

Fræðsludagur Sýklafræðideildar  
14. janúar 2013

# NÆMISPRÓF MEÐ SKÍFUM

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/Manual\\_v\\_2.1\\_EUCAST\\_Disk\\_Test.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_2.1_EUCAST_Disk_Test.pdf)

Martha Á. Hjálmarsdóttir

# Efnistöð

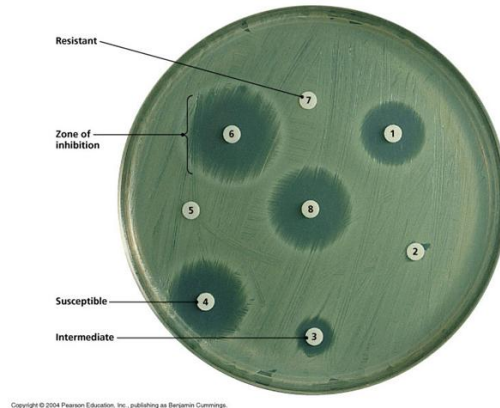
2

- Aðferðafræði
- Efni og aðferð
- Aflestur
- Vafamál við túlkun

# EUCAST - skífupróf

3

- Byggir á aðferð Kirby og Bauer
  - Þáttbundið flæðipróf
    - Niðurstöður eru S, I og R
    - Samspil flæðis lyfjanna og vaxtar bakteríanna
  - Aðferðin er í stöðugri þróun
    - Tekur betur og betur á þörfum bakteríutegunda, staðsetningu sýkingar og aðferð við lyfjagjöf
    - Viðmið eru í meira mæli tegundabundin og þess vegna þarf greining að liggja fyrir til að hægt sé að túlka niðurstöður mælinga
    - **Styrkur lyfja í skífum getur verið mismunandi eftir því hvaða tegundir eiga í hlut**



# EUCAST/ CLSI

4

- Aðferðafræðin við gerð prófanna er sú sama
- Í ýmsum tilvikum er styrkur lyfja í skífum mismunandi eftir því hvor staðallinn er notaður
- Munurinn liggur fyrst og fremst í mismuni á viðmiðunatóflum við túlkun niðurstaða
- Betri leiðbeiningar varðandi aflestur
- Báðar aðferðirnar fela í sér röð aðgerða til að staðla prófið og tryggja gæðin

# Mueller Hinton Agar

5

- Notaður fyrir þær tegundir sem þar geta vaxið
- Annars MH m/ 5% hestablóði og 20 mg/L  $\beta$ -NAD
- Gæðakröfur til stöðlunar ætis
  - $4 \pm 0,5$  mm þykkur - áhrif á sönustærðir
  - pH 7.2-7.4 - áhrif á sum lyf
  - Hæfilegur raki - áhrif á flæði og þéttni bakteríulausna
  - Thymidine og thymine - áhrif á sulfa, trimethoprim
  - Tvígildar katjónir - áhrif á sumar samsetningar
    - Aminoglycosid lyf og *Pseudomonas*
- Staðalstofnar eru notaðir til að tryggja gæði ætisins sem og annarra þátta við gerð prófsins

# Geymsla lyfjaskífa

6

- Rétt hitastig
  - Fryst við  $-20^{\circ}\text{C}$  nema annað sé tekið fram á umbúðum
    - Ef það er ekki hægt þá í kæli við  $8^{\circ}\text{C}$  eða lægra
  - Vinnubirgðir geymist í kæli við  $8^{\circ}\text{C}$  eða lægra
- Tekið úr kæli og látið ná stofuhita áður en geymsluhylki eru opnuð

# Stofninn

7

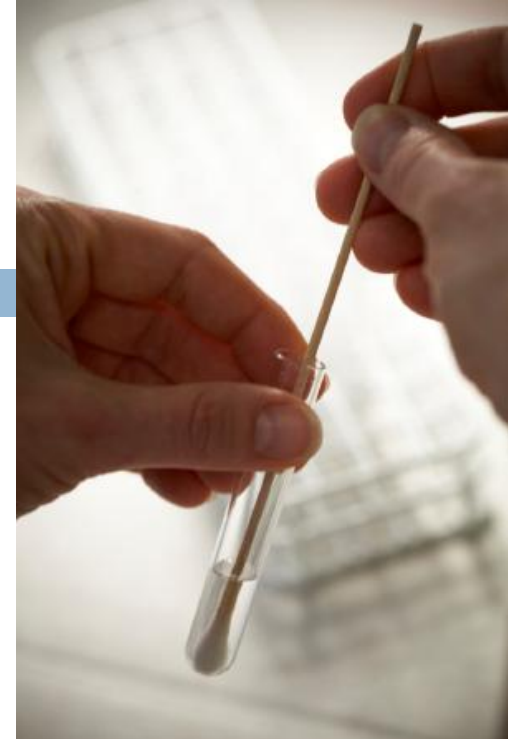
- Bakteríurnar þurfa að vera í góðu formi (log fasa)
  - ▣ Nýr gróður
  - ▣ Ekki af valæti
- Ná þarf fram breytileika ef hann er til staðar
  - ▣ Nokkrar stakar þyrpingar valdar



# Bakteríulausnir

8

- **Beint í saltvatn og lausn rétt stillt**
  - ▣ McFarland 0,5 - gruggstaðall
    - Jafngildir  $\sim 1-2 \times 10^8$  CFU/ml af *E.coli* ATCC 25922 (meðalstórar)
  - ▣ Stilling bakteríulausnar hefur áhrif á fjölda baktería í prófinu og þar með sönustærðir
    - Of margar  $\Rightarrow$  of litlar sönur
    - Of fáar  $\Rightarrow$  of stórar sönur eða of gisinn vöxtur

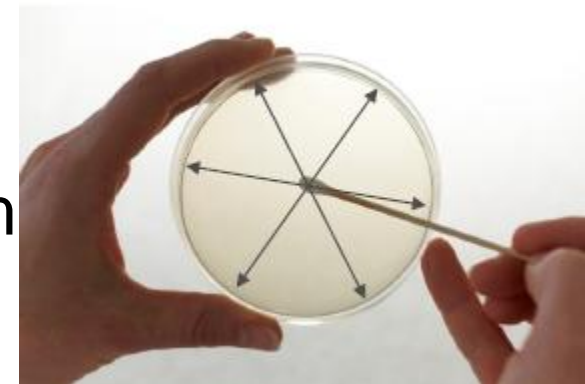




# Sáning á skálar

9

- **Best er að strjúka á skálar innan 15 mín**
  - ▣ Tryggir að bakteríufjöldinn í lausninni haldist
  - ▣ Ef lengri tími líður þarf að mæla þéttina aftur
- Dauðhreinsuðum bómullarpinna dýft í lausnina
  - ▣ Ofgnótt vökva pressuð úr pinnanum
    - Mikilvægt ef Gram neikvæðir stafir
- Hæfilega þurr agar strokinn þétt
  - ▣ Sáningartæki, rólega
  - ▣ Handvirkt, á þrjá vegu
    - Snúið um  $60^\circ$  eftir hvert skipti



# Lyfjaskífur

10

- **Lyfjaskífur eru settar á skálar innan 15 mínútna**
  - Tryggir að vöxtur byrji ekki áður en lyfið flæðir út í agarinn
- Skífunum er komið fyrir með jöfnu millibili
  - Ekki nær en 24 mm frá miðri skífu að miðju næstu
- Skífunum er þrýst á yfirborðið svo öll skífan snerti
  - Ekki hreyfa skífur því flæði byrjar mjög hratt



# Ræktun

11

- Skálar eru settar í hitaskáp innan 15 mínútna
  - Botninn vísi upp
  - Ef of langur tími líður geta lyfin flætt of mikið út í agarinn og það skekkir niðurstöður

# Ræktunartími og aðstæður

12

Venjulegt andrúmsloft 35±1° C 16-20 tímar	Koltvísýringur (CO <sub>2</sub> ) 35±1° C 16-20 tímar
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Pseudomonas</i>	Streptococcus gr A, B, C, G
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Viridans streptókokkar
<i>Acinetobacter</i>	<i>Haemophilus</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Enterococcus</i> (24 tímar fyrir glycopeptíð)	<i>Listeria monocytogenes</i>

# Lykilatriðin 15-15-15

13

- Sáð á skálar innan 15 mínútna frá því bakteríulausn var stillt
- Lyfjaskífur settar á skálar innan 15 mínútna frá því að sáð var á þær
- Ræktun í hitaskáp innan 15 mínútna frá því að lyfjaskífur voru settar á skálar

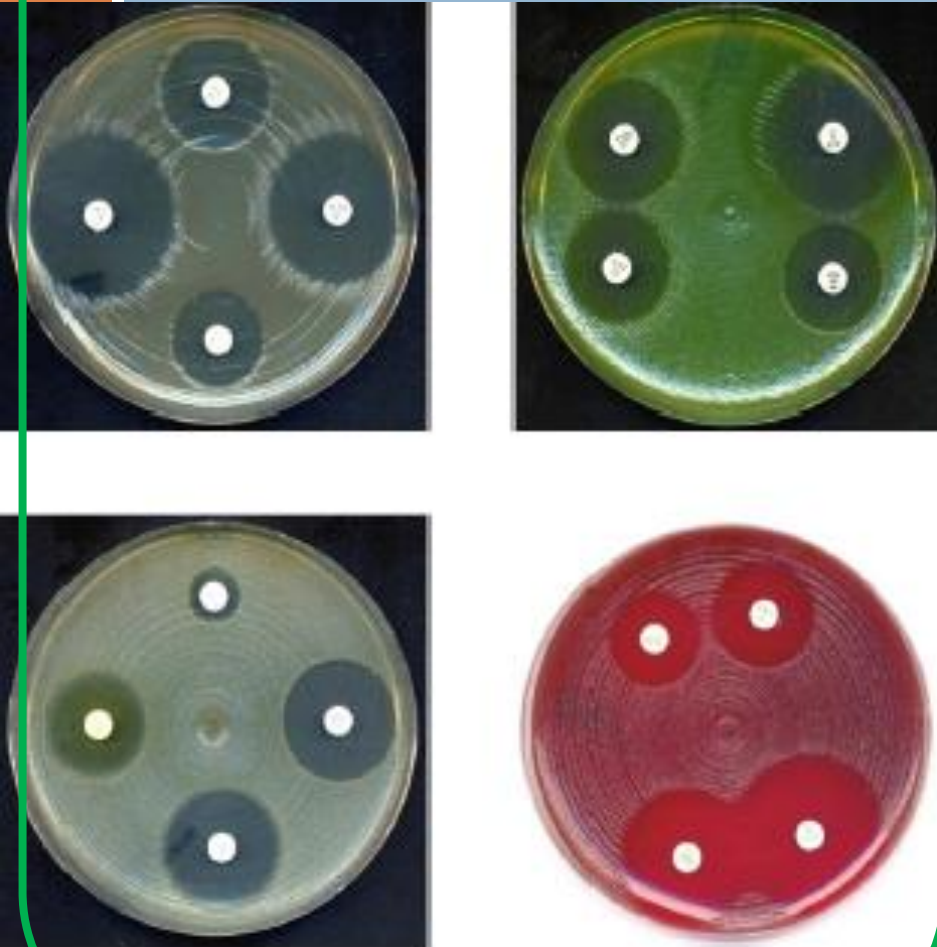
# Mat á gæðum fyrir aflestur

14

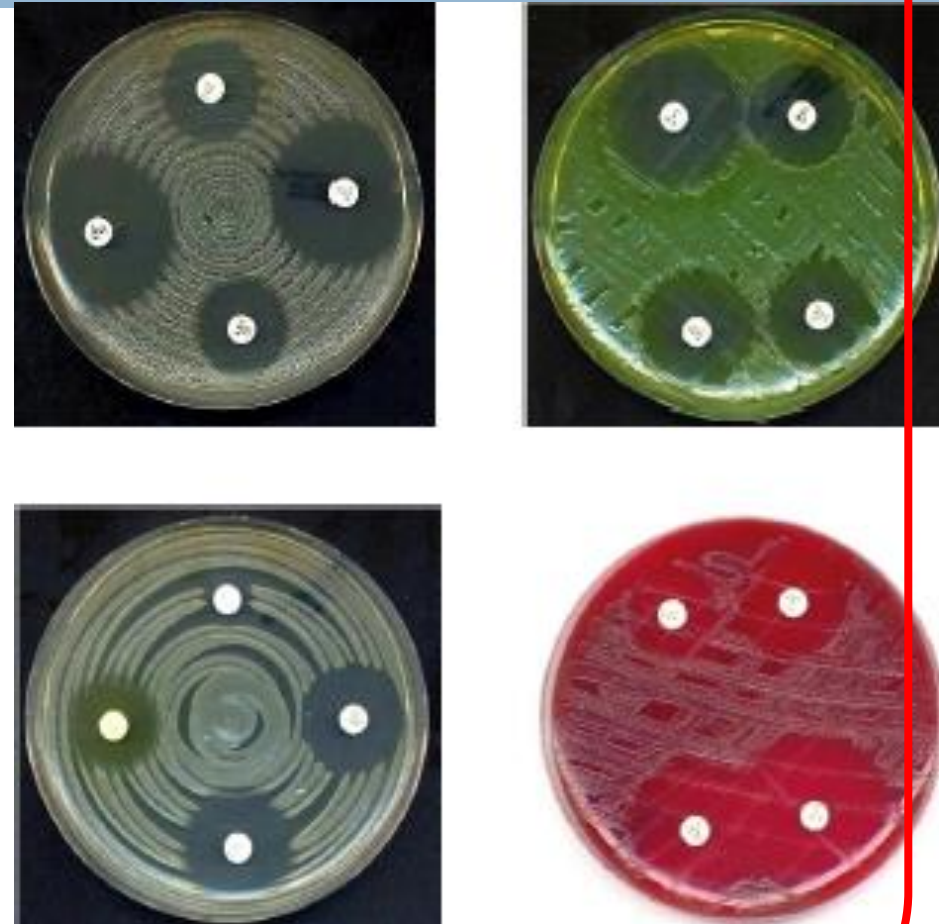
- Áður en mælt er eru gæði prófsins metin
- Rétt bakteríulausn og rétt sáning gefa samfelldan gróður
  - ▣ Hindrunarsvæði, sónur, eru reglulegar og hringlaga, gróður þéttur og jafn
  - ▣ Ef stakar þyrpingar eru sýnilegar hefur lausnin verið of þunn og þá þarf að endurtaka prófið
- Gæðakontról verða að vera í lagi

# Svona gróður

15



# Ekki svona





# Aflestur - tækni

16

- Á hreinum MH agar eru sónur mældar á botni lokaðrar skálar
  - Í góðu ljósi
  - Með dökkum bakgrunni
- Af bættum agar er sónur mældar í opinni skál
- Ekki láta ljós skína í gegn um skálina eða nota stækkunargler
- Þvermál hindrunarsvæða eru mæld í millimetrum og aðlagð næsta millimetra





# Aflestur - fjarlægð

17

- Hindrunarsvæði, sónur, allra lyfja eru mæld með því að hafa skálina í um 30 cm fjarlægð frá augum
  - Eðlileg lestrarfjarlægð



*E. coli*  
Ciprofloxacin



*S. aureus*  
Erythromycin



CoNS  
Trimethoprim

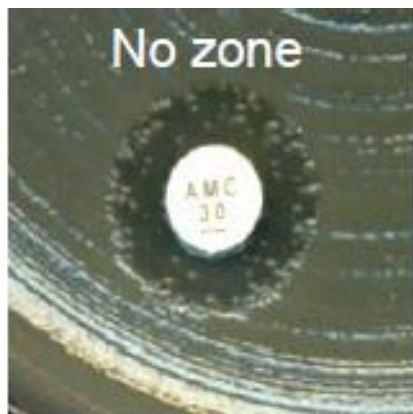


*S. pneumoniae*  
Rifampicin

# Vöxtur í sónum

18

- Almennt varðandi þyrpingar í sónum
  - Má lesa af ef þær eru utan viðmiðunarmarka
  - Greina hvort um mengun er að ræða eða ekki
  - Endurtaka næmispróf ef þetta er ekki mengun



# Innri sóna

19

- Aflestur þegar sannreynt hefur verið að ekki er um mengun að ræða
- Lesið er af frá innri sónu



# Þyrpingar flæða inn í sónur

20

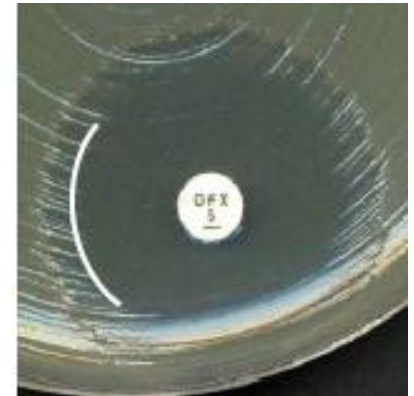
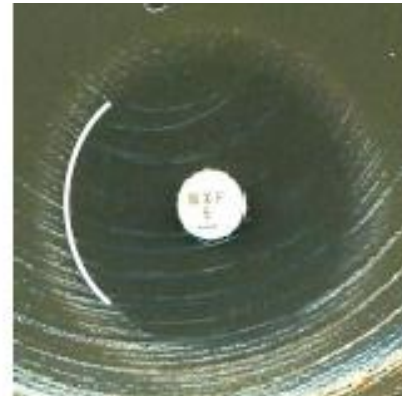
- Gerist sérstaklega hjá *Proteus*
  - ▣ Litið er fram hjá því og mælt frá brún sónunnar



# Loðnar brúnir - *Enterobacteriaceae*

21

- Ekki láta ljós skína í gegn um skálina eða nota stækkunargler
- Lesið þar sem allur gróður hættir



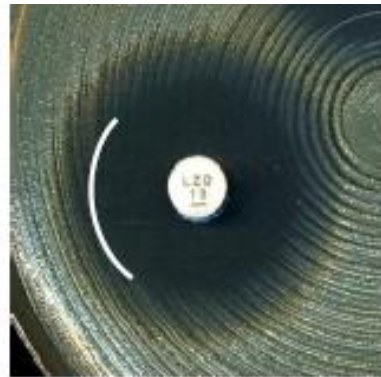
- Athugið að í næmisprófum fyrir Gram neikvæða stafi eru innifalin skimpróf fyrir ýmsa  $\beta$ -lactamasa
- Ef þau gefa vísbendingu þarf að gera staðfestingapróf



# Loðnar brúnir - *Staphylococcus*

22

- Ekki láta ljós skína í gegn um skálina eða nota stækkunargler
  - almenna reglan en undantekningar eru þar á



# Staphylococcus og benzylpenicillin

23

- Skífupróf eru áreiðanlegri til að greina myndun penicillinasa en MIC mæling
- Að því gefnu að sónustærðir séu mældar **OG** brúnir vandlega skoðaðar með því að bera skál upp í ljós

<26 mm=R



*S. aureus* with sharp zone edge and zone diameter  $\geq 26$  mm = Resistant



*S. aureus* with fuzzy zone edge and zone diameter  $\geq 26$  mm = Susceptible

# Staphylococcus og cefoxitin

24

- Greinleg sóna er mæld og vandlega skoðað í góðu ljósi hvort þyrpingar leynist inni í sönunni
- Linezolide sönur eru skoðaðar með því að bera skálina upp í ljós



# Loðnar brúnir – *S. pneumoniae*

25

- Litlar þyrpingar sem eru sýnilegar með berum augum eru ekki hindrun



# $\beta$ -hemólýsa

26

- Mæla frá hindrun gróðurs ekki hindrun hemólýsu
  - Venjulega fer þetta ekki saman
- Halla skálinni til að sjá betur vöxt og hemólýsu



*S. pyogenes*

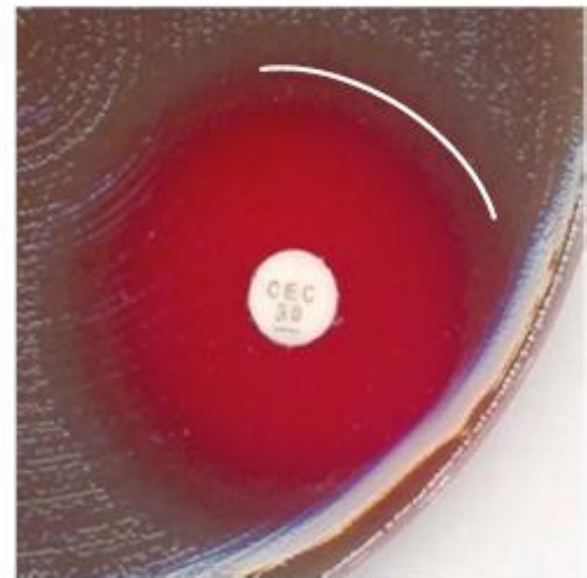


Streptococcus group C

# $\alpha$ -hemólýsa

27

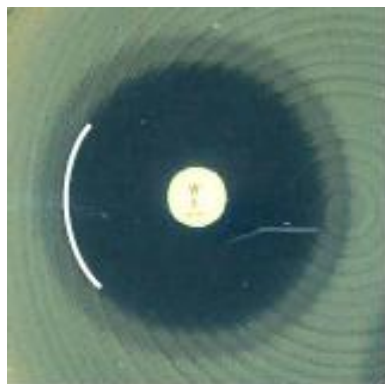
- Venjulega fer hindrun hemólýsu og gróðurs saman
  - Sérstaklega hjá *S. pneumoniae* með  $\beta$ -lactam lyfjum
- Halla skálinni til að sjá betur vöxt og hemólýsu



# Sulfa og trimethoprim

28

- Gróðrarslikja í sulfa og trimethoprim sónum
- Áhrif af thymidine og thymine í ætinu sem á að líta fram hjá og mæla þar sem brún er greinileg



*E. coli*



CoNS



*Moraxella*



*Haemophilus*



# *Stenotrophomonas* og sulfa-trim

29

- Algengt er að *Stenotrophomonas maltophilia* vaxi inni sulfa og trimethoprim í sónum
- Vöxturinn getur verið frá því að vera fíngerður upp í að vera býsna þéttur



An outer zone can be seen = Susceptible

Heavy growth  
up to disk  
=Resistant

# *Enterobacteriaceae* og ampicillin

30

- Slikja í ampicillin sónu geta komið fram í sumum lögunum MH og líta skal fram hjá því
  - ▣ Í öðrum lögunum kemur þetta ekki fram
  - ▣ Ekki er munur á ytri brún milli lagana



# *E.coli* og mecillinam

31

- Stakar þyrpingar *E.coli* í mecillinam sónu
  - ▣ Litið er fram hjá því og mælt frá brún



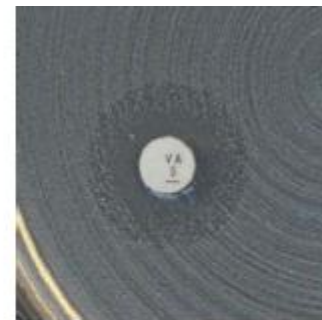
# Enterococcus og vancomycin

32

- Skoða vel brún sónu og bera skál upp í ljós
- Loðnar brúnir og stakar þyrpingar inni í sónu gefa vancomycin ónæmi til kynna
- Loðnar brúnir og sónur  $\geq 12$  mm benda til vancomycin ónæmis sem þarf að greina nánar



*E. faecalis*  
non-VRE



*E. faecium*  
VRE



# Samantekt

33

- Athugið rétt lyfjamagn sé í skífunum og rétt sáð
- Lesið af án stækkunar og í lestrarfjarlægð
- Hafið undantekningar frá meginreglum á hreinu



*E. coli*  
Ciprofloxacin



*S. aureus*  
Linezolid



*S. aureus*  
Erythromycin



Enterobacteriaceae  
Ampicillin



*S. pneumoniae*  
Chloramphenicol



*S. pneumoniae*  
Tetracycline



*S. pneumoniae*  
Cefactor

There is often growth within areas of  $\alpha$ -haemolysis!

# Túlkun næmisprófa

34

- Flett er upp í viðmiðunartöflu fyrir viðkomandi tegund/hóp hvernig túlka skuli niðurstöðuna miðað við sönustærð

Enterobacteriaceae			EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 2.0, valid from 2012-01-01			
Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)						
Medium: Mueller-Hinton agar						
Inoculum: McFarland 0.5						
Incubation: Air, 35±1°C, 18±2h						
Reading: Read zone edges as the point showing no growth viewed from the back of the plate against a black background illuminated with reflected light.						
Quality control: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922						
Penicillins <sup>1</sup>	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints Letters for comments on disk diffusion
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Benzylpenicillin	-	-	-	-	-	
Ampicillin	8 <sup>1</sup>	8	10	14 <sup>A,B</sup>	14 <sup>B</sup>	1/A. Wild type Enterobacteriaceae are categorised as susceptible to aminopenicillins. Some countries prefer to categorise wild type isolates of <i>E. coli</i> and <i>P. mirabilis</i> as Intermediate. When this is the case, use the MIC breakpoint S = 0.5 mg/L and the corresponding zone diameter breakpoint S = 50 mm. B. Ignore growth that may appear as a thin inner zone on some batches of Mueller-Hinton agars.
Ampicillin-sulbactam	8 <sup>1,2</sup>	8 <sup>2</sup>	10-10	14 <sup>A,B</sup>	14 <sup>B</sup>	2. For susceptibility testing purposes, the concentration of sulbactam is fixed at 4 mg/L.
Amoxicillin	8 <sup>1</sup>	8	-	Note <sup>C</sup>	Note <sup>C</sup>	C. Susceptibility inferred from ampicillin.
Amoxicillin-clavulanate	8 <sup>1,3</sup>	8 <sup>3</sup>	20-10	17 <sup>A,B</sup>	17 <sup>B</sup>	3. For susceptibility testing purposes, the concentration of clavulanate is fixed at 2 mg/L.
Piperacillin	8	16	30	18	15	
Piperacillin-tazobactam	8 <sup>4</sup>	16 <sup>4</sup>	30-6	20	17	4. For susceptibility testing purposes, the concentration of tazobactam is fixed at 4 mg/L.
Ticarcillin	8	16	75	23	23	
Ticarcillin-clavulanate	8 <sup>3</sup>	16 <sup>3</sup>	75-10	23	23	
Phenoxymethylpenicillin	-	-	-	-	-	
Oxacillin	-	-	-	-	-	
Cloxacillin	-	-	-	-	-	

# Gæðastjórnun

35

- Gæðastjórnun er hluti aðferðarinnar
- Markmiðið er að fylgjast með eftirfarandi þáttum:
  - Nákvæmni ferlisins við gerð næmisprófs
  - Virkni æta og prófefna í næmisprófinu
  - Frammistöðu þeirra einstaklinga sem framkvæma næmisprófin og lesa og túlka niðurstöður
- Nánar í fyrirlestri Guðrúnar Stefánsdóttur