cele mai multe ori sintetice, avand proprietatea de a colora diferite substraturi chimice.

Pentru a fi colorate, bacteriile sunt, in prealabil, supuse unor operatii pregatitoare.

Pregatirea frotiului. Frotiul se prepara prin etalarea produsului de examinat pe o lama curata si perfect degresata, astfel inacat germenii sa formeze un strat subtire, uniform. Etalarea culturii sau a produsului se realizeaza cu ajutorul unei anse de platina sau al unei pipete Pasteur. Se ia o picatura din cultura lichida si se intinde circular pe lama. Cand cultura este pe mediu solid, se racleaza cu ansa sterilizata si racita o prtiune din cultura si se depune pe o lama de sticla, pe care, in prealabil, s-a pus o picatura de solutie salina fiziologica, dupa care se omogenizeaza si se raspandeste uniform pe o suprafata circulara.

Frotiul astfel confectionat este lasat sa se usuce la temperatura camerei.

Fixarea frotiului. Dupa uscare, frotiul este supus operatiei de fixare prin caldura sau prin lichide fixatoare, cum sunt: alcoolul metilic, alcoolul etilic, alcoolul-eter, etc. Pentru fixare prin caldura se trece lama de 2-3 ori cu fata opusa frotiului, prin flacara unui bec de gaz. Incalzirea se face la 60 - 70°C (lama este suportata pe dosul mainii). Prin fixare bacteriile sunt omorate, evitandu-

se astfel pericolul infectarii. In plus, se mareste aderenta preparatului de lama, iar afinitatea sa pentru colorant creste. O fixare corecta nu trebuie sa produca modificari ale formei si ale structurii microorganismului supus acestei operatii.

Mordansarea este tratarea frotiului cu anumite substante chimice, numite *mordanți* (de exemplu, solutia Lugol), in scopul de a intensifica activitatea coloranților. Mordantii, prin afinitatea puternica pe care o au atat fata de colorant, cat si fata de substratul supus colorarii, faciliteaza si intaresc legatura dintre acestia, contribuind astfel la obtinerea unei coloratii mai intense si de o calitate mai buna. Pentru colorantii bazici se folosesc mordanti acizi (acid tanic, acid picric, etc.) iar pentru colorantii acizi se folosesc mordanti bazici (sulfat de fier, alaun, etc.)

Prepararea unor coloranti folositi in bacteriologie

Colorantii sunt preparati si pastrati in laborator sub forma de solutii alcoolice saturate, cunoscute si sub numele de “solutii-mama”. Aceste solutii se prepara prin mojararea unei cantitati de 10-15 gr. colorant cu 100 ml alcool de 96°; pentru solutia saturata de violet de gentiana sunt suficiente numai 6-8 gr. colorant. Dupa preparare, solutiile saturate sunt tinute 2-7 zile la termostat la 37°C si agitate de mai multe ori pe zi. Dupa filtrare prin hartie de filtru, solutiile se pastreaza la loc intunecos in flacoane de sticla de culoare inchisa cu dop rotat. In aceste conditii, colorantii pot fi pastrati timp indelungat.

Pentru colorarea germenilor se folosesc *solutii apoase* de colorant. Acestea se prepara dintr-o solutie alcoolica saturata, care este diluata in proportie de 1/10 in apa fenolata 2%.

Solutiile apoase pot fi preparate si direct din substanta colorata astfel: 1 gr. de colorant (cristale) este majorat si dizolvat in 10 ml alcool. Se adauga apoi 2 ml fenol si o parte din apa distilata. Dupa ce se amesteca bine, se terc intr-un flacon de sticla in care se adauga si restul de apa distilata pana la 100 ml. Solutia astfel preparata se mentine 24h la termostat, la 37°C, apoi se filtreaza prin hartie de filtru si se transvazeaza intr-o sticla picatoare, fiind buna de folosit. Solutiile apoase de colorant nu pot fi pastrate un timp prea indelungat, deoarece se degradeaza.

In coloratiile obisnuite se mai folosesc si alte solutii, ca *Solutia Lugol* (1 gr. iod, 2 gr. iodura de potasiu si 300 ml apa distilata) si *solutia de alcool-acetona* (3 parti alcool de 96° si o parte acetona).

Coloratiile pot fi simple, diferentiale si speciale.

Coloratiile simple

Coloratia cu albastru de metilen. Frotiul uscat si fixat apoi la flacara este acoperit cu o solutie de albastru de metil timp de 1-2 minute. Se spala dupa aceea frotiul cu apa de robinet, se lasa sa se usuce si se examineaza la microscop cu obiectivul cu imersie.

Prin aceasta metoda, toate elementele din campul microscop apar colorate in albastru. Este o coloratie rapida, care pune in evidenta forma, gruparea si, eventual, raporturile germenilor cu leucocitele sau cu alte elemente prezente in frotiu.

Coloratia cu fucsina fenicata Ziehl diluata 1/10 se efectueaza in acelasi mod ca si cea cu albastru de metilen. Elementele din frotiu apar colorate in rosu.

Coloratiile diferentiale

Coloratia Gram. Este o coloratie foarte utilizata in bacteriologie, deoarece imparte bacteriile in doua mari categorii: bacterii Gram-pozitive si bacterii Gram-negative.

Tehnica coloratiei este urmatoarea:

- frotiul uscat este fixat prin caldura;
- se acopera lama cu solutie apoasa de violet de gentiana si se lasa timp de 1-2 min.;
- se indeparteaza colorantul si se acopera lama cu solutie Lugol pentru 2 min.;
- se indeparteaza mordantul (solutia Lugol) si se trateaza frotiul cu alcool-acetona timp de cateva secunde;
- se spala rapid lama cu apa de robinet si se acopera cu fucsina diluata 1/10 in apa timp de 30 sec. pana la 1 min;
- se indeparteaza fucsina si se spala frotiul cu apa de robinet; dupa uscare se examineaza la microscop cu obiectivul cu imersie.

Bacteriile Gram-pozitive rezista la decolorare, ramanand colorate in violet, dar cele Gram-negative sunt decolorate de alcool-acetona si recolorate in rosu.

Coloratia Ziehl-Nielsen se aplica in cazurile mycobacteriilor care au in compozitia peretelui celular acid micolic si le confera impermeabilitate la colorantii folositi in tehnica gram. Pentru acesti germeni numiti acid-alcool rezistenti (AAL) se foloseste aceasta tehnica speciala. Tehnica folosita pentru coloratie:

- frotiul uscat se fixeaza la flacara;
- se acopera lama cu fucsina fenicata Ziehl si timp de 10 min se incalzeste intermitent, cu ajutorul unei lampi de alcool sau cu flacara unui bec Bunsen pana la emiterea de vapori, fara a se ajunge la fierbere; fucsina evaporata prin incalzire se inlocuieste imediat;
- se indeparteaza colorantul, se spala frotiul cu apa de robinet si se decoloreaza cu acid azotic diluat 1/3 sau acid sulfuric diluat 1/4;
- se indeparteaza acidul si se spala lama cu apa de robinet, dupa care se decoloreaza frotiul cu alcool de 96o;
- se indeparteaza alcoolul si se spala frotiul din nou, cu apa de robinet, dupa care se recoloreaza cu o solutie apoasa de albastru de metilen 1% timp de 1 min.;
- se spala frotiul cu apa de robinet, se lasa sa se usuce si se examineaza la microscop cu obiectivul de imersie.

Coloratii speciale

Metode de punere in evidenta a capsulei bacteriene

Metoda Burri. Pe o lama perfect curata se pun o picatura din suspensia de bacterii capsulate si o picatura de tus de China. Dupa ce se omogenizeaza, se face un frotiu prin etalarea amestecului cu o alta lama.

- Se lasa sa se usuce si se examineaza la microscop cu obiectivul cu imersie. Pe fondul negru al preparatului, bacteriile impreuna cu capsulele lor apar incolore.
- *Coloratia Loeffler cu albastru de metilen* se efectueaza cu o solutie inechita de albastru de metilen Loeffler. Prin aceasta coloratie corpul bacterian se coloreaza in albastru, iar capsula, in roz.
- *Coloratia pentru cili bacterieni.* Cili nu pot fi vazuti la microscopul optic pe preparatele native sau pe frotiurile cu coloratii obisnuite. Pentru a fi pusi in evidenta se folosesc metode speciale de coloratie

Metoda Zettnow. Coloratia dupa aceasta metoda se desfasoara astfel:

- se prepara o suspensie diluata de germeni in apa distilata, astfel incat sa se obtina pe frotiu celule izolate; din aceasta se iau 2-3 picaturi cu o pipeta Pasteur si se depun pe o lamela degresata si flambata;
- se lasa frotiul sa se usuce, dupa care se fixeaza cu formol diluat 1/10, timp de 10 min.;
- se pune lamela in apa distilata timp de 3 min dupa care se introduce intr-o solutie de tanin si de tartrat dublu de stibiu si potasiu, incalzita la 60-70°C, timp de 10 min.;
- se scoate lamela cu o pensa si se clateste bine in apa distilata;
- se acopera frotiul cu o solutie de sulfat de argint si amoniac care se prepara in momentul folosirii si se incalzeste usor la flacara, timp de 30 - 60 sec.;
- se spala frotiul cu apa distilata, se usuca si se monteaza in ulei de cedru, prin aplicarea lamelei cu frotiul in jos pe o lama foarte curata, dupa care poate fi examinata la microscop.

Metode de colorare a sporilor

Metoda Gray modificata. Se fac frotiuri care se lasa sa se usuce si se fixeaza prin caldura. Se acopera lama cu o solutie apoasa de verde malahit 5% si se incalzeste de trei ori pana apar vapori. Dupa fiecare incalzire se indeparteaza colorantul si se inlocuieste cu altul proaspat. Se spala apoi frotiul cu apa si se acopera cu o solutie de fucsina diluata 1/10, timp de 1-2 min. Se indeparteaza colorantul, se spala lama cu apa, se lasa sa se usuce si se examineaza la microscop cu obiectivul cu imersie. Sporii apar colorati in verde-albastrui, iar corpul bacterian apare colorat in violaceu.

Impregnatia argentica (metoda Fontana-Tribondeau). Aceasta coloratie se foloseste, in special, pentru punerea in evidenta a treponemelor si a leptospirelor.

Tehnica este urmatoarea:

- frotiul uscat **nu** se fixeaza la flacara;
- pentru fixare si deshemoglobinizare se acopera frotiul cu solutie Rugge, care trebuie schimbata de trei ori in decurs de 1 min;
- se spala lama cu apa distilata si se acopera apoi 3 min cu o solutie de acid tanic 5%, care se incalzeste pana la emisie de vapori;
- se spala cu apa distilata, se lasa sa se usuce si se examineaza la microscop cu obiectivul de imersie.

Treponemele si leptospirele apar colorate in negru-brun, iar restul frotiului, in galben.

Coloratia May-Grunwald-Giemsa se foloseste in microbiologie pentru colorarea preparatelor de sange, in care se cerceteaza prezenta unor microorganisme, ca: spirochete, hematozoarul palustru, toxoplasma, etc.

Frotiul obtinut prin etalarea pe lama in strat subtire a unei picaturi proaspete de sange este fixat prin acoperirea cu solutie May-Grunwald, timp de 4 min sau cu alcool metilic pur, timp de 10 min. Dupa fixare, peste solutia May-grunwald se adauga o cantitate egala de apa distilata neutra si se lasa 1 min.

Se indeparteaza solutia May-grunwald si se acopera lama cu solutie Giemsa diluata (3 picaturi solutie Giemsa la 2 ml apa distilata neutra). Dupa 20 min. se indeparteaza colorantul, se spala lama cu apa distilata, se lasa sa se usuce si se examineaza la microscop. Pe aceste preparate spirochetele sunt colorate in violet, hematozoarul se coloreaza in albastru-violet, etc.

LP 5

Metode de izolare și cultivare a bacteriilor. Medii de cultură uzuale

Cultivarea bacteriilor

Cultivarea bacteriilor: creșterea bacteriilor pe medii de cultură în condiții in vitro.

Medii de cultură: complexe de substanțe care permit creșterea și multiplicarea bacteriilor (conțin substanțe nutritive, au pH corespunzător, umiditate corespunzătoare, sunt sterile, trebuie asigurată aero/anaerobioza)

Însămânțare: punerea în contact a unei culturi bacteriene sau a unui produs patologic cu mediile de cultură.

Colonie bacteriană: aglomerare de bacterii vizibilă cu ochiul liber, formată din multiplicarea unei singure bacterii de pe mediul de cultură

Izolare: repicarea unei singure colonii pe alte medii de cultură cu scopul de a obține cultură pură

Clasificarea mediilor de cultură

După consistență:

- lichide (repartizate în eprubete)
- solide (geloza dreaptă, înclinată, în placă)
- semisolide (în eprubete)

După conținutul de substanțe nutritive:

- Medii naturale: conțin substanțe nutritive în forma lor naturală, fără a fi prelucrate în prealabil
- Medii artificiale

Metode de însămânțare

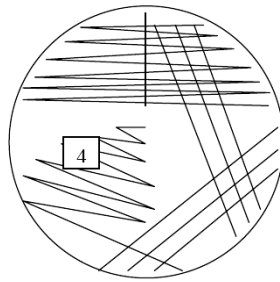
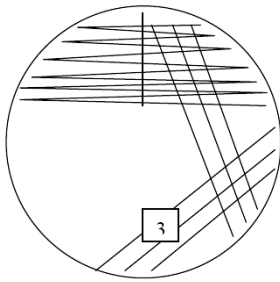
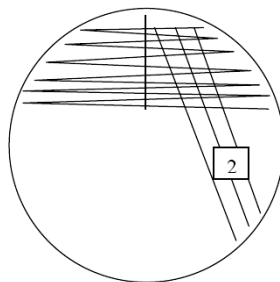
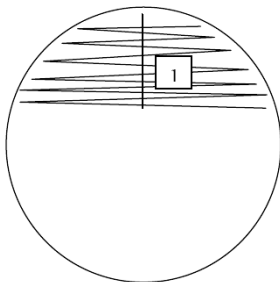
1. Pe medii solide

- însămânțare prin epuizare (se obțin colonii izolate)
- însămânțare în sector (se obțin colonii confluențe)
- însămânțare prin înțepare

➤ Însămânțarea prin epuizare

Obținerea culturii primare

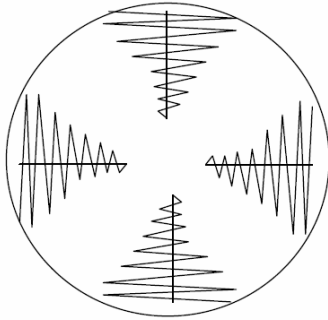
- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs patologic



- Se descarcă ansa pe mediu de cultură:
- se însămânțează un prim sector [1]
- din primul sector însămânțat se trasează câteva striuri paralele în sensul acelor de ceasornic [2]
- se continuă însămânțarea prin striuri paralele [3], terminându-se printr-un striu în zig-zag [3]
- după fiecare etapă se sterilizează ansa, fără a se încărca în produs patologic!
- În ultimul sector bacteriile sunt dispersate, astfel încât după incubare se vor forma colonii izolate

Obținerea culturii pure

Se replică o singură colonie din cultura primară pe un mediu de cultură proaspăt, fie prin epuizare, fie prin însămânțare în sector



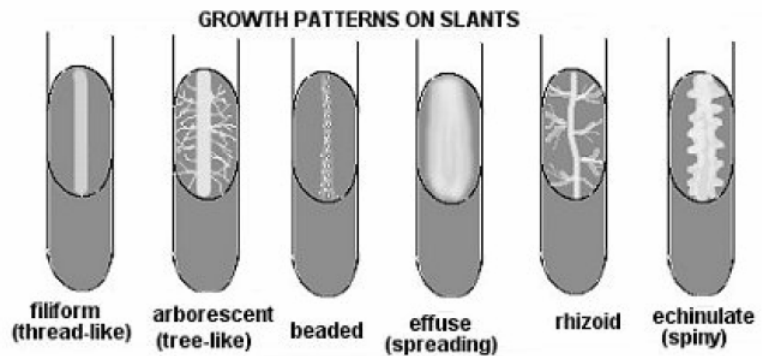
➤ Însămânțarea în sector

Pe o placă pot fi însămânțate mai multe specii bacteriene
Prin însămânțare în sector **nu** se obțin colonii izolate !

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs patologic
- Se descarcă ansa pe mediu de cultură sub forma unui sector de cerc.

➤ Însămânțarea pe medii în coloană înclinată

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs
- Se descarcă ansa pe partea înclinată a mediului de cultură sub forma unui striu
- ! NU se obțin colonii izolate, bacteriile cresc sub diferite modele



➤ Însămânțarea prin înțepare

Se practică pentru însămânțarea mediilor solide turnate în coloană dreaptă

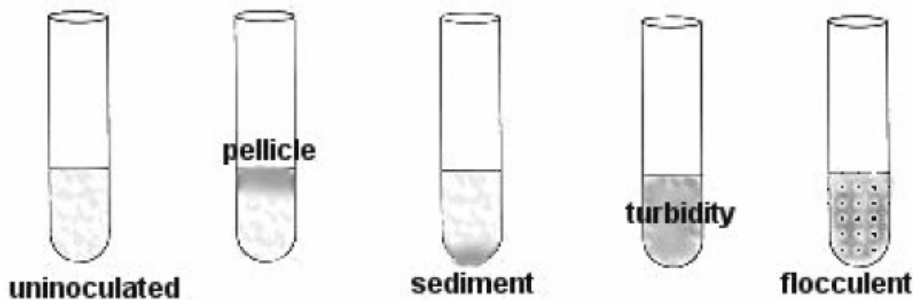
- Se încarcă acul de inoculare cu produs
- Se înțepă mediul în direcție verticală pe o distanță de $\frac{3}{4}$ din înălțimea coloanei



2. Pe medii lichide - omogenizarea unei colonii în mediu · Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs

- Se omogenizează produsul recoltat în mediul de cultură lichid

În funcție de specie, bacteriile cresc difuz în tot volumul mediului / la suprafață / la fundul eprubetei



Caractere de cultură

În cazul germeilor cu creștere rapidă (timp de generație 20-30 minute) după 18 ore de incubare la 35-37°C, dintr-o singură bacterie ia naștere colonia. La colonii notăm:

- mărimea coloniilor
- forma coloniilor
- aspectul marginilor
- suprafața coloniei
- aspectul
- consistența coloniei
- transparența sau opacitatea coloniei
- pigmentarea coloniei
- apariția unei zone colorate sau incolore în coloniei

A. Diferențierea coloniilor S, R și M

Forma S (smooth)

- colonii rotunde
- margini regulate, bombate
- suprafața netedă, translucidă
- reprezintă forma normală pentru majoritatea bacteriilor patogene, fiind dotată cu calități optime de structură antigenică și de patogenitate.

Forma R (rough)

- colonii neregulate
- plate, uscate
- suprafața zbârcită
- forma R reprezintă o formă de degradare, însoțită de modificări structurale profunde, de modificări antigenice și de scăderea virulenței
- este caracteristică, în general, bacteriilor nepatogene
- există și 3 excepții la care forma R caracterizează specii patogene: *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*

Cultivarea fungilor

Fungii se cultivă pe medii de cultură speciale care pot conține substanțe ce inhibă creșterea bacteriilor (antibiotice) și suplimente nutritive (zaharuri) în funcție de specie. Cresc sub formă de colonii S, R, untoase și pufoase (mușgaiurile). Metodele de izolare (însămânțare) și de incubare sunt cele prezentate la cultivarea bacteriilor.

Cultivarea virusurilor

1. Cultivarea virusurilor pe culturi celulare

Virusurile pot fi izolate pe celule vii, receptiv.

Cultura celulară: sistem biologic *in vitro* alcătuit din celule izolate vii, care își păstrează capacitatea de multiplicare și nu se organizează în țesuturi.

Condiții necesare pentru păstrarea în viață a celulelor din cultura celulară:

- condiții aseptice
- mediu nutritiv (mediu de cultură lichid ce conține substanțe nutritive, sursă de energie, factori de creștere, vitamine, sistem tampon, indicator, antibiotice și antifungice) – mediile comercializate Eagle, Hanks, M199
- pH adecvat
- temperatură constantă
- atmosferă cu 10% CO₂

În funcție de proveniența celulelor, culturile celulare se clasifică în:

- culturi de origine animală sau umană
- culturi de celule embrionare sau adulte
- culturi de celule normale sau tumorale

Forme intermediare: S-R, R-S

Forma M

- aspect mucos
- foarte mari
- foarte bombate
- foarte lucioase
- cu tendință de curgere și de confluație
- caracteristice bacteriilor care posedă capsula (de ex. *Klebsiella*)

B. Fenomen de cățărare

- Speciile *Proteus*: pe medii simple (fără substanțe inhibitoare) crește sub forma unui vâl care acoperă toată suprafața mediului
- dacă tulpinile însămânțate pe același mediu de cultură sunt diferite atunci peliculele formate nu se intersectează, apare un spațiu de demarcare, fenomen numit DIENES.
- dacă tulpinile de *Proteus* sunt la fel atunci cele două pelicule se vor contopi.

Culturile celulare primare sunt culturi realizate direct din țesuturile sursă.

Liniile celulare stabilizate derivă din culturile primare, se mențin în viață timp nelimitat prin subcultivări.

Realizarea culturilor primare din țesuturi solide

- se prelevă țesutul sursă în condiții aseptice
- se fragmentează țesutul în bucăți de aprox. 1 mm³, se spală cu soluție salină tamponată (SST) pentru îndepărtarea sângelui
- disocierea enzimatică a celulelor: tripsinizarea fragmentelor tisulare în soluție de tripsină 0,25% (enzimă proteolitică, desface legăturile peptidice) pe agitator magnetic (ajută la desfăcerea legăturilor intercelulare)
- colectarea celulelor izolate în vas colector – se face prin filtrare pentru a obține numai celule izolate
- repetare tripsinizării până la epuizarea țesutului, în timpul tripsinizării vasul colector se păstrează la temperatura de 4°C pentru inactivarea tripsinei
- centrifugarea suspensiei de celule izolate, îndepărtarea supernatantului (tripsina), spălare cu SST, în final suspendarea celulelor în mediu nutritiv
- controlul viabilității celulelor cu colorație vitală albastru de tripan (se colorează celulele moarte) – pentru a se realiza cultura, 90% din celule trebuie să fie vii)
- numărarea celulelor, ajustarea lor la concentrație de 300000 celule/ml, repartizare volume egale în flacoane de culturi celulare
- incubare în poziție culcată
- urmărirea formării culturii cu microscopul invers

Culturi provenite din celule:

- normale: celulele se atasează de peretele flaconului, se multiplică până acoperă peretele flaconului, realizează o cultură monostrat (fenomenul inhibiției de contact)
- tumorale: se multiplică și după acoperirea suprafeței disponibile, cresc în mai multe straturi și în suspensie

Subcultivarea culturilor celulare

După 5-7 zile de la realizarea culturii se epuizează substanțele nutritive, sursele de energie, se acidifică mediul. Pentru menținerea celulelor în viață, acestea trebuie pasate, subcultivate. Se realizează prin versenizare:

- celulele se detasează de pe peretele flaconului cu soluție de EDTA (versen)
- se centrifughează
- se spală cu soluție SST
- se resuspendează în mediu nutritiv
- se verifică viabilitatea celulelor, se numără celulele și se ajustează la concentrația optimă. Se repartizează volume egale în flacoane de cultură celulară.

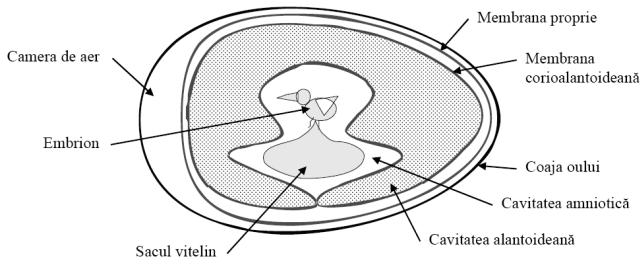
Culturile primare realizate din celule normale adulte pot fi subcultivate de câteva ori (4-6) după care celulele mor (apoptoză)

Culturile realizate din țesuturi embrionare pot fi subcultivate de mai multe ori (celule nediferențiate), de 60-80x, după care mor. Liniile celulare pot fi subcultivate nedefinit. Aceste se obțin din țesuturi tumorale (HeLa, KB, Detroit, etc) sau din culturi celulare efectuate din țesuturi normale care au suferit transformare malignă spontană (Vero). Liniile celulare sunt bine caracterizate, se manevrează ușor, pot fi folosite pentru izolarea virusurilor.

Inocularea suspensiilor virale în culturile celulare, identificarea izolatelor virale

- se îndepărtează mediul nutritiv și se introduce în flacon suspensia virală pregătită în prealabil.
- după o incubare de 1 oră (penetrarea virusurilor în celulele receptiv) suspensia se decantează, se adaugă mediu de întreținere (mai sărac în substanțe nutritive decât mediul nutritiv, dar care permite supraviețuirea celulelor)
- se incubează
- în zilele următoare se urmăresc modificările survenite în cultura celulară.

2. Izolarea virusurilor pe oul de găină embrionat



Inocularea virusurilor se poate face pe:

- membrana corioalantoideană
- cavitata alantoideană sau amniotică
- sacul vitelin
- venele alantoidiene
- embrion

Inocularea pe membrana corioalantoideană

- la ovoscop se notează pe coajă poziția camerei de aer și zona unde membrana corioalantoideană este cel mai bogat vascularizată
- se antiseptizează coaja în cele două locuri notate anterior
- se perforează cu un ac coaja în zona camerei de aer
- cu o freză se decupează un triunghi din coajă la nivelul membranei
- se perforează membrana proprie și se aspiră aerul din camera de aer cu ajutorul unei tetine din cauciuc (membrana proprie se dezlipeste de membrana corioalantoideană)
- se îndepărtează porțiunea vizibilă din membrana proprie, evidențiindu-se direct membrana corioalantoideană
- se depune pe membrană produsul de inoculat cu o pipetă
- după inoculare se astupă orificiile create cu lamelă de sticlă și parafină

3. Izolarea virusurilor în animale de laborator

La această metodă se recurge în momentul în care celelalte metode sunt nesatisfăcătoare. Înainte de inoculare animalele sunt marcate, dacă este necesar sunt anesteziate (intervenții dureroase), iar locul inoculării se epilează și se antiseptizează.

Inocularea se face prin diferite căi:

- intradermic
- subcutanat
- intramuscular
- intravenos
- intraperitoneal
- intranasal
- intracerebral

Suspensiile virale sunt inoculate prin injecție, inhalare, ingestie, badijonare, etc...

Cultivarea unor paraziților unicelulari

Unii paraziți unicelulari poate fi făcută medii de cultură, la 37°C, una sau mai multe zile, în funcție de specia de parazit.

LP 6

Antibiograma difuzimetrică: tehnica de realizare și interpretare.

Antibiograma: testarea sensibilității in vitro a microorganismelor față de antibiotice (TSA – testarea susceptibilității față de antibiotice)

Indicațiile efectuării antibiogramei: în cazul tuturor bacteriilor semnificative clinic a căror susceptibilitate nu este predictibilă (condiție: existența standardizării privind specia, antibioticul de testat)

Necesitatea efectuării antibiogramei se decide de către microbiolog în funcție de:

- felul produsului din care s-a izolat germeul,
- specia bacteriană

Când relevanța unui izolat este incertă, medicul microbiolog se consultă cu medicul curant și se ia o decizie în comun pe baza datelor clinice.

Metode de realizare a antibiogramei:

A. Metode calitative

Metoda difuzimetrică Kirby-Bauer

Se testează sensibilitatea unei tulpini bacteriene izolate în cultură pură și identificate. Este metoda utilizată de rutină pentru testarea susceptibilității izolatelor clinice. Fiind o metodă calitativă, nu permite cuantificarea nivelului de rezistență, rezultatele fiind exprimate în:

- sensibil

- tulpina este sensibilă față de antibioticul testat la o concentrație realizabilă de către antibiotic în ser
- bacteriilor sensibile nu dispun de mecanisme de rezistență

- intermediar

- răspunsul terapeutic în cazul acestor izolate poate fi mai slab decât în cazul izolatelor sensibile
- această categorie reprezintă totodată o zonă de tampon care, în caz de erori tehnice minore, necontrolate, previne crearea unor discrepanțe majore în interpretare
- în caz de sensibilitate intermediară antibioticul poate fi utilizat clinic în anumite situații:
 - în infecții urinare - acele antibiotice, care se concentrează în urină (realizează concentrații mai mari în urină decât în ser)
 - când pot fi administrate doze crescute (b-lactamine)

- rezistent

- bacteriile rezistente nu pot fi inhibitate de antibiotic la concentrația serică realizabilă prin administrare uzuală
- pot fi detectate mecanisme de rezistență specifice

În efectuarea și interpretarea antibiogramelor calitative se urmăresc standarde internaționale. În prezent standardul acceptat în cele mai multe țări (inclusiv România) este cel american, elaborat de CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute).

Realizarea antibiogramei conform standardului CLSI

1. Prepararea inoculului:

- se suspensionează 2-3 colonii izolate în ser fiziologic
- turbiditatea suspensiei se controlează nefelometric sau comparând cu tuburi etalon (conțin suspensii de particule latex/sulfat de Ba având turbiditate determinată);
- se ajustează la 0.5 McFarland (1,5x10⁸ CFU/ml).

2. Însămânțare:

- se alege un mediu corespunzător speciei bacteriene testate
- Mueller-Hinton pentru majoritatea bacteriilor
- Mueller-Hinton cu sânge pentru pretențiosi (de ex. streptococi)

- medii speciale (pentru *Haemophilus* spp . neisserii)
- se introduce un tampon în suspensia bacteriană, se stoarce pentru îndepărtarea excesului de lichid

- se sterge uniform toată suprafața mediului de 3x

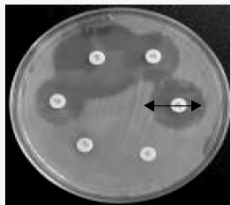
3. Depunerea microcomprimatelor de antibiotice

- se aleg antibioticele care trebuie testate în funcție de specia bacteriană testată și în funcție de localizarea infecției (anexa 1)
- se depun discurile de antibiotic la 1.5 cm distanță de marginea cutiei Petri și la 3 cm distanță unul față de celălalt (pot fi depuse max. 12 discuri)
- 15 min. temperatura camerei

4. Incubare

- în funcție de specia bacteriană: în atmosfera obișnuită sau în atmosferă de CO₂ (de ex. streptococi, neisserii.)
- 35°C
- 16-18 ore (în cazul germenilor pretențioși până la 20-24 de ore)
- 24 de ore în cazul testării vancomicinei

5. Citire



- apare o cultură bacteriană confluentă, în jurul microcomprimatelor apar zone de inhibiție (lipsa creșterii bacteriene)
- se citesc diametrele zonelor de inhibiție
- se compară diametrele citite cu diametre standard în funcție de antibiotic, cantitatea de antibiotic din comprimat, specia bacteriană testată

Exemplu de diametre standard, conform standardelor CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute USA).

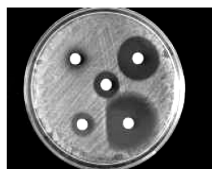
Standard	Specii bacteriene	Antibiotic	Rezistent	Intermediar sensibil	Sensibil
CLSI	<i>Staphylococcus aureus</i>	levofloxacin 10 ug	≤ 15 mm	16-18	≥ 19 mm
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	levofloxacin 10 ug	≤ 13 mm	14-16	≥ 17 mm

6. Interpretarea antibiogramelor:

- rezultatul se raportează: sensibil (S), intermediar sensibil (IS) sau rezistent (R) la antibioticul testat
- fiecare rezultat de antibiogramă se interpretează!
- nu se comunică diametrele citite (metodă calitativă)



sinergism



antagonism

Observatie

Pot apărea fenomene de sinergism/antagonism care reflectă diferite mecanisme de existență sau colonii izolate în interiorul zonei de inhibiție: subpopulații rezistente.

Variabilele care influențează rezultatele:

- compoziția mediului (conținut de cationi, timidină)
- pH (optim: 7,2-7,4)
- grosimea gelozei (standard: 4 mm)
- inoculul - 0,5 McFarland
- microcomprimate (valabilitate, conținut, condiții de păstrare)
- timpul, temperatura de incubare
- citirea diametrelor (lumină refractată/reflectată, colonii izolate, prezența unui vâl, margini crenelate)
- loturile noi de medii de cultură se testează cu tulpini de referință.

LP 7

Determinarea CMI. Criterii de decizie asupra necesității efectuării antibiogramei

B. Metode cantitative - permit stabilirea concentrației minime inhibitorii (CMI) a unui antibiotic. **nCMI:** cantitatea cea mai mică de antibiotic care inhibă complet multiplicarea unei bacterii

Este recomandată testarea cantitativă în următoarele situații:

- cazuri clinice grave (septicemii, endocardite, meningite)
- rezultate incerte cu metoda difuzimetrică / sensibilitate nedeterminată
- situații speciale (de ex. testarea sensibilității pneumococului la penicilină printr-o metodă cantitativă când diametrul zonei de inhibiție la oxacilină este sub 20 mm)

CMI obținut se raportează la punctele de ruptură superior și inferior date de CLSI

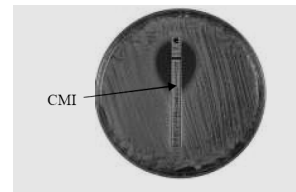
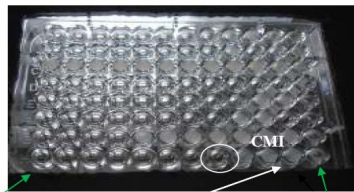
Exemplu: Puncte de ruptură CMI în ug/ml pentru ampicilină:

Exemplu: Puncte de ruptură CMI în ug/ml pentru ampicilină:

Specii bacteriene	Sensibil	Intermediar sensibil	Rezistent
Stafilococi	$\leq 0,25$	-	$\geq 0,5$
Enterococi	≤ 8		≥ 16
Enterobacterii	≤ 8	16	≥ 32

1. Metoda diluțiilor (macro/microdiluție)

- se realizează diluții succesive din antibioticul de testat în mediu de cultură lichid
- se adaugă cantități fixe din cultura bacteriană cercetată
- incubare 18 ore 35°C
- se urmărește apariția culturii în mediul lichid
- CMI: cea mai mică concentrație de antibiotic care nu permite creșterea germenilor (cultură



limpede)

2. Metoda diluțiilor în agar

- se realizează diluții succesive din antibioticul testat în geloză Mueller-Hinton se însămânțează cultură bacteriană în spoturi
- citire: CMI - concentrația cea mai mică care inhibă complet creșterea sau apare maximum o colonie

3. E-teste

- pe suprafața mediului de cultură solid și însămânțat se aplică fâșii din plastic impregnate cu antibiotic în concentrație crescândă - la un capăt concentrația este minimă, la celălalt este maximă; gradațiile sunt notate pe fâșie;
- incubare
- apar zone de inhibiție de formă elipsoidală, în dreptul intersecției cu fâșia de plastic se citește CMI

Criterii de decizie asupra necesității efectuării antibiogrammei

- Izolatul bacterian. Se efectuează antibiogramă pentru fiecare izolat bacterian considerat agentul etiologic al unei infecții. În cazul unor specii bacteriene nu există rezistență in vivo recunoscută față de anumite clase antibacteriene, de aceea testarea in vitro nu are sens. De exemplu: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* sunt sensibile față de penicilină *Staphylococcus saprophyticus* izolat din infecții urinare este sensibil la toate antibioticele utilizate în tratamentul infecțiilor urinare

- Metoda difuzimetrică (metodă calitativă, antibiograma obisnuită) nu este adecvată testării susceptibilității unor specii bacteriene, rezultatele obținute prin această metodă fiind neinterpretabile. De exemplu: germeni anaerobi, streptococi grup viridans, bacili Gram pozitivi (*Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp.), *Campylobacter* spp., pseudomonade (specii de pseudomonas altele decât *P. aeruginosa*)

- Semnificația clinică a izolatului. Nu se testează sensibilitatea la antibiotice pentru izolate fără semnificație clinică. De ex. streptococi grup viridans, bacili Gram pozitivi (*Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp.) izolate din urină, *S. aureus*, enterobacterii izolate din secreții faringiene în faringita acută a persoanelor imunocompetente, etc. Nu se testează sensibilitatea tulpinii bacteriene reizolate de la același pacient și la care s-a testat deja sensibilitatea în interval de 5 zile (excepție: Serratia, Citrobacter, Enterobacter: testarea rezistenței inductibile la cefalosporine de generația a III-a).

Selectarea antibioticelor testate

Se testează seturi de antibiotice specifice pentru: diferite grupuri de germeni:

	Enterobacterii^a	<i>Staphylococcus</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp. <i>enterobacterii</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , etc.
Grup A (testare, raportare primară)	Ampicilină ^{g, r}	și izolate provenite de la pacienți spitalizați sau din ambulator Există grupe de antibiotice cu efecte similare și nu este nevoie de testarea fiecăruia în parte, pentru că rezultatele testării in vitro sunt similare iar eficacitatea clinică comparabilă, dacă apare „sau” între două antibiotice, înseamnă că cele două antibiotice au un spectru de activitate identic, rezistența/sensibilitatea față de acestea este încrucișată. Astfel se alege un singur antibiotic pentru testare iar rezultatele se pot extrapola pentru restul antibioticelor grupa respectivă.
	Cefazolin ^a	
	Cefalotin ^a	
	Gentamicină	
Grup B (testare primară, raportare selectivă)	Amikacin	A /Cephalotin este reprezentativ pentru: cephalotin, cephalexin, cephalirin, cefaclor, cephradine, cefadroxil. b Nu se raportează pentru izolatele urinare. cGermenii sensibili la tetraciclină sunt sensibile și la doxiciclină, minociclină. Unele izolate rezistente sau intermediar sensibile la tetraciclină pot fi sensibile la doxiciclină sau minociclină. g Pentru izolatele fecale de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> se testează numai ampicilina, o quinolonă și trimethoprim-sulfamethoxazol. Pentru izolatele extraintestinale de <i>Salmonella</i> se testează în plus cloramfenicolul și o cefalosporină de generația a III-a. h În cazul izolatelor din LCR se testează sensibilitatea față de cefotaxim și ceftriaxon în loc de cephalotin, cefazolin. i Tulpinile de <i>Klebsiella</i> spp. și <i>E. coli</i> producătoare de BLSE (beta-lactamază cu spectru extins) sunt rezistente in vivo față de peniciline, cefalosporine, aztreonam chiar dacă arată sensibilitate in vitro. r ampicilina se utilizează pentru precizarea sensibilității față de ampicilină și amoxicilină
	Amoxicilina-clavulanat	
	ampicilină-sulbactam	
	Piperacilină-tazobactam	
	Ticarcilina-clavulanat	
	Cefuroxim	
	Cefepime	
	Cefotaxim ^{g, h, i} sau ceftriaxon ^{g, h, i}	
	Ciprofloxacin ^g	
	Levofloxacin ^g	
	Ertapenem	
	Meropenem	
	Imipenem	
Piperacilină		
Ticarcilina		
Grup C (testare suplimentală, raportare selectivă)	Aztreonam	
	Ceftazidim	
	Chloramphenicol ^{b, g}	
Grup U (testare suplimentară pentru izolate urinare)	Tetraciclină ^c	
	Norfloxacin	
	Ofloxacin	
		Nitrofurantoin

Grupele de antibiotic testate/raportate

- Grup A: antibiotice testate și raportate de rutină, de primă intenție
- Grup B: antibiotice importante clinic, care se testează de rutină dar se rezultatele se raportează selectiv. Se raportează dacă
 - o tulpina este rezistentă față de aceeași clasă de antibiotic din grup A.
 - o izolatul provine din produs patologic special (de ex. sensibilitatea față de cefalosporine de generația a III-a a izolatelor din LCR, etc)
 - o infecția este polimicrobiană
 - o infecția se extinde la mai multe situsuri
 - o alergie la antibiotice
 - o esec terapeutic la tratament cu antibiotic grup A
 - o raportare către SPCIN, scop epidemiologic
- Grup C: antibiotice suplimentare sau alternative,
 - o tulpini nosocomiale
 - o alergii
 - o scop epidemiologic
- Grup U: antibiotice testate în infecții urinare
- Grup O (other): antibiotice utilizabile în terapie dar care nu se testează de rutină

Alegerea antibioticului corespunzător pentru tratament pe baza rezultatului antibiogrammei

- se alege antibioticul față de care tulpina este sensibilă, eventual intermediar sensibilă
- în funcție de localizarea infecției (antibioticul să realizeze concentrații adecvate la locul infecției)
- în funcție de farmacocinetica, farmacodinamica antibioticului, administrare, dozare
- în funcție de complianța pacientului
- în funcție de costuri.