

# Analys av antibiotikakänslighet hos bakterier med diskdiffusionsmetoden

## 1 Metodreferenser och avvikelser

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; Approved Standard – Fourth Edition. CLSI Document VET01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

CLSI. Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline. CLSI document M42-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.

På plattorna kan också sättas nöt- eller hästblod i vilket de röda blodkropparna har brutits ner.

## 2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Metodbeskrivningen lämpar sig för bestämning av antibiotikakänslighet hos de flesta snabbväxande aeroba och fakultativt anaeroba bakterier som isolerats från djur. Testförhållanden, substrat och antibiotika väljs enligt den bakterie som ska undersökas. Metoden lämpar sig inte för bestämning av antibiotikakänslighet hos *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Arcanobacterium*, *Listeria*, *Bacillus* eller *Campylobacter*-släktet eller anaeroba bakterier.

Den här anvisningen kan användas till tillämpliga delar på bakterier som är krävande då det gäller substratet (t.ex. *Flavobacterium*). Om man utför resistensbestämningar för sådana bakterier, ska man vid bedömning av resultaten beakta, att specialsubstrat eller avvikande odlingsförhållanden kan inverka på resultatet av resistensbestämningen.

Om dessa faktorerers effekt på resistensresultatet inte har specificerats särskilt, kan resultatet på sin höjd anses vara vägledande.

## 3 Definition(er)

Antimikrobiella medel är medel som har producerats av mikrober eller är delvis eller helt syntetiskt producerade och som förstör andra mikrober eller förhindrar att de förökas. Med antibiotikum avses i den här anvisningen både naturliga och syntetiska antimikrobiella medel.

Bakterier som är resistent mot läkemedlen kan föröka sig vid en halt där känsliga mikrober dör eller deras tillväxt försvagas. En mikrob klassificeras som resistent utgående från kliniska gränsvärden, om halten av läkemedel som behövs för att förhindra dess tillväxt är högre än den halt som tryggt kan uppnås i kroppen på människor och djur. Toleransen mot antibiotika hos en bakterie som hör till klass I (se

punkt 4) anses vara högre än hos en känslig stam. Då uppnås eventuellt inte en tillräckligt hög halt genom normal dosering av antibiotika, om inte antibiotikan koncentreras till ett specifikt område.

Naturlig resistens är en egenskap som är typisk för bakteriesläktet eller -arten. Även mikrobstammar som ursprungligen var känsliga för läkemedlet kan bli resistenta. Denna förvärvade resistens kan uppstå genom många olika mekanismer.

Det är närmast nödvändigt att testa en sjukdomsframkallande bakteries resistens mot antibiotika då det inte är möjligt att komma fram till den sannolika responsen utgående från anamnestiska uppgifter. Det är endast i undantagsfall nödvändigt att testa en bakteries naturliga resistens mot ett visst antibiotikum.

## 4 Princip

En bakteriestam som ska undersökas med diskdiffusionsmetoden sprids ut jämnt på ytan av en agarplatta. Efter ympningen sätts en lapp på plattan, och antibiotikan upptas i substratet därifrån. Antibiotikahalten i substratet är omvänt proportionellt med avståndet från lappen. Det avstånd där antibiotikahalten har sjunkit under den lägsta nivån som förhindrar bakteriens tillväxt, utgör gränsen för synlig tillväxt. Inhiberingszonens diameter jämförs med de gränsvärden som anges i standarderna. Bakterierna klassificeras som resistenta (R, resistent) och känsliga (S, sensitive) utgående från inhiberingszonens omfattning avseende antibiotikan i fråga. För vissa antibiotika används också en intermediär zon (I, intermediate) mellan resistens och känslighet.

## 5 Eventuella felkällor

Noggrann bestämning av inhiberingszon är en tolkningsfråga då det gäller vissa antibiotika. Nedan (punkt 10) ges mer ingående anvisningar för bestämning.

En för tät eller för gles bakterietillväxt på plattan kan orsaka en kant med en oklar inhiberingszon som kan leda till att zonens storlek över- eller underskattas. Ympningens täthet ska alltid kontrolleras med hjälp av McFarland-standarden.

Fukt inverkar på hur antibiotikan absorberas från lapparna, och därför ska lapparna tas ut i tid för att värmas. Torkmedel i förvaringskärlet ska regenereras regelbundet.

Otydliga eller svårtolkade inhiberingscirklar kan orsakas av antibiotikalappens dåliga kontakt på plattans yta (om t.ex. lappen har tappats ur doseraren eller av pincetten) eller om lappen har flyttats på plattan.

Kontaminering av bakterieodling som ska analyseras eller av använda skålar orsakar felaktiga resultat.

## 6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iakttas verksamhetsbeskrivning LAB 223.

## 7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) McFarland 0.5-standard (nefelometer som hjälp vid jämförelse, inte outhärlig)
- 3) Odlings-skåp  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  eller  $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 4) Sterila bomullspinnar
- 5) Drejskiva för rotation av petriskålar (inte outhärlig)
- 6) Skjutmått eller linjal
- 7) Disk dispenser

## 8 Substrat, antibiotikalappar och kontrollstammar

### 8.1 Substrat

- 1) TSB (Tryptone Soy Broth) blodagar
- 2) vid behov en annan icke-selektiv agar
- 3) CEM I ("choklad") agar
- 4) Fastidious anaerobe (FAA) agar
- 5) 0.9 % NaCl eller icke-selektiv odlingsbuljong (Tryptic soy broth, Brain-Heart Infusion (BHI)-buljong, Müller-Hinton-buljong)
- 6) Müller-Hinton-II-agar (grundsubstrat)
- 7) Müller-Hinton-agar, med 5 % fårblod, nö- eller hästblod i vilket de röda blodkropparna har brutits ner: streptokocker, vissa pasteurilla, en del atypiska *A. salmonicida*-stammar
- 8) choklad-Müller-Hinton-agar: *Histophilus somni*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- 9) 1:7 Müller-Hinton-agar: *Flavobacterium columnare*
- 10) 1:7 Müller-Hinton-agar med fetalt kalvserum: andra flavobakterier som orsakar fisksjukdomar

Agarskiktets tjocklek ska vara ungefär 4 mm på plattans mittpunkt. En sådan tjocklek får man då man gjuter 22-23 ml agar på en  $\varnothing$  9 cm platta.

### 8.2 Antibiotikalappar

Oxoid eller motsvarande antibiotikalappar. Förvaras enligt tillverkarens anvisningar.

### 8.3 Kontrollstammar

*Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27090  
*Aeromonas salmonicida* ATCC 33658  
*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 eller 33186  
*Escherichia coli* ATCC 25922  
*Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947  
*Histophilus somni* ATCC 700025  
*Mannheimia haemolytica* ATCC 33396  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

### 8.3.1 Särskilda krav avseende stammarna

Kontrollera om den stam som du undersöker ställer speciella krav på substratet (CLSI Document M31-A3). Utöver streptokocker behöver också vissa andra bakterier, som *A. pleuropneumoniae* och *H. somni*, tillsatsämnen för att kunna växa.

Standardens känslighetsgränser för streptokocker, *A. pleuropneumoniae* och *H. somni*, har bestämts utan tillsatsämnen eller med ett substrat som innehåller tillsatsämnen. Om du använder tillsatsämnen då du undersöker andra bakterier, ska du vid tolkningen av resultaten kontrollera om användningen av dessa har beaktats i standardernas känslighetsgränser.

## 9 Kvalitetssäkring

Testa att substraten fungerar och sättet att utföra undersökningen med hjälp av lämpliga kontrollstammar (7.3). Använd kontrollstammar minst varje vecka och alltid då satsen byts i skålen. Vid rutinarbete begränsas testningen till representanter för de vanligaste bakteriegrupperna. Om substratet används mera sällan än en gång i veckan, får högst en vecka ha passerat vid undersökningsögonblicket sedan senaste testning. Jämför resultaten av kontrollapparna med de värden som getts i CLSI standard M31 och i bilagan 1. Om resultatet inte är inom de acceptabla gränserna, testa på nytt. Om inte heller det här resultatet är inom de tillåtna gränserna, kassera substratet och utred orsaken till avvikelserna.

Kontrollera också alltid då Müller-Hinton -agarpulversatsen byts, att tymidin- och tyminhalterna i substratet inte är för höga, eftersom sådana halter hejdar effekten av sulfonamider och trimetoprim. Test för tymidin och tymin görs med stammen *E. faecalis* ATCC 29212 eller 33186 och lappar med trimetoprim-sulfa (1.25/23.75 µg). Substratet ska godkännas om den inhiberingszon som lappen skapar efter 24 h inkubering i 35±2°C är klar och är minst 20 mm i diameter.

Testa också varje ny sats lappar på kontrollstammarna (7.3).

## 10 Undersökning av bakteriestammens antibiotikaresistens

### 10.1 Beredning av ympning

Gör en renodling på icke-selektiv agar av den mikrob som ska analyseras, exempelvis på TSB blodagar (streptokocker), FAA-agar (*H. somni*), eller CEM I -agar (*A. pleuropneumoniae* och *H. somni*). Inkubera odlingen enligt följande:

- icke-selektiv agar, icke krävande bakterier 35 ± 2°C/ 18 – 24 h
- icke-selektiv agar, flavobakterier som orsakar fisksjukdomar
  - F. psychrophilum* 15 ± 2 °C/ 48 – 72 h
  - F. columnare* 28 ± 2°C/ 24 – 48 h

- icke-selektiv agar, *A. salmonicida* och vissa andra fisksjukdomsbakterier (*Yersinia ruckeri*, *Listonella anguillarum*):  $22 \pm 2$  °C/ 24 – 48 h
- TSB blodagar, streptokocker:  $35 \pm 2$  °C/ 16-18 h (vid behov i en atmosfär med 3-7 % CO<sub>2</sub>)
- TSB blodagar, vissa atypiska *A. salmonicida*-stammar:  $22 \pm 2$  °C /24-48 h
- FAA-agar: *H. somni*  $35 \pm 2$  °C/ 20-24 h mikroaerobt
- CEM I -agar, *A. pleuropneumoniae* och *H. somni*,  $37 \pm 1$  °C/ 20-24 h i en atmosfär med 3-7 % CO<sub>2</sub>

Ympa bakteriemassa från minst 4 kolonier i 0,9 % NaCl-lösning eller icke-selektiv buljong så att suspensionens grumlighet motsvarar grumligheten i rör med McFarland 0.5. Då du bedömer grumligheten okulärt ska belysningen vara god och bakgrunden mörk. Observationen görs enklast då du jämför standard- och bakteriesuspensioner jämsides mot en svartvitrandig bakgrundsskiva. Grumligheten i McFarland-standarderna och bakteriesuspensionen kan också jämföras genom att mäta spridningen av båda med hjälp av en nefelometer. Bakteriesuspensionens mätvärde borde vara inom området 0,75 – 1,25 x standardens mätvärde.

## 10.2 Förberedelser

Torka vid behov (närmast de som har gjutits samma dag) plattornas ytor i 10-30 min före ympningen.

Låt doseraren värmas upp till rumstemperatur före användning. Sätt öppnade förpackningar med antibiotikalappar som har förvarats i kylskåp eller frys i rumstemperatur 1-2 timmar före användning.

## 10.3 Odling på resistensplatta och tillsats av antibiotikalappar

Välj resistensplatta:

- Müller-Hinton-II-agar (grundsubstrat)
- Müller-Hinton-agar, med 5 volymprocent fårblod, nöt- eller hästblod i vilket de röda blodkropparna har brutits ner: streptokocker, *P. multocida*, *M. haemolytica*, en del av atypiska *A. salmonicida*-stammar
- choklad-Müller-Hinton-agar: *H. somni*, *A. pleuropneumoniae*
- 1:7 Müller-Hinton-agar: *F. columnare*
- 1:7 Müller-Hinton-agar med fetalt kalvserum: andra flavobakterier som orsakar fisksjukdomar

Fukta en steril bomullspinne i suspensionen inom 15 minuter efter att den har framställts. Avlägsna överflödigt vätska genom att snurra pinnen mot rörets kant och odla en resistensplatta med pinnen t.ex. med hjälp av en drejskiva.

Om du odlar plattan för hand, ympa från bomullspinnen med en tät sicksackrörelse på plattan. Upprepa stryket två gånger i 60° vinkel jämfört med den föregående ympningen för att åstadkomma en jämn tillväxt.

Låt de ympade plattorna stå i rumsvärme i 3-5 min (högst 15 min) och sätt antibiotikalapparna på plattan. Placera lapparna på agar så stadigt som möjligt, de får

inte flytta på sig på agarens yta efter placeringen. Du kan kontrollera enligt följande att du har placerat dem rätt: sätt lapparna på plattan. Vänta i 15-20 sekunder och vänd plattan upp och ner. Lapparna ska hållas på plats på agaren. Sätt högst fem lappar på  $\varnothing$  9 cm platta, vid analys av streptokocker, *H. somni* och *A. pleuropneumoniae* fyra och vid analys av flavobakterier som orsakar fisksjukdomar högst två. Sätt plattorna i värmeskåp efter 15 minuter och inkubera dem upp och nedvända. Lämna luftutrymme mellan staplarna med plattor.

Inkubera plattorna vid  $35 \pm 2$  °C/16 - 18 h.

Undantag: inkubera

- streptokocker i en atmosfär med 3-7 % CO<sub>2</sub> 20-24 h
- *H. somni*- och *A. pleuropneumoniae* –odlingar i en atmosfär med 3-7% CO<sub>2</sub> 20-24 h
- *Pasteurella multocida* - ja *Mannheimia haemolytica* -odlingar 18-24 h
- *Aeromonas salmonicida* och *Listonella anguillarum* –odlingar vid  $22 \pm 2$ °C/ 24 (- 48) h
- *Y. ruckeri* –odlingar vid  $22 \pm 2$  °C/24 (-48) h
- *F. psychrophilum* –odlingar vid  $15 \pm 2$  °C/ 44-48 h och 68-72 h
- *F. columnare* –odlingar vid  $28 \pm 2$  °C/ 24-28 h och 44-48 h

Utläs resultaten för stafylokocker med lappar innehållande oxacillin och för enterokocker med lappar innehållande vankomycin efter 24 h inkubering. Utläs resultatet för *S. aureus* med cefoxitin efter 18 timmars inkubering och resultat för koagulasnegativa stafylokocker med cefoxitin efter 24 timmars inkubering (märk! Cefoxitin är inte lämpat för analys av meticillinresistens hos stammar av *S. pseudintermedius*). Om koagulasnegativa stafylokocker visar sig vara resistent redan efter 18 timmars inkubering behöver man inte fortsätta med inkuberingen.

## 11 Resultat

### 11.1 Avläsning av resultaten

Bakterietillväxten ska vara fortlöpande och jämn, och inhiberingszonernas kanter hela och så markerade som möjligt. Om tillväxten består av separata kolonier, gör ett nytt test.

Mät inhiberingszonens diameter med en millimeters precision från kanten på den klara inhiberingszonen, det vill säga den punkt där bakterieväxten försvagas skarpt. Välj mätpunkterna så, att de är så långt från de närliggande lapparna och plattans kant som möjligt. Ta med i inhiberingszonen området med den slöjliknande tillväxten och mycket små kolonier som finns på inhiberingszonens kant och som endast kan observeras med förstoringsglas.

Odlas och testa på nytt separata (även små) kolonier på den klara inhiberingszonens område. Sådana här kolonier kan vara ett tecken på heterogen resistens: endast en del av bakteriepopulationen i den ursprungliga ympningen är resistent, eller så växer bakteriecellen svagt då den visar resistens och bildar endast små kolonier. Då exempelvis eventuell meticillinresistens hos stafylokocker sållas med hjälp av lappar innehållande oxacillin, kan resistensen yttra sig som heterogen. Då du bestämmer meticillinresistens med hjälp av lappar innehållande oxacillin ska plattan läsas så att den släpper igenom ljuset.



Vankomycinresistens hos enterokocker och stafylokker kanske endast yppar sig på så sätt, att inhiberingszonens kant är oklar i jämförelse med inhiberingszonerna hos känsliga stammar.

Ämnen som är antagonistiska mot sulfa-trimetoprim (tymin, tymidin) kan sprida sig från icke-selektivt substrat, som kan orsaka slöjliknande växt på kanten till inhiberingszonen hos bakterier som annars är känsliga för sulfa-trimetoprim. Om det förekommer slöjlik tillväxt, mäts det område som inhiberingszon där tillväxtens täthet är högst 20 % av tätheten helt utanför inhiberingszonen.

Hos stammar som produceras penicillinas kan inhiberingscirkeln vara lika stor som hos stammar som inte producerar det, men inhiberingscirkelns kant kan vara ojämn och där kan finnas stora enskilda kolonier.

Vid testning av stammar av *Proteus* kan det förekomma spridande tillväxt inom en skarpt avgränsad inhiberingscirkel. Då mäts inhiberingszonen från kanten på den täta floran och den spridda tillväxten tas inte i beaktande.

## 11.2 Rapportering av resultaten

Jämför resultaten per antibiotika- och bakteriegrupper enligt bilagan 2. Ange som resultat diametern på den analyserade bakteriestammens inhiberingszon och dess resistens mot antimikrobiella medel: S (känslig, susceptible, sensitive), I (intermediär känslighet, intermediate/osäker) eller R (resistent, resistant). Vissa bakterier indelas endast i S- och R-grupper då det gäller vissa antibiotika. Det är överenskommet att även om bakterietillväxten når ända fram till lappen (stammen är helt resistent), så anges inhiberingscirkeln storlek med samma diameter som lappens (i allmänhet 6 mm).

Undersök produktionen av  $\beta$ -laktamas hos stafylokker enligt metodbeskrivning Evira 3566. Undersök vid behov till exempel oxacillinresistens hos stafylokker och vankomycinresistens hos enterokocker med hjälp av andra metoder. Beakta vid tolkningen bakteriens  $\beta$ -laktamasaktivitet och eventuell korsresistens avseende andra läkemedel. Om bakterien producerar  $\beta$ -laktamas, anges R som känslighetsresultat för penicillin, ampicillin och amoxicillin oberoende av resultatet med diskdiffusionsmetoden. Meticillinresistenta stafylokker anges som resistenta mot alla  $\beta$ -laktamer och  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamas-inhibitor kombinationer.

Om en bakterie är resistent mot erytromycin (R) och känslig för klindamycin (S), analysera inducerad klindamycinresistens enligt metodbeskrivning Evira 3564.

## 12 Validering av metoden

Metoden har validerats vid EELA år 2000.

### 13 Metodens status

Metoden ingår i en internationell methodsamling	X
Officiell metod	<input type="checkbox"/>
Intern metod	<input type="checkbox"/>

### 14 Metoder för kvalitetssäkring

Jämförande undersökningar mellan laboratorierna	X
Metodjämförelser	X
Användning av referensstammar/kontrollstammar	X
Ympade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>
Kontrollappar	<input type="checkbox"/>
Kontrollkort/häfte	<input type="checkbox"/>

### 15 Referenser

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; Approved Standard – Fourth Edition. CLSI Document VET01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; Second Informational Supplement. CLSI Document VET01-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

CLSI. Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline. CLSI document M42-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; First Informational Supplement. CLSI document M42/M49-S1. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI Supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016

### 16 Ändringar sedan föregående version

Föregående version Evira 3484/9.  
Inkuberings temperaturer har korrigerats enligt standarden.  
Punkter 9 och 12.1 har uppdaterats.

Anvisningen sammanställdes av: Anna-Liisa Myllyniemi  
Anvisningen uppdaterades av: Katariina Pekkanen, Suvi Nykäsenoja



## 17 Bilagor

Evira 3484/Bilaga 1 Godtagbara gränser för hämningszoner för ATCC kontrollstammar (hämningszonens diameter, mm) <sup>1,2</sup>

Evira 3484/Bilaga 2. SIR-gränsvärden av den diskdiffusionsmetoden <sup>1,2,3</sup>

## 18 Ansvariga

Helsingfors: Suvi Nykäsenoja, Katariina Pekkanen

Kuopio: Tarja Pohjanvirta

Uleåborg: Varpu Hirvelä-Koski

Seinäjoki: Mirja Raunio-Saarnisto