Verfahren für die Suszeptilitätstestung von geeigneten Bakteriophagen bei multiresistenten Erregern

Inhaltsverzeichnis

0. Änderungshistorie 2
1. Begriffsbestimmungen und Abkürzungen 2
2. Zweck und Anwendungsbereich 2
3. Zuständigkeiten 2
4. Beschreibung und Durchführung des Laborprozesses 2
Benötigte Geräte/ Materialien 2
Vorbereitung 3
Durchführung 4
Bemerkungen 7
Limitationen 8
Dokumentation 8
Qualitätskontrolle 8
5. Literaturangaben 8
6. Anhang oder Anlagen 8
7. Mitgeltende Dokumente 8

erstellt von:	geprüft von:	QM-Konformität:	genehmigt von:	Gültig für:	gültig ab:	ungültig ab:	ausgegeb. Exemplare:
HB Leddin				Abt. XXI			1

0. Änderungshistorie

1. Begriffsbestimmungen und Abkürzungen

Begriffsbestimmungen und Abkürzungen sind dem Qualitätsmanagementhandbuch zu entnehmen.

2. Zweck und Anwendungsbereich

Die vorliegende Laboranweisung regelt das Vorgehen bei Bakteriophagen-Resistenztestungen von Erregern. Diese erfolgt nur in Ausnahmefällen auf besondere Anweisung des Laborarztes hin.

3. Zuständigkeiten

Die Zuständigkeiten sind dem Anhang 2 des QMH zu entnehmen.

4. Beschreibung und Durchführung des Laborprozesses

Benötigte Geräte/ Materialien

- **Flüssigmedium**
  Müller-Hinton Medium (BD)
  (22 g/l Müller-Hinton Broth (BD 212322) in VE-H_2O)

- **Agarplatten (Bottom Agar)**
  Müller-Hinton Agarplatten (Biomerieux)
  (1,5 % Agar (OXOID LP0011) und 22 g/l Müller-Hinton Broth (BD 212322) in VE- H_2O)
  - Bemerkungen: Bei gekühlter Lagerung der Agarplatten müssen diese zunächst auf Raumtemperatur gebracht werden

- **Softagar (Top Agar)**
  Müller-Hinton Softagar (hergestellt durch Abt. A ZINST Kiel Ast. Berlin)

(0,5% Agar (OXOID LP0011) und 22 g/l Müller-Hinton Broth (BD 212322) in VE- H_2O PH-Wert 7,3)
in Kulturröhrchen (16 x 100mm, mit kappe) à 3 ml

- Frischer Ausstrich des Bakterienstammes auf Agarplatte (nicht älter als 4 Tage)
- Phagensuspension, Lagerung bei 4-8°C
- Wasserbad zum Erhitzen des Softagars
- Heizblock, auf 48°C vortemperiert
- Kolbenhubpipette, 20-200 µl
- Kolbenhubpipette 100-1000 µl
- Transferpipetten 3,5 ml
- Mehrkanalpipetten, 0,5-10 µl
- Impfösen
- Sarstedt-Röhrchen, 3,5 ml zum Verdünnen
- Mikrotiterplatten

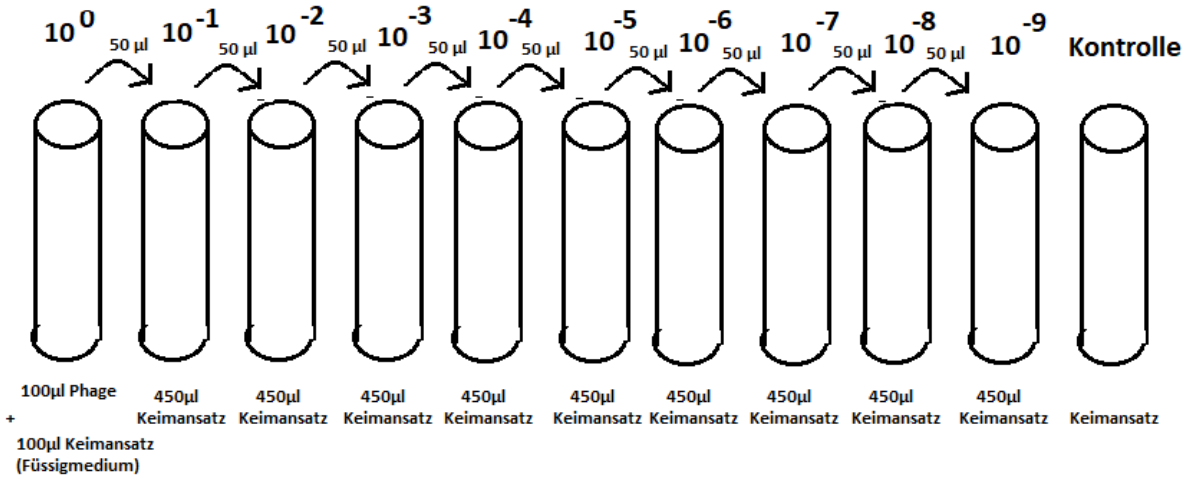
Vorbereitung

- gewünschter Test- oder Kontrollkeim von Agarplatte mit Impföse abnehmen und in Flüssigmedium (5ml) überführen
  - dabei Füllstand der Bouillon beachten da dieser teilweise abweicht
- beimpfte Bouillon dann 16-24 h im Brutschrank bei 36°C bebrüten

Durchführung

- **Ansatz der Verdünnungsreihe**

  Mischen von Phagensuspension und Testkeim (Flüssigmedium) McFarland 2,6-3,0 in Sarstedt-Röhrchen 3,5ml mittels Kolbenhubpipette
  Erstellen der Verdünnungsstufe 10^0 durch Mischen von 100µl Phagensuspension und 100µl Testkeimansatz (Flüssigmedium)
  Erstellen weiterer Verdünnungsstufen durch vermischen von 50µl der Vorverdünnungsstufe mit 450µl Testkeimansatz
  Pipettenspitzen sind zwischen den Stufen zu wechseln



10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	Kontrolle
100µl Phage+ 100µl Testkeim (Flüssigmedium)	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	50µl Vorstufe+ 450µl Testkeim	Testkeim (Flüssigmedium)

- **Klassischer Agar Overlay Assay**

  Wenig Material einzelner Kolonien des Bakterienstammes werden mit einer Impföse von einem frischen Ausstrich in 5 ml Flüssigmedium gebracht und stammspezifisch inkubiert (37°C)
  Füllstand kontrollieren da dieser abweichen kann

Von der Phagensuspension wird eine serielle Verdünnungsreihe in Sarstedt-Röhrchen 3,5 ml angelegt mit beimpften Flüssigmedium (bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-9}). Die Verdünnung wird in dem Medium durchgeführt, welches auch für die Stammanzucht verwendet wird .
Top Agar auf 95°C erhitzen (bis Agar sich verflüssigt)
und bei 48°C im Heizblock temperieren
(nach 3 min von 95°C auf 48°C)
Nun werden je Platte 100 µL der unterschiedlichen Verdünnungsstufen dieser Kultur in den Top Agar pipettiert**,** durch leichtes Schwenken gemischt (Phagen nie vortexen oder starken Scherkräften aussetzen) und sofort gleichmäßig auf dem Bottom Agar verteilt
Nach dem Verfestigen des Top Agars (ca. 5 min) werden die Platten **upside-down** (Deckel zeigt nach Oben) bei stammspezifischen Bedingungen für 16 - 24h inkubiert (meist 37°C)
Am folgenden Tag werden die Plaques einer geeigneten Verdünnungsstufe gezählt und der Titer anhand der folgenden Formel berechnet:

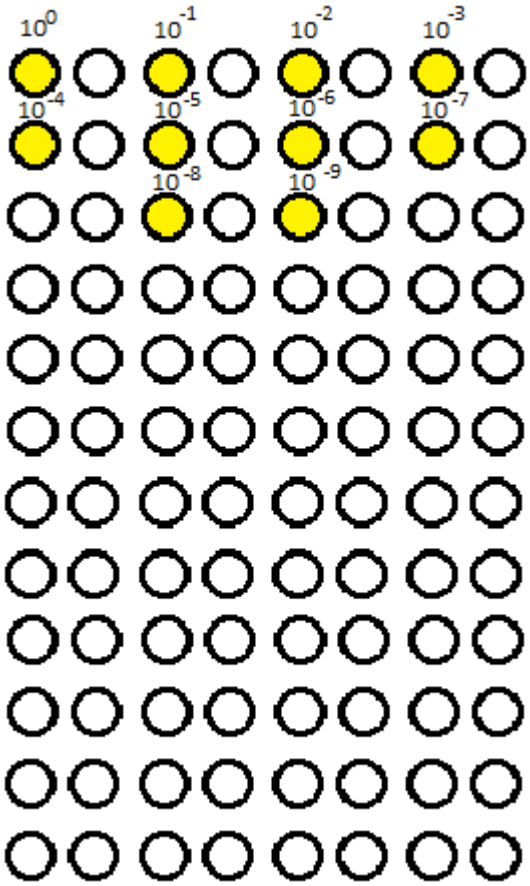
*Titer [PFU/ml] = (Anzahl der Plaques/Platte * Verdünnungsfaktor) / 0,1 ml*

Titerbestimmung ggf. durch Berechnung des Mittelwertes der Verdünnungsstufen 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} und 10^{-7}.

- **Spot Assay**

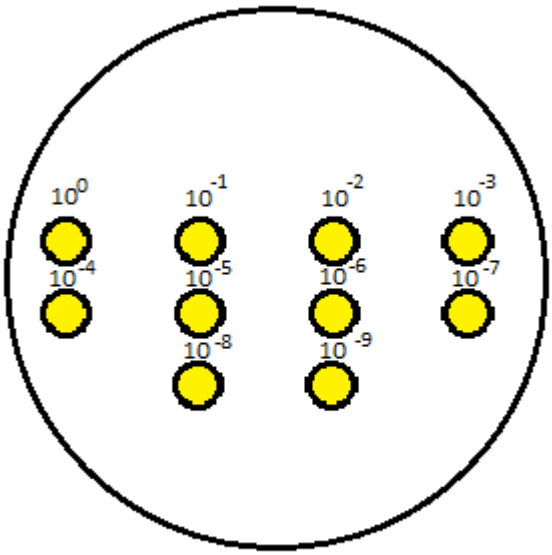
  Wenig Material einzelner Kolonien des Bakterienstammes werden mit einer Impföse von einem frischen Ausstrich in 5 ml Flüssigmedium gebracht und stammspezifisch inkubiert (37°C,)
  Füllstand kontrollieren da dieser abweichen kann
  Von der Phagensuspension wird eine serielle Verdünnungsreihe in Sarstedt-Röhrchen 3,5 ml angelegt (bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-9}). Die Verdünnung wird in dem Medium durchgeführt, welches auch für die Stammanzucht verwendet wird.

Die Verdünnungsreihe wird wie folgt in eine sterile Mikrotiterplatte überführt. (10-15µl)



Top Agar auf 95°C erhitzen (bis Agar sich verflüssigt)
und bei 48°C im Heizblock temperieren
(nach 3 min von 95°C auf 48°C)
Von dem Beimpften Flüssigmedium werden je Platte 100 µL dieser Kultur in den Top Agar pipettiert, durch leichtes Schwenken gemischt und sofort gleichmäßig auf dem Bottom Agar verteilt
Nach dem Verfestigen des Top Agars (ca. 5 min) werden mit Hilfe einer Mehrkanalpipette je 5 µl der Verdünnungsstufen auf die Double Agar Platten getropft.

Das Pipettierschema ist dabei wie folgt:



Nach dem Antrocknen der Spots werden die Platten **upside-down** bei stammspezifischen Bedingungen für 16 - 24h inkubiert (meist 37°C)
Am folgenden Tag werden die Plaques einer geeigneten Verdünnungsstufe gezählt und der Titer anhand der folgenden Formel berechnet:

Titer [PFU/ml] = (Anzahl der Plaques/Spot Verdünnungsfaktor) / 0,005 ml*

Bemerkungen

Für eine initiale Titerbestimmung einer Phagensuspension sollten aus allen Verdünnungen Assay-Platten hergestellt werden. Als Kontrolle sollte eine Platte ohne Zugabe von Phagen hergestellt werden.
Die Methode ermöglicht neben der Titerbestimmung:

- die Beurteilung der Homogenität der Plaquemorphologie
- die Einschätzung der bakteriellen Phagenresistenzentwicklung
-

Die Bestimmung der EOP (efficiency of plating), sofern der Titer einer Phagensuspension auf verschiedenen Bakterienstämmen ermittelt wird. Die EOP kann im Zusammenhang mit dem Phagogramm eingesetzt werden, um die Effizienz eines Phagen auf dem zu testenden Patientenisolat zu bestimmen. Dazu sollten die eingesetzten Lysate auf möglichst identische Titer eingestellt werden.

Limitationen

Der Spot Assay ist bei Phagen mit sehr großen Plaques nicht durchführbar, da keine Einzelplaques detektierbar sind.

Dokumentation

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt ausschließlich in der Labor - EDV. Klinisch nichtrelevante Resistenztestungen werden auf Anweisung des Prüfleiters im Befund gesperrt.

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle wird parallel zum Patientenerreger mittels geeigneter ATTC-Stämme durchgeführt. (noch zu untersuchen ob möglich)

5. Literaturangaben

entfällt

6. Anhang oder Anlagen

entfällt

7. Mitgeltende Dokumente

F XXX XXX