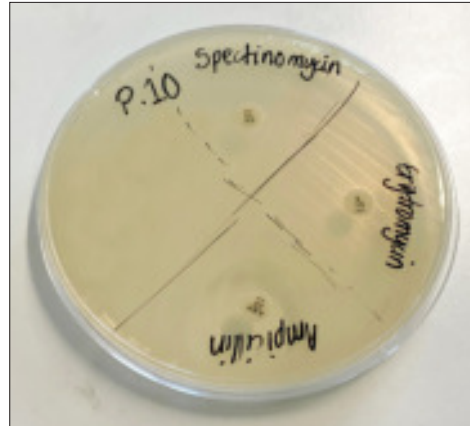


Urinvägsinfektion

– Resistensbestämning



Bakgrund

Urinvägsinfektion är relativt vanligt och orsakas av bakterier som tränger in i urinröret och vidare upp i urinblåsan. Om infektionen är begränsad till urinröret och urinblåsan kallas det blåskatarr. Blåskatarr läker vanligtvis ut av sig själv men kan ibland behöva behandlas med antibiotika. Ibland sprider sig infektionen till njurarna och njurbäckenet. Det ger njurbäckeninflammation som är allvarligare och måste alltid behandlas med antibiotika. Tyvärr har allt fler bakterier blivit resistenta mot olika sorters antibiotika. Genom att göra en resistensbestämning av de bakterier som orsakat infektionen kan man på förhand se om de är resistenta mot ett visst antibiotikum och till vilken grad, för att kunna ge patienten rätt behandling.

Uppgift

Du ska odla upp bakterier från ett "urinprov" och testa några olika sorters antibiotika för resistensbestämning.

Definitioner för resistens hos mikroorganismer (SIR-systemet)

S=Susceptible (känslig vid normal dosering)

En mikroorganism kategoriseras som "känslig vid normal exponering" när sannolikheten för framgångsrik behandling är hög vid normal dosering av medlet. Infektionen kan förväntas svara på behandling av detta antibiotikum vid dosering rekommenderad för denna typ av infektion. Bakterien har inga påvisade resistensmekanismer mot medlet.

I=Intermediate (känslig vid ökad exponering)

En mikroorganism kategoriseras som "känslig vid ökad exponering" när sannolikheten för framgångsrik behandling är hög om exponeringen för medlet ökas genom ändrad dosering eller genom att medlet koncentreras i infektionshärden. Det kan behövas dosjustering eller förändring av administrationssätt. Behandlingseffekten med detta medel är osäker. Bakterien har förvärvat låggradig resistens mot medlet eller har naturligt lägre känslighet för medlet.

R=Resistent:

En mikroorganism kategoriseras som "resistent" när sannolikheten för framgångsrik behandling är låg även om exponeringen för medlet ökas. Klinisk effekt av behandling med detta medel är osannolik. Bakterien har förvärvat betydelsefulla resistensmekanismer eller är naturligt resistent mot medlet.

Definitioner:

<https://www.sls.se/raf/resistensbestamning/definitioner/>

<https://anvisningar.se/Anvisningar/Klinisk-mikrobiologi/A/Antibiotika---resistensbestamning-av-bakterier/>

Säkerhet

- Iakttag god laborativ mikrobiologisk teknik.
- Använd endast klass-1-organismer.
- Var uppmärksam så att inte spritlösningen antänds då utrustningen ska sterileras. Ha alltid ett lock tillgängligt för att kväva eld.

Dag 1- renodling av urinprov

Material

- 1 "urinprov"
- Ympnål i metall eller engångsympnålar i plast
- 1 agarplatta
- Märkpena
- 70% spritlösning
- Brännare + tändstickor vid användning av ympnål av metall
- Bägare för uppsamling vid användning av engångsympnål

Utförande - utstryk

1. Tvätta händerna med tvål och vatten. Torka av bänkytan med 70% spritlösning.
2. Märk undersidan av agarplattan med namn och provnummer som står på "urinprovet".
3. Om du använder en ympnål av metall: Doppa ympnålen i spritlösningen och bränn hastigt av metallskafvet på ympnålen och glödga platinaöglan i gaslågan. Håll öglan nästan lodrätt i lågan så att hela metalltråden glödgas samtidigt. Obs! Öglan måste svalna innan den doppas i bakterieprovet! Håll den i luften så att den svalnar eller låt den varma öglan svalna genom att hålla den vid kanten mot ett sterilt parti av agarytan i en petriskål. Alternativt använd en steril engångsympnål.
4. Doppa en steril ympnål i urinprovet. Gör ett primärstryk genom att stryka ut bakterierna i ett sicksackmönster över en del av agarytan, se figur 1 nedan. Sätt på locket. Sterilisera ympnål av metall enligt punkt 3 eller släng engångsympnålen i avsedd behållare.
5. Ta en ny ympnål om du använder engångs. Gör ett sekundärstryk genom att dra den sterila ympnålen en gång över utstryk 1 och stryk ut i ett sicksackmönster över en del av den rena agarytan, se figur 2 nedan. Sätt på locket. Sterilisera ympnål av metall enligt punkt 3.
6. Vänd på ympnål om du använder engångs. Dra den sterila ympnålen en gång över utstryk 2 och gör ett tertiärutstryk i ett sicksackmönster över en del av den rena agarytan, se figur 3 nedan. Sätt på locket. Sterilisera ympnål av metall enligt punkt 2 eller släng ympnålen om du använder en steril engångsympnål i avsedd behållare.
7. Ställ in plattan med locket nedåt i inkubatorn (37 °C) över natt.



Figur 1: Första utstryket.



Figur 2: Andra utstryket.



Figur 3: Enskilda bakteriekolonier har bildats efter inkubation där det tredje utstryket har gjorts.

Dag 2 - resistensbestämning

Material

- Renkultur på agarplatta från dag 1
- 1 agarplatta
- Sterila bomullspinnar
- Antibiotikalappar (för några olika sorters antibiotika)
- 1 eppendorfrör med steril NaCl (0,9%)
- Antibiotikalappar

Utförande

1. Tvätta händerna med tvål och vatten.
2. Torka av bänkytan med 70% spritlösning.
3. Märk agarplattan på sidan eller på kanten av undersidan med provnummer och dina initialer.
4. Överför med en steril ympnål cirka 4 bakteriekolonier från din bakterieodling till ett eppendorfrör med 0,5 ml steril 0,9% NaCl-lösning. (För att sterilisera ympnålen se punkt 3, Dag1)
5. Slamma upp bakterierna med hjälp av att ympnålen, vrid den i lösningen så att du får en jämn suspension. Vissa bakteriekolonier kan vara svåra att slamma upp, använd en mikropipett med steril spets för att pumpa upp och ner några gånger eller använd en Vortexapparat.
6. Tag en steril bomullsarmerad pinne och doppa i bakteriesuspensionen. Sprid ut bakteriesuspensionen med bomullspinnen TÄTT på en ny agarplatta enligt nedan:
 - a. Börja med att stryka ett kors diagonalt över plattan
 - b. Stryk tätt på översta halvan av plattan
 - c. Vänd 90 ° och stryk över den nu övre halvan
 - d. Vänd 90 ° och stryk över den nu övre halvan
 - e. Vänd 90 ° och stryk över den nu övre halvan
7. Markera på undersidan av agarplattan vilka antibiotikalappar du placerar (se bild på första sidan för exempel). Skriv i kanten av agarplattan.
8. Fördela antibiotikalapparna jämnt på agarplattan med en steril pincett eller en blodlancett. Inte för nära kanten! Tryck försiktigt **på** lapparna med pincetten/lancetten så att de kommer åt bakterierna men nudda inte agarn utanför själva lappen.
9. Ställ agarplattan i rumstemperatur med locket uppåt i ca 30 min så att antibiotikan kan diffundera ut i agarn.
10. Inkubera agarplattan i 37°C med locket uppåt till nästa dag då hämningszonernas storlek avläses.

Dag 3 - Avläs resultat

På agarplattorna har du placerat olika antibiotikalappar. Om det bildats en zon runt en antibiotikalapp där det inte växer några bakterier kallas det för en hämningszon. Hämningszonernas diameter ger ett mått på hur känslig bakterien är för ett specifikt antibiotikum. Genom att jämföra hämningszonernas diameter med en standardtabell kan man bestämma känsligheten enligt SIR-systemet (se faktaruta på första sidan). Bakterierna kan antingen vara S=känslig, I=intermediär eller R=resistent för de antibiotika som testats.

Material

- Agarplatta från dag 2
- Skjutmått
- Standardtabell för SIR-värden (se nedan)

Utförande

Lägg plattan med agarsidan mot dig och locket nedåt mot bänken. Hämningszonens diameter mäts med ett skjutmått (mm) och mäts som diametern av den hämmade zonen. Om ingen hämningszon finns (d.v.s att bakterierna har växt helt intill lappen) så anges det som diametern 0 mm. Mät alla hämningszonerna och beräkna känsligheten med hjälp av tabellen här nedanför. Plattorna ska inte öppnas. Läs om definitioner av S, I och R på första sidan.

Antibiotika	S = känslig	I= intermediär	R= resistent
Kloramfenikol	> 17mm	17mm	< 17mm
Gentamicin	> 17mm	17mm	< 17mm
Ampicillin	≥ 14mm	-	< 14mm
Trimethoprim	≥18mm	15-18mm	<15mm
Cefotaxime	≥ 20mm	17-20mm	< 17mm
Doxycycline	≥22mm	19-22mm	<19mm

Tabellen visar värden för *E.coli* och bestäms av EUCAST (<https://www.eucast.org>) som sätter brytpunkter och bestämmer SIR-värden i Europa. Tabellen för bakterier och antibiotika finns under "Clinical breakpoints". (Värdena är från 2021.)

- *Jämför tabellen med dina resultat.*
- *Vilken antibiotika skulle du rekommendera till din patient?*

Fundera på följande frågor

1. Föreställ er en situation då en patient kommer in med symptom för en bakterieinfektion:
 - I vilka fall fungerar denna metod som ni har genomfört bra? I vilka situationer kan det bli problem?
2. Antibiotika kan delas in i två större grupper; bred- och smalspektrum.
 - Om ett test likt detta görs hos läkaren hur påverkar det val av antibiotika?
 - Vilka konsekvenser får det på antibiotikaanvändningen om denna metod är den *enda* som är möjlig?
 - Förslag på åtgärder?