

Generelle metode for resistensbestemmelse 2009

Resistensbestemmelse av bakterier kan utføres med ulike metoder. Fortynningsmetoden (med fast eller flytende medium) er referansemetode, men brukes lite i rutinediagnostikken og er neppe egnet i forbindelse med kartlegging og overvåkning av antibiotikaresistente bakterier i Norge. Til dette er sannsynligvis Etest og agardiffusjonsmetoden med antibiotikalapper de mest hensiktsmessige. Uansett hvilken metode som benyttes, er det en absolutt forutsetning at forsøksbetingelsene er standardiserte for at det skal oppnås pålitelige og reproducerbare resultater.

Medium:

Det medium som brukes må ha en definert sammensetning og være nøye standardisert. Det må inneholde de næringsstoffene som er nødvendige for å få tilfredsstillende bakterievekst, og må ikke inneholde komponenter som innvirker på aktiviteten av ulike antibakterielle midler. For bakterier med spesielle vekstkrav må det tilsettes 5% defibrinert saue- eller hesteblood (f. eks. for pneumokokker og streptokokker), 1% hemoglobin og 1% isovitalex (for *Haemophilus* spp. og gonokokker) eller eventuelt andre tilsetninger. pH i mediet bør være 7,2-7,4. I Norge brukes hovedsakelig Mueller Hinton II agar (BD) eller IsoSensitest agar (Oxoid).

Agartykkelse:

Tykkelsen av agarlaget vil innvirke på størrelsen av de sonene av veksthemning som oppstår rundt depotene. Det anbefales en tykkelse på 4 mm (+/- 0,5 mm).

Inokulat:

Tettheten av inokulatet ved lappemetoder må justeres slik at det oppnås vekst av tettstående, semikonfluerende kolonier, men veksten skal ikke være sammenflytende. For tett inokulat er sannsynligvis den vanligste feilkilden ved resistensbestemmelse av bakterier.

Fra en fersk kultur av den aktuelle bakteriestammen (NB! renkultur av stammen) lages en oppslemming i fysiologisk saltvann eller fosfatbufret saltvann. Enkelte bakterier (bl. a. pneumokokker og *H. influenzae*) bør oppslemmes i buljong. Med en bakterieøse tas materiale fra ca. 10 kolonier. Dette er viktig for å oppnå et genetisk representativt materiale slik at eventuelle antibiotikaresistente varianter ikke blir oversett.

Flytmetoden:

Bakteriesuspensjonen bør justeres slik at den inneholder ca. 10^5 kolonidannende enheter (cfu) pr. ml. Dette kan oppnås ved å lage en suspensjon med en tetthet svarende til McFarland 0,5 (tilsvarer ca 10^8 cfu/ml) og fortynne denne 1:1000.

Resistensmediet må ha romtemperatur og inokuleres senest 30 min. etter at den fortynnete suspensjonen er laget. Med en pasteurpipette spres væsken utover agaren. Hele agarflaten må være dekket. Overskytende væske avpipetteres, og skålen settes til tørking i inntil 15 min. til agarflaten er helt tørr. Lappene legges så på.

Penselmetoden:

Bakteriesuspensjonen bør justeres slik at den inneholder ca. 10^6 kolonidannende enheter pr. ml. Dette kan oppnås ved å lage en suspensjon med en tetthet svarende til McFarland 0,5 og fortynne denne 1:100. For enkelte kravstore mikrober (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogene*) kan det være nødvendig å bruke en noe tykkere oppslemming

for å oppnå semikonfluerende vekst. Dypp penselen i den 1:100 fortynnede bakteriesuspensjonen. Fjern overflødig væske ved å presse penselen mot innsiden av røret. Spre inokulatet over hele overflaten av platen i minst tre retninger 60° på hverandre eller bruk rotator. Tillat platen å tørke i inntil 15 minutter.

Inkubering:

Skålene inkuberes i 16-20 timer ved 35-37°C i vanlig atmosfære. Økt CO₂-konsentrasjon (5-8%) i luften bør unngås hvis dette ikke er nødvendig for å oppnå tilfredsstillende bakterievekst. CO₂ fører til endring av pH i mediet, og dette kan innvirke på aktiviteten av enkelte antibakterielle midler. 5-8% CO₂-atmosfære er nødvendig ved undersøkelse av bl.a. *Neisseria* spp., *H. influenzae*, pneumokokker og enkelte andre streptokokker.

Avlesning:

Diameteren av hemningssonen rundt de ulike antibiotikadepotene avleses med skyvelær eller linjal til nærmeste mm. Om mulig bør sonen avleses fra bunnen av skålen. For bakteriostatisk antibiotika med en gradvis reduksjon av veksten ("diffuse soner"), avleses sonen ved 80% hemning.

Agardiffusjonsmetoden:

Ved agardiffusjonsmetoden brukes filterpapirlapper med en definert mengde antibakterielt middel. For agardiffusjon i NORM kan det maksimalt legges 6 ulike depot (antibiotikalapper) på hver liten agarskål (9 cm i diameter). Ved bruk av stor skål (14 cm i diameter) kan det maksimalt legges 9 ulike depot på skålen.

Etest:

Etest er metode som kombinerer prinsippene for agardiffusjons- og agarfortynningsmetoden. Som antibiotikadepot brukes plaststrimler med en bestemt (konstant) konsentrasjonsgradient av de enkelte antibakterielle midler. Etter utsæd av stammen som skal undersøkes (tett konfluerende utsæd med vattpensel), plasseres strimmelen på agaroverflaten. Det antibakterielle midlet diffunderer ut i agaren slik at det dannes en kontinuerlig og stabil konsentrasjonsgradient under strimmelen. Etter inkubering dannes en ellipseformet sone av veksthemning hvis stammen er følsom for det aktuelle midlet, men størrelsen av denne er uten betydning for resultatet. Ut fra en skala som er trykket på strimmelen, kan den minste hemmende konsentrasjonen av antibiotikum (MIC-verdien) avleses direkte der randen av hemningssonen krysser strimmelen. For baktericide (bakteriedrepende) antibiotika avleses MIC ved komplett veksthemming, for bakteriostatisk (bakteriehemmende) antibiotika avleses MIC ved 80% veksthemming når det er slørvekst. Vær oppmerksom på mikrokolonier inne i sonen. Fra krysningpunktet mellom strimmel og vekstgrense rundes det opp til nærmeste hele fortynningstrinn (dvs 1, 2, 4, 8 osv) selv om dette hopper over mellomtrinn på Etest-strimmelen.

Det angis at ved bruk av Etest blir resultatene mindre påvirket av forsøksbetingelsene enn ved bruk av diffusjonsmetoden. Metoden er derfor egnet til resistensbestemmelse av langsomt voksende bakterier og av bakterier med spesielle krav til dyrkningsmedium. Den kan også brukes som alternativ til fortynningsmetoden når det er ønskelig med en mer nøyaktig angivelse av følsomheten enn den diffusjonsmetoden kan gi.