

Alex Ravn Winther  
Kokob Araya  
Maryama Yusuf  
Sara Filippini

# Synergitestning av ceftazidim- avibaktam og aztreonam med disk diffusjons- og disk elueringsmetoden

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag  
Veileder: Mariann Unhjem Wiik, Einar Nilsen og Siv Juul Abelseth  
Mai 2024



Alex Ravn Winther  
Kokob Araya  
Maryama Yusuf  
Sara Filippini

# **Synergitestning av ceftazidim- avibaktam og aztreonam med disk diffusjons- og disk elueringsmetoden**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag  
Veileder: Mariann Unhjem Wiik, Einar Nilsen og Siv Juul Abelseth  
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag Ålesund



**NTNU**

Kunnskap for en bedre verden





## Sammendrag

Carbapenemase-produserende Enterobacteriales (CPE) har blitt en stor global utfordring, og er ofte resistente mot de mest brukte antibiotikatyperne. Kombinasjonsbehandling med flere ulike antibiotika kan være en mulighet for behandling. Kombinasjonen av ceftazidim-avibaktam og aztreonam har vist seg til å ha effekt mot de fleste CPE. For å vurdere mulig effekt av kombinasjonsbehandlingen er det ønskelig at det mikrobiologiske laboratoriet har en pålitelig metode for synergitestning.

Denne oppgaven ble tildelt av Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi (AMM) i Molde og Ålesund, etter ønske om å validere en metode som laboratoriene kan bruke til synergitestning. Hensikten med oppgaven er å teste metodene disk eluering og disk diffusjon, for å finne ut hvilken av de som er mest egnet og pålitelig for synergitestning.

20 ESBL<sub>CARBA</sub> stammer, ti ESBL<sub>A/M</sub> stammer og ti negative kontrollstammer ble testet ved begge metodene. Det ble utført en riktighets-, reproduserbarhets- og repeterbarhetsforsøk for å teste metodene.

Dette forsøket viste at disk diffusjonsmetoden er mer reproduserbar mellom laboratorier enn disk elueringsmetoden. Resultater fra reproduserbarhets- og repeterbarhetsforsøk viste lite innen-serie og mellom-serie variasjon med begge metodene. Observasjoner med hensyn til praktisk egenhet tyder på at det er rimeligere og mer tidsbesparende å bruke disk diffusjonsmetoden. Dermed ble det konkludert med at disk diffusjonsmetoden er mer hensiktsmessig å benytte ved AMM i Molde og Ålesund til synergitestning, enn disk elueringsmetoden.

## Abstract

Carbapenem-producing Enterobacteriales (CPE) have become a major global challenge and are often resistant to the most commonly used types of antibiotics. Combination therapy using multiple different antibiotics may be a potential treatment option. Specifically, the combination of ceftazidime-avibaktam and aztreonam has proven effective against most CPE strains. To assess the potential effect of the combination therapy, it is desirable for the microbiological laboratory to have a reliable method for synergy testing.

This project was assigned by the Department of Medical Microbiology (AMM) in Molde and Ålesund, following a request to validate a method that the laboratories can use for synergy testing. The purpose of the project is to test the disk elution and disk diffusion methods to determine which is the most suitable and reliable for synergy testing.

20 ESBL<sub>CARBA</sub> strains, ten ESBL<sub>A/M</sub> strains, and ten negative control strains were tested using both methods. Accuracy, reproducibility, and repeatability tests were conducted to assess the methods.

This study showed that the disk diffusion method is more reproducible across laboratories than the disk elution method. Results from the reproducibility and repeatability tests showed little within-series and between-series variation with both methods. Observations regarding practical convenience suggest that the disk diffusion method is more cost-effective and time-saving. Therefore, it was concluded that the disk diffusion method is more appropriate for use by AMM in Molde and Ålesund for synergy testing than the disk elution method.

## Forord

Denne bacheloroppgaven ble skrevet som et avsluttende prosjekt av bioingeniørutdanning ved NTNU i Ålesund. Oppgaven ble gitt av Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi i Molde og Ålesund. Etter ønske fra laboratoriet ble to metoder testet for å finne ut hvilken er mest egnet og pålitelig for synergitestning av Ceftazidim-avibaktam og Aztreonam i behandling av ESBL<sub>CARBA</sub> produserende Enterobacterales.

Denne bacheloroppgaven ble valgt på grunn av vår interesse for fagfeltet mikrobiologi. Vi ønsket å sette oss inn i et dagsaktuelt problem gjennom samarbeid med sykehusets laboratorier. Denne oppgaven har stor relevans innenfor bioingeniørutdanningen fordi den gir oss verdifull praktisk erfaring i arbeid med resistente bakteriestammer. I tillegg har vi anvendt den teoretiske kunnskapen om antibiotikaresistens, som vi har tilegnet oss i utdanningsløpet, for å løse oppgaven. Arbeidet med denne bacheloroppgaven har hjulpet til å forberede oss for den fremtidige yrkesrollen, hvor utfordringer knyttet til multiresistente stammer blir stadig mer relevante.

Vi vil rette en stor takk til vår faglig veileder Einar Nilsen, som har veiledet oss gjennom alle faglige utfordringer. En spesiell takk går også til vår praktiske veileder, Siv Abelseth Juul, for hennes støtte, veiledning i laboratoriearbeidet og tilgjengelighet for å svare på spørsmål. Videre, en stor takk til vår skriftlige veileder, Mariann Unhjem Wiik, for hennes tilbakemeldinger og verdifull veiledning gjennom skriveprosessen.

Til slutt ønsker vi å rette en stor takk til Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi i Ålesund for å ha tildelt oss denne spennende oppgaven, og for muligheten til å utføre det praktiske arbeidet ved deres laboratorium.

## Ordforklaring

AMM: Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi

ATM: Aztreonam

Cohens kappa-verdi ( $\kappa$ -verdi): En type korrelasjonskoeffisient som kan benyttes til vurdering av samsvar mellom positive og negative svar

CPE: Carbapenamase-produserende Enterobactriales

CV%: Variasjonskoeffisient

CZA: Ceftazidim-avibaktam

ESBL: Extended spectrum betalactamase (betalaktamaser med utvidet spektrum)

ESBL<sub>AM</sub>: ESBL som er resistente mot pencilliner og cefalosporiner, men ikke carbapenemer

ESBL<sub>CARBA</sub>: ESBL som er resistente mot carbapenemer

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

IDSA: Infectious Disease Society of America

K-res: Det nasjonale kompetansesenteret for påvisning av antibiotikaresistens ved Universitetssykehus Nord-Norge i Tromsø (UNN)

MBL: Metallo-betalaktamase

NKK: Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll

Repeterbarhet: (Innen-serie impresisjon) er overenstemmelse mellom resultatene av påfølgende målinger av samme målestørrelse utført under samme målebetingelser

Reproduserbarhet: (Mellom-serie impresisjon) er overenstemmelse mellom resultatene av påfølgende målinger av samme målestørrelse utført under endrete målebetingelser

Riktighet: Grad av overenstemmelse mellom verdier fremskaffet i undersøkelse og fasitverdier fra en referansem metode

# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Forord</b> .....	iii
<b>Ordforklaring</b> .....	iv
<b>Liste over figurer og tabeller</b> .....	3
<b>1. Introduksjon</b> .....	4
<b>1.1 Bakgrunn og problemstilling</b> .....	4
<b>1.2 Teori</b> .....	5
<i>1.2.1 Enterobacteriales</i> .....	5
<i>1.2.2 Antibiotika</i> .....	5
1.2.2.1 Betalaktamer.....	6
<i>1.2.3 Antibiotikaresistens</i> .....	8
1.2.3.1 Betalaktamaser og ESBL .....	9
<i>1.2.4 Betalaktamasehemmere</i> .....	11
<i>1.2.5 Kombinasjonsbehandling og synergi</i> .....	12
<i>1.2.6 Resistensbestemmelse</i> .....	12
<i>1.2.7 Prinsippet for de utvalgte metodene</i> .....	14
1.2.7.1 Disk eluering .....	14
1.2.7.2 Disk diffusjon .....	14
<i>1.2.8 Andre studier</i> .....	15
<i>1.2.9 Metodevalidering</i> .....	15
1.2.9.1 Riktighet .....	16
1.2.9.2 Presisjon .....	16
1.2.9.3 Repeterbarhet .....	17
1.2.9.4 Reproduserbarhet.....	17
<b>2. Materiale og metode</b> .....	18
<b>2.1 Materiale</b> .....	18
2.1.1 Bakteriestammer/isolater .....	18
2.1.2 Skåler og buljong.....	19
2.1.3 Antibiotikalapper .....	20

2.1.4 Andre materialer .....	20
<b>2.2 Metode .....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Forberedelse .....	20
2.2.2 Disk eluerings metode .....	21
2.2.3 Disk diffusjons metode .....	22
2.2.4 Riktighetsforsøk .....	23
2.2.5 Repeterbarhetsforsøk .....	23
2.2.6 Reproduserbarhetsforsøk .....	24
2.2.7 Innsamling av data .....	24
2.2.8 Statistiske metoder: .....	24
<b>3. Resultater .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Riktighet .....</b>	<b>26</b>
3.1.1 ESBL <sub>CARBA</sub> .....	26
3.1.2 Negative kontroller .....	29
3.1.3 ESBL <sub>A/M</sub> .....	31
3.1.4 Statistiske analyser - riktighet .....	33
<b>3.2 Presisjon .....</b>	<b>35</b>
3.2.1 Repeterbarhet .....	35
3.2.1.1 Statistiske analyser - repeterbarhet: .....	37
3.2.2 Reproduserbarhet .....	38
3.2.2.1 Statistiske analyser - reproduserbarhet .....	41
<b>4. Diskusjon .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 ESBL<sub>CARBA</sub> .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 ESBL<sub>A/M</sub> .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 Negative kontroller .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 Presisjon .....</b>	<b>45</b>
<b>4.5 Praktisk egenhet .....</b>	<b>45</b>
<b>4.6 Klinisk nytteverdi .....</b>	<b>46</b>
<b>5. Konklusjon .....</b>	<b>48</b>
<b>6. Referanseliste .....</b>	<b>49</b>
<b>7. Vedlegg .....</b>	<b>53</b>
<b>7.1 Liste over vedlegg .....</b>	<b>53</b>

## Liste over figurer og tabeller

Figur 1: Virkemekanismen av betalaktamer, s. 6

Figur 2: Ko-seleksjon, s. 9

Tabell 1: ESBL klassifisering, side 11

Figur 3: Resistensbestemmelse med agar-diffusjonsmetoden, s. 13

Tabell 2: Tolkning av  $\kappa$ -verdi, s. 16

Figur 4: Eksempel av positiv synergi ved disk elueringsmetoden, s. 21

Figur 5: Eksempel av negativ synergi ved disk elueringsmetode, s. 22

Figur 6: Eksempel av positiv synergi ved disk diffusjonsmetoden, s. 23

Figur 7: Eksempel av negativ synergi ved disk diffusjonsmetoden, s. 23

Tabell 3: Riktighet ESBL<sub>CARBA</sub>, s. 28

Tabell 4: Riktighet negative kontroller, s. 30

Tabell 5: Riktighet ESBL<sub>A/M</sub>, s. 32

Tabell 6: Krysstabell til disk elueringsmetoden, s. 34

Tabell 7: Krysstabell til disk diffusjonsmetoden, s. 34

Tabell 8: Repeterbarhetsforsøk, s. 36

Tabell 9: Reproduserbarhetsforsøk, s. 40

# 1. Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn og problemstilling

Ifølge Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM) og Folkehelseinstituttet (FHI) har det vært en betydelig økning i infeksjoner forårsaket av carbapenemaseproduserende bakterier i Norge. I 2023 ble det registrert 251 tilfeller, sammenlignet med 180 i 2022 og 70 i 2021(1–3). Denne økningen kan skyldes en kombinasjon av importerte tilfeller fra land med høyt nivå av antibiotikaresistens, økt reiseaktivitet etter pandemien, samt importsmitte fra Ukraina på grunn av overføring av pasienter til norske sykehus under krigen (1,2). Selv med denne økningen, forblir det totale antallet rapporterte tilfeller lavt sammenlignet med andre europeiske land (1,2). Meste parten av carbapenemaseproduserende bakterieisolatene i Norge er Enterobacteriaceae, og disse er ofte resistente mot de mest brukte antibiotikatyperne (1,2). Derfor kan disse stammene være utfordrende å behandle (2).

Kombinasjon av ceftazidim-avibaktam (CZA) og aztreonam (ATM) har ofte god effekt i behandling av de fleste infeksjonene forårsaket av carbapenemase-produserende Enterobacteriales (CPE) (4). Ifølge Infectious Disease Society of America (IDSA) er CZA i kombinasjon med ATM den anbefalte behandlingen for infeksjoner forårsaket av CPE, når det foreligger mistanke om metallo-betalaktamase (MBL) produksjon (5). Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi (AMM) i Molde og Ålesund ønsker en pålitelig metode for å påvise CZA-ATM synergier in-vitro, for å kunne følge opp på behandlingen av pasienter og vurdere om kombinasjonsbehandlingen har den forventede effekten. Arbeidet i denne oppgaven er et trinn i valideringsprosessen av en aktuell metode som AMM vil benytte. Ut ifra dette ble problemstillingen for denne oppgaven valgt til å være:

*«Hvilken metode er mest pålitelig og best egnet for å påvise synergien mellom ceftazidim-avibaktam og aztreonam i behandling av carbapenemaseproduserende Enterobacteriales?»*

I denne oppgaven vurderes pålitelighet med tanke på reproducerbarhet mellom laboratorier, samt innen-serie og mellom-serie variasjon. Egenhet vurderes med hensyn til kostnader og tidsbruk på avdelingen. I denne oppgaven blir disk diffusjons- og disk elueringsmetoden testet. Metodene ble valgt etter anbefaling fra Det nasjonale kompetansesenteret for påvisning av antibiotikaresistens (K-res).



I oppgaven presenteres først teoridelen, som inneholder den nødvendige teoretiske kunnskapen for å kunne tolke resultatene fra forsøket. Videre beskrives materialer benyttet under det praktiske arbeidet og de to metodene som ble testet. Deretter fremstilles resultatene fra forsøket, som blir tolket i diskusjonsdelen. Til slutt presenteres konklusjonen av oppgaven.

## 1.2 Teori

I dette delkapittelet presenteres det teoretiske grunnlaget for oppgaven. Først kommer en generell beskrivelse av Enterobacteriales, etterfulgt av en gjennomgang av antibiotika og antibiotikaresistens, med fokus på betalaktamer og betalaktamaser. Videre blir kombinasjonsbehandling, synergi og resistensbestemmelse omtalt. Deretter blir prinsippet for de utvalgte metodene som blir testet i denne oppgaven beskrevet. Relevante funn fra andre studier om de utvalgte metodene blir også presentert. Til slutt blir metodevalidering og ulike parametere som blir brukt i denne oppgaven definert.

### 1.2.1 Enterobacteriales

Enterobacteriales representerer en orden som inneholder Enterobacteriaceae-familien sammen med andre familier av gramnegative staver, som naturlig forekommer i tarmfloraen til mennesker og ulike dyr (6,7). Enterobacteriaceae er ikke sporedannende og kan vokse både aerobt og anaerobt, det vil si de er fakultativt anaerobe (6,7). De dyrkes ofte på selektive medier som for eksempel MacConkey agar (6).

Enterobacteriaceae utgjør mindre enn 1% av bakteriene i tarmens normalflora hos friske mennesker (6,8). Flere Enterobacteriaceae arter, som *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* og *Enterobacter cloacae* kan forårsake infeksjoner både i og utenfor tarmkanalen (6). Utenfor tarmkanalen er disse bakteriene ofte årsak til urinveisinfeksjoner, bakteriemi, respiratoriske sykdommer, sårinfeksjoner og infeksjoner i sentralnervesystemet (6). Flere av disse infeksjonene, som for eksempel sepsis og meningitt, kan være livstruende og er ofte nosokomiale (6).

### 1.2.2 Antibiotika

Antibiotika er substanser produsert av mikroorganismer eller syntetisk fremstilt, som selv i lave konsentrasjoner hemmer vekst av bakterier (6). Antibiotika kan inndeles i klasser basert på virkningsmekanismer, antimikrobielt spektrum og kjemisk struktur. Antibiotika kan enten

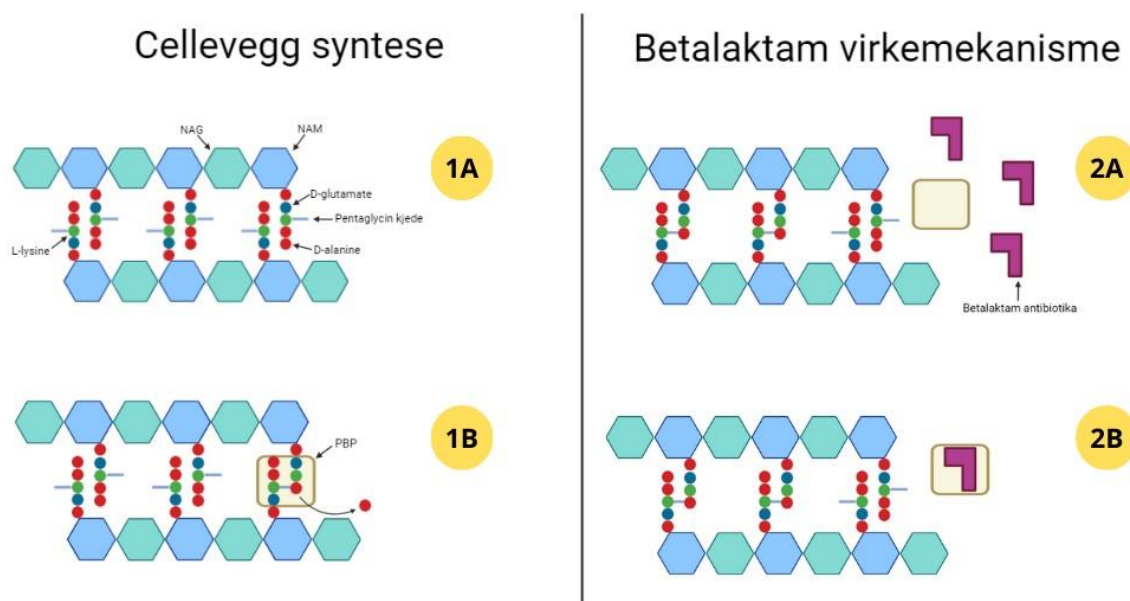
være bakteriostatiske eller baktericide (6,9). Bakteriostatiske antibiotika hemmer veksten av bakterier, mens baktericider dreper bakterien (6,9). Antibiotika kan være smalspektrede eller bredspektrede. Smalspektrede antibiotika virker på et begrenset utvalg av bakterier, og vil derfor ikke ha stor påvirkning på normalfloraen. I motsetning har bredspektret antibiotika et større antibakterielt spektrum og vil derfor påvirke normalfloraen i større grad (6). Dermed kan de være mer resistensdrivende (6). Virkningsmekanismen til antibiotika avhenger av angrepspunkt på bakterien. Disse kan være mikrobens nukleinsyre (DNA og RNA), cellemembranfunksjoner, syntese av celleveggkomponenter, eller proteinsyntese (6).

Antibiotika kan inndeles etter kjemisk struktur i de følgende klassene: betalaktamer, tetrasykliner, glycylysykliner, aminoglykosider, oxazolidinoner, sulfamider, trimetoprim, kinoloner, polypeptidantibiotika, makrolider og karbohydratantibiotika (6,9).

### 1.2.2.1 Betalaktamer

I denne oppgaven er det kun fokus på betalaktamer, og andre antibiotika blir ikke videre beskrevet. Betalaktamer er en klasse av antibiotika som har en betalaktamring som felles kjernestruktur (6,9). Disse antibiotikaene fungerer ved å hemme celleveggsyntese (6).

Virkemekanismen av betalaktamer blir nærmere beskrevet i figur 1.



Figur 1: Virkemekanismen av betalaktamer. Figuren viser dannelse av peptidoglykanveggen som finnes rundt bakteriecellen, og hvordan prosessen forstyrres av betalaktamantibiotika. **1A:** N-acetylgucosamin (NAG) og N-acetylmuraminsyre (NAM) er disakkarid monomerer som blir koblet sammen i det periplasmatiske rommet for å

danne lange polysakkaridkjeder, som blir fundamentet for peptidoglykanveggen. Monomerene har flere aminosyrekjeder koblet til seg. **1B:** Polysakkaridkjeder i peptidoglykanveggen krysskobles ved hjelp av peptidbindinger som dannes mellom aminosyrer i forskjellige kjeder. Dette skjer ved at D-alanin fra en peptidkjede binder seg til L-lysine i en annen kjede. Reaksjonen katalyseres av enzymet transpeptidase, også kalt penicillin-bindende-protein (PBP). **2A:** Betalaktamantibiotika har en karakteristisk betalaktamring i deres kjemiske struktur. Denne strukturen ligner på D-Ala-D-Ala terminalen på peptidet, som er substratet til PBP. **2B:** Betalaktamringen i antibiotika kan derfor binde seg til PBP sitt aktive sete. Dette forhindrer PBP i å katalysere transpeptidasereaksjonen, som er avgjørende for å danne peptidoglykanveggen. Når denne reaksjonen hemmes, blir bakteriecellen svekket, noe som gjør at bakterien blir sårbar for osmotisk trykk. Til slutt vil dette resultere i cellelysis. (6,10–12). Figuren ble laget ved hjelp av BioRender.

### Underklasser og spekter av betalaktamer

De mest klinisk relevante betalaktamene blir klassifisert etter kjemisk struktur i de følgende kategoriene: penicilliner, cefalosporiner, carbapenemer og monobaktamer (6). I denne oppgaven er det kun fokus på cefalosporiner, carbapenemer og monobaktamer, siden de er de mest aktuelle for oppgaven.

### Cefalosporiner

Cefalosporiner inndeles i fem generasjoner (6). Første generasjon cefalosporiner er smalspektret og har aktivitet hovedsakelig mot grampositive bakterier (13). I motsetning er tredje og fjerde generasjon cefalosporiner mer bredspektret og har større effekt mot gramnegative bakterier (13). Andre generasjon cefalosporiner står i en mellomstilling, mens femte generasjon cefalosporiner brukes hovedsakelig mot Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (13,14).

Gramnegative stavbakterier med extended spektrum betalaktamaser (ESBL) kan være følsomme for cefalosporiner, men monoterapi bør unngås fordi det er stor risiko for resistensutvikling under pågående behandling (6). Siden cefalosporiner er sterkt resistensdrivende, skal de kun brukes når det ikke er mulig å bruke mer smalspektret antibiotika (6). Ceftazidim er en tredje generasjon cefalosporin som har god effekt på blant annet gramnegative intestinale stavbakterier (15).

### Carbapenemer

Carbapenemer har det bredeste antibakterielle spekteret av alle betalaktamer (16). Noen carbapenemer har effekt mot de fleste grampositive og gramnegative aerobe og anaerobe bakterier (16). Carbapenemer er stabile overfor de fleste betalaktamaser, inkludert ESBL enzymer (16). I motsetning er de ikke stabile overfor carbapenemaser, som er betalaktamaser

som har evne til å hydrolysere carbapenemer (16). Carbapenemer benyttes til behandling av alvorlige infeksjoner dersom bakteriene er resistente mot mer smalspektrerte antibiotika (16).

### Monobaktamer

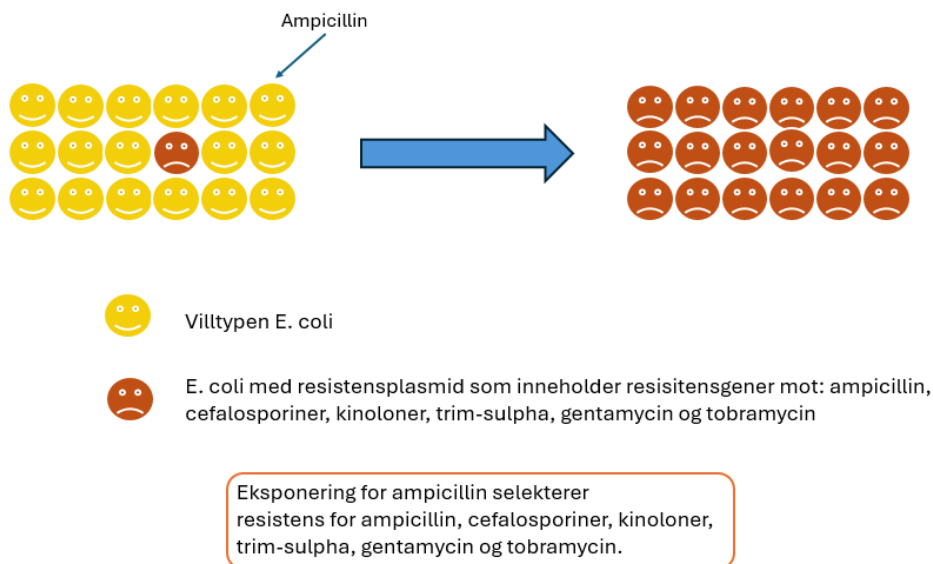
Aztreonam er det eneste monobaktam antibiotikumet som er tilgjengelig på markedet (17). Det har effekt på mange gramnegative aerobe bakterier, spesielt innenfor Enterobacteriaceae (17). Aztreonam har ingen effekt på grampositive eller anaerobe bakterier (17).

### *1.2.3 Antibiotikaresistens*

Antibiotikaresistens kan defineres fra både mikrobeperspektiv og klinisk perspektiv. Fra mikrobeperspektivet snakker man om antibiotikaresistens når stammen tåler betydelig høyere konsentrasjon av et antibiotikum enn andre isolater av samme art (villtype) (6). Fra det kliniske perspektivet snakker man om antibiotikaresistens når mikroben tåler en høyere konsentrasjon av et antibiotikum enn det som er oppnåelig in vivo (på virkestedet) (6). Antibiotikaresistens er en egenskap som bakterier kan ha naturlig eller kan erverve gjennom flere mekanismer (18). Naturlig resistens betyr at bakteriens villtypen er resistent mot et bestemt antibiotikum fra tilblivelsen (18). Endring av et bakteriens arvestoff kan i noen tilfeller føre til ervervet resistens (18). Disse endringene i arvestoffet kan forekomme enten spontant eller gjennom horisontal genoverføring, i form av konjugasjon, transduksjon eller transformasjon (6,18). Plasmider er genetiske elementer som kan replikeres uavhengig av kromosomet i bakterier (6). De som bærer gener for antibiotikaresistens kalles ofte for R-plasmider (6). Disse plasmidene kan overføres fra én bakterie til en annen gjennom en prosess kjent som konjugasjon, som gjør at giverbakterien opprettholder resistensegenskaper og mottakerbakterien tilegner seg resistens mot antibiotika (6). Transposoner er små mobile DNA-segmenter som også er kjent som "hoppegener" (6). De har evnen til å flytte seg enten innenfor samme DNA-molekyl eller mellom forskjellige DNA-strukturer, for eksempel fra et plasmid til et annet plasmid, eller fra et plasmid til et kromosom (6).

Plasmider og transposoner kan inneholde integroner, som er et stykke DNA som benyttes av bakterier for å ta opp fremmede gener, samt gener som koder for antibiotikaresistens (19). Dette betyr at resistensgener kan akkumuleres i enkelte plasmider og føre til utvikling av multiresistens hos bakterier (6). En konsekvens av slik sammenkopling av resistensgener og overdreven antibiotikabruk er ko-seleksjon (20). Ko-seleksjon forekommer når bruk av et enkelt antibiotikum selekterer bakterier som er resistente for flere andre antibiotika (6,20).

Mekanismen ko-seleksjon forklares nærmere i figur 2:



Figur 2: Ko-seleksjon. Figuren viser et eksempel av mekanismen av ko-seleksjon. Ved bruk av et enkelt antibiotikum, ble det selektert bakterier som er resistente for mange ulike antibiotika. For å tillage bildet ble det tatt inspirasjon fra Medisinsk Mikrobiologi 4.utgave (6).

Plasmider som inneholder flere resistensgener er en større utfordring, når de forekommer hos bakterier med spesielt gode epidemiske egenskaper (6). Slike bakteriestammer, referert til som suksessfulle kloner, har gode evner til å akkumulere både resistensgener og gener som er fordelaktig til overlevelse (6). På grunn av disse egenskapene har flere suksessfulle kloner spredt seg globalt (6).

#### 1.2.3.1 Betalaktamaser og ESBL

Produksjon av betalaktamase enzymer er den mest spredte mekanismen for bakteriell resistens mot betalaktamantibiotika (21). Betalaktamaser er enzymer som har evnen til å bryte ned betalaktamringen, og derfor inaktivere betalaktamantibiotika (21). Gener som koder for betalaktamaser finnes både på bakterielle kromosomer og på plasmider. Betalaktamaser er inndelt i 4 molekylære klasser, A, B, C og D, basert på molekylstørrelse og aminosyresekvens (21). De fleste betalaktamaser (klasse A, C og D) fungerer ved å hydrolysere betalaktamringen, og benytter en serin aminosyre i sitt aktive sete (21,22). Andre betalaktamaser (klasse B) benytter sink i sitt aktive sete, for å hydrolysere betalaktamringen (12). Klasse B betalaktamaser kalles også for metallo-betalaktamaser (MBL) (21,22).

Bruk av bredspektret antibiotika har ført til utvikling av nye resistensmekanismer hos bakterier (23). Bredspektret betalaktamantibiotika ble tatt i bruk på 1980-tallet, og kort etter ble de første ESBL funnet (23). ESBL er enzymer som har evne til å inaktivere de fleste penicilliner og cefalosporiner, inkludert tredje og fjerde generasjons cefalosporiner og aztreonam, men ikke carbapenemer (24).

ESBL kan klassifiseres i 3 hovedgrupper:  $ESBL_A$ ,  $ESBL_M$  og  $ESBL_{CARBA}$  (25).  $ESBL_A$  enzymer er aktive mot penicilliner, bredspektret cefalosporiner og monobaktamer, men de hemmes av klavulansyre og avibaktam (26–28).  $ESBL_M$  (miscellaneous ESBL) kategori inndeles videre i  $ESBL_{M-C}$  (klasse C) og  $ESBL_{M-D}$  (klasse D) (25).  $ESBL_{M-C}$  betalaktamaser er mer aktive mot cefalosporiner enn benzylpenicilliner, de er resistente mot klavulansyre, og følsomme for avibaktam og aztreonam (29).  $ESBL_{M-D}$  enzymer er aktive mot penicilliner, bredspektret cefalosporiner og monobaktamer, og de hemmes av avibaktam (20,22).  $ESBL_{CARBA}$  kalles også for carbapenemaser og defineres som betalaktamaser som har hydrolytisk aktivitet mot penicilliner, i de fleste tilfeller cefalosporiner, og i ulik grad også carbapenemer og monobaktamer (24). Monobaktamer hydrolyseres ikke av MBL (24).

$ESBL_{CARBA}$  kan videre inndeles i 3 undergrupper  $ESBL_{CARBA-A}$ ,  $ESBL_{CARBA-B}$  og  $ESBL_{CARBA-D}$ , ifølge de molekylære klassene til betalaktamaser (25).  $ESBL_{CARBA-A}$  enzymer er aktive mot penicilliner, bredspektret cefalosporiner, monobaktamer og carbapenemer, og de hemmes av avibaktam (26,27). Noen eksempler på  $ESBL_{CARBA-B}$  enzymer er New Delhi Metallo-betalaktamase (NDM) og Verona Integron Metallo-betalaktamase (VIM). Disse er aktive mot penicilliner, bredspektret cefalosporiner og carbapenemer, men ikke mot monobaktamer. Disse enzymene blir ikke inaktiverte av betalaktamasehemmere (26,27).  $ESBL_{CARBA-D}$  enzymer er aktive mot penicilliner og carbapenemer, og de hemmes av avibaktam (26,27).

Tabell 1: ESBL klassifisering. Tabellen viser klassifisering av ESBL enzymer. Her presenteres de forskjellige undergruppene av ESBL med noen eksempler av representative enzymer som er viktige i dette forsøket. Tabellen inneholder også informasjon om hvilke underklasser av betalaktamantibiotika disse enzymene kan bryte ned, og om hvilke typer av betalaktamasehemmere har effekt på dem (25,27).

ESBL klassifisering						
Klasser	ESBL <sub>A</sub>	ESBL <sub>M</sub>		ESBL <sub>CARBA</sub>		
Underklasser	ESBL <sub>A</sub>	ESBL <sub>M-C</sub> (Plasmid-mediated AmpC)	ESBL <sub>M-D</sub>	ESBL <sub>CARBA-B</sub>	ESBL <sub>CARBA-A</sub>	ESBL <sub>CARBA-D</sub> (OXA-carbapenemaser)
Eksempler av representative enzymer *	CTX-M TEM-ESBL <sub>S</sub> SHV-ESBL <sub>S</sub>	CMY	OXA-ESBL	NDM VIM IMP	KPC	OXA-48 OXA-181
Co-faktor i aktivt sete	Serin			Sink	Serin	
Bryter ned	Penicilliner, Extended-generation cefalosporiner, Monobaktamer			Penicilliner, Extended-generation cefalosporiner, Carbapenemer	Penicilliner, Extended-spectrum cefalosporiner, Carbapenemer, Monobaktamer	
Hemmes av	Avibaktam, Klavulansyre, Tazobactam	Avibaktam	Avibaktam, Klavulansyre	EDTA	Avibaktam	

\*CTX-M = Aktiv mot cefotaxime, isolert i Munich, TEM = Temoneira, SHV = Sulfhydryl reagent variable, CMY = Aktiv mot cephamyciner, OXA = Aktiv mot oxacillin, IMP = Aktiv mot imipinem, KPC = Klebsiella pneumoniae carbapenemase (30).

#### 1.2.4 Betalaktamasehemmere

For å kunne behandle infeksjoner forårsaket av resistente bakterier som har betalaktamase enzymer til stede, ble det utviklet betalaktamasehemmere (31). Disse er molekyler som virker ved å binde seg til det aktive setet til betalaktamaser, og dermed inaktivere dem (31). Ved å hemme betalaktamasene, kan betalaktamasehemmere gjenopprette eller forbedre effektiviteten av antibiotika mot resistente bakterier (31).

Det finnes to hovedklasser av betalaktamasehemmere, som er betalaktam-betalaktamasehemmere og non-betalaktam-betalaktamasehemmere (31). Betalaktam-betalaktamasehemmere som for eksempel klavulansyre, sulbactam og tazobactam, er alle karakterisert av en betalaktamring (32). Non-betalaktam betalaktamasehemmere inneholder

ikke en betalaktamring. Et eksempel er avibaktam, som inhiberer serine-betalaktamaser (gruppe A, C og D), carbapenemaser av type OXA og KPC, og ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub> (27,32). Avibaktam blir ofte benyttet sammen med ceftazidim og meropenem (27,32).

### *1.2.5 Kombinasjonsbehandling og synergi*

Antibiotikaresistens hos bakterier er i stadig utvikling og denne prosessen foregår raskere enn utviklingen av nye antibiotika for behandling av slike resistente stammer (33). Selv med nylig utviklede midler, har monoterapi lite effekt på grunn av den raske tilpasningen disse mikrobene viser (33). Dette krever etablering av nye løsninger, herunder kombinasjonsterapi, med allerede eksisterende midler (33). Kombinasjonsterapi benytter prinsippet synergi, som er et fenomen som krever at to antimikrobielle midler viser forbedret hemming av mikrobiell vekst når de to kombineres, i forhold til når de brukes separat (33). Denne typen behandling kan ha en større terapeutisk effekt enn behandling med monoterapi, hos pasienter med multiresistente stammer (33).

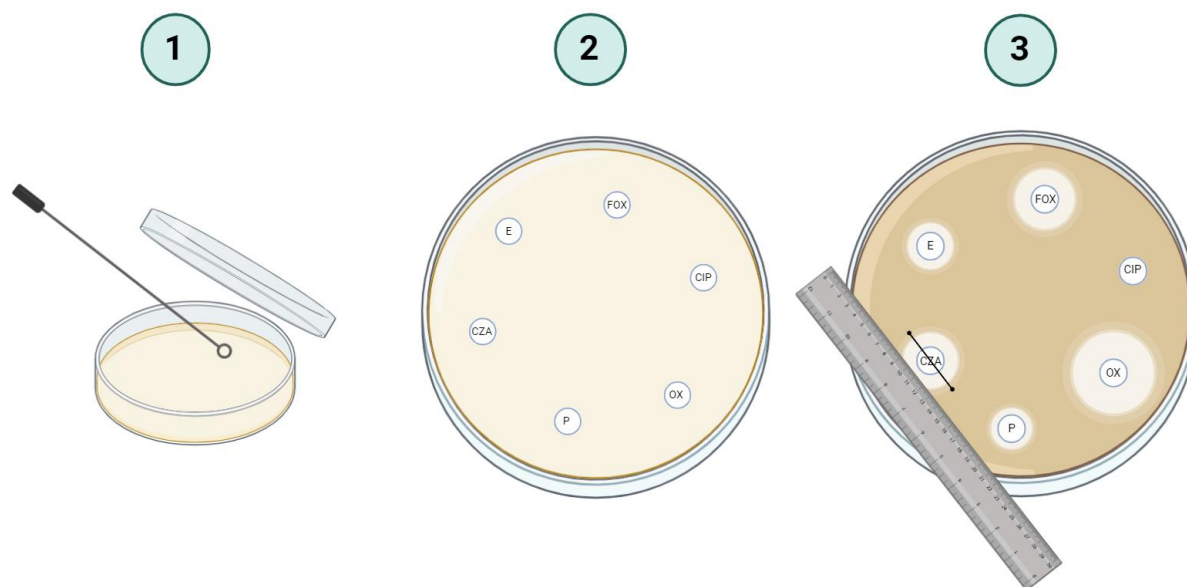
Fenomenet synergi er særlig relevant når man står overfor infeksjoner forårsaket av bakterier som produserer metallo-betalaktamaser, slik som NDM og VIM enzymer (4). Disse enzymene kan bryte ned de fleste betalaktamantibiotika, med unntak av ATM. ATM kan sjeldent brukes som monoterapi mot disse stammene, fordi de ofte produserer serine-betalaktamaser i tillegg, som kan hydrolysere ATM (4). Derfor har kombinasjon av CZA og ATM vist seg å være en løsning med synergisk virkning mot MBL-produserende multiresistente bakterier (4). Denne kombinasjonen er den anbefalte behandlingen for infeksjoner forårsaket av MBL-produserende CPE, ifølge IDSA (5).

### *1.2.6 Resistensbestemmelse*

Resistensbestemmelse er et viktig verktøy som blir brukt for å bestemme mikroorganismens følsomhet overfor spesifikke antibiotika (6). Bakteriens følsomhet kan kvantiteres ved ulike metoder, men felles for alle er at resultatene brukes for å predikere den terapeutiske effekten av et bestemt antibiotikum mot en bestemt bakterieinfeksjon (6). Videre spiller resistensbestemmelse en viktig rolle i overvåkingen av antimikrobiell resistens. Dette er for å forstå utviklingen av resistens og utforme nye tiltak for å begrense spredning av resistente stammer (6,18). For å bestemme den antibakterielle effekten, benyttes det Minimum Inhibitory Concentration (MIC), som er den minste konsentrasjonen av et antibiotikum som hemmer synlig vekst av den spesifikke bakteriearten (6).



I kliniske laboratorier i Norge benyttes det agar-diffusjonsmetoden for rutinemessig resistensbestemmelse (6). Dette er en standardisert metode som gir et indirekte mål for MIC (Se vedlegg 1). Agar-diffusjonsmetoden beskrives i figur 3.



*Figur 3: Resistensbestemmelse med agar-diffusjonsmetoden. Bildet viser utførelse av rutine resistensbestemmelse. 1: MH-skål blir inokulert med en standardisert mengde (0,5 McFarland bakterieoppslemming) av den bakteriestammen som skal testes. 2: Antibiotikalappene eller tablettene med kjente konsentrasjoner blir plassert på den inokulerte skålen. Antibiotika vil diffundere ut i agaren og danne en gradient med avtakende konsentrasjon fra antibiotikalappene. Agarskålen inkuberes i varmeskap ved 35 °C for å fremme veksten av bakterier. 3: Etter inkubering vil de relevante antibiotikaene som har hemmende effekt gi en sirkulær hemmingssone uten bakterievekst rundt tablettene eller lappene. Ved å måle diameteren på hemmingssonen, kan man sammenligne resultatene mot tabeller som inneholder fastsatte brytningspunkter, hvilke viser korrelasjonen med MIC-verdien (6) (Vedlegg 1). Figuren ble laget ved hjelp av BioRender.*

Antibiotikaresistens vurderes ut ifra fastsatte brytningspunkter, som er tolkningskriterier som klassifiserer hemmingssoner i tre kategorier: følsom ved standard dosering (S), følsom ved økt eksponering (I) og resistent (R) (6,34). Brytningspunktene er unike for hver enkelt kombinasjon av bakterieart og antibiotikum (6). Disse brytningspunktene er fastsatte av The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) og de blir beregnet etter utbredt mikrobiologiske, farmakologiske og kliniske studier (6,35) (Se vedlegg 2).

Ifølge EUCAST, er en mikrobe definert som følsom ved standard dosering for et antibiotika, tidligere kalt sensitiv, når den anbefalte doseringen er assosiert med høy sannsynlighet for terapeutisk suksess (34). Det er definert som følsom ved økt eksponering, tidligere kalt intermediær, når det er stor sannsynlighet for terapeutisk suksess ved å øke eksponeringen for

antibiotikumet, enten ved å justere doseringen eller ved å øke konsentrasjonen på infeksjonsstedet (34). Det er definert som resistent når den anbefalte doseringen er assosiert med høy sannsynlighet for terapeutisk svikt, selv med økt eksponering (6,34). Resultater av resistensbestemmelse-analyser benyttes av klinikere for å velge det best egnet antibiotikumet for å behandle spesifikke infeksjoner hos pasienter (6,35). Videre i oppgaven benyttes begrepet «følsom» i stedet for «følsom ved standard dosering».

Ifølge brytningspunkttabeller fra EUCAST er Enterobacteriales følsom for CZA når hemningssonens diameter er  $\geq 13$ mm, og de er resistente mot CZA når hemningssonens diameter er  $< 13$ mm. Videre er Enterobacteriales følsom for ATM når hemningssonens diameter er  $\geq 26$ mm, og de er resistente mot ATM når hemningssonens diameter er  $< 21$ mm. Når hemningssonens diameter rundt ATM er mellom 21 og 26 mm, blir bakteriene vurdert som følsom ved økt eksponering for ATM. Brytningspunktene er hentet fra vedlegg 2.

### *1.2.7 Prinsippet for de utvalgte metodene*

#### *1.2.7.1 Disk eluering*

Disk elueringsmetoden er en kvalitativ metode som kan benyttes for å vurdere synergieffekten av forskjellige antibiotika. Ved denne metoden blir antibiotikalapper tilsatt til rør med Mueller Hinton-buljong (MH-buljong), slik at antibiotika skal diffundere ut i væsken (36). Videre blir rørene inokulerte. Dersom bakteriene er resistente mot de antibiotika som ble tilsatt, vil de kunne vokse i røret. Derimot, hvis bakteriene er følsomme for de antibiotika som ble tilsatt, vil deres vekst bli hemmet (36,37). Rørene avleses ettersom det er synlig vekst eller ingen vekst i dem. Ved synlig vekst blir MH-buljong blakket, derimot ved ingen vekst forblir MH-buljong klar (Se vedlegg 3).

#### *1.2.7.2 Disk diffusjon*

Disk diffusjonsmetoden kan også benyttes for å vurdere synergieffekten av forskjellige antibiotika. Dette gjøres ved å plassere de aktuelle antibiotikalappene i kort avstand på Mueller Hinton-skåler (MH-skåler) (38). Antibiotikaene vil diffundere ut i agaren, og i sonen mellom de to lappene vil begge midler være til stede. Dersom antibiotikaene har en synergisk effekt mot bakteriestammen som blir testet, vil det dannes en felles hemningssone mellom de to antibiotikalappene, etter inkubering (38). Synergieffekten på skålene avleses visuelt (Se vedlegg 3).

### *1.2.8 Andre studier*

Ettersom CPE har blitt en global utfordring, har flere forskningsartikler sammenlignet mulige screeningsmetoder som kan benyttes av mikrobiologiske laboratorier, for å påvise synergi mellom CZA og ATM (36,38–40). Hensikten med disse studiene er å finne en pålitelig og praktisk metode som er egnet for screening av CZA-ATM synergi.

I noen av disse studiene har det kommet fram at disk elueringsmetoden er rimelig og at materialene er lett tilgjengelige for mikrobiologiske laboratorier (36,40). Ifølge de samme studiene, er det enkelt å avlese synergi ved disk elueringsmetoden, fordi den skal kun vurderes om det er vekst eller ikke i buljongsrørene (36,40). Videre, i en av disse studiene ble det konkludert med at disk elueringsmetoden hadde høy sensitivitet og presisjon (40).

I andre studier ble disk diffusjonsmetoden vurdert til å være en pålitelig metode for screening av synergi blant CPE (38,39). Her ble metoden benyttet for å evaluere videre metoder som laboratoriet kan bruke til synergitestning (38,39). Det ble konkludert med at disk diffusjonsmetoden har høy sensitivitet og spesifisitet, i tillegg til høy negativ prediktiv verdi (NPV) (39). Det vil si at metoden er i stand til å påvise synergi blant de aktuelle stammene med nøyaktighet, og har lite risiko for falskt negative resultater (39).

Ifølge noen av studiene har disk diffusjonsmetoden mulige svakheter med hensyn til tolkning av resultater (36,40). Dette er fordi isolater kan mistolkes til å være resistente mot antibakterielle midler på grunn av den varierende diffusjonen av midlene i agaren, og individuelle variasjoner i måling av hemmingssonens diameter (36,40). Dette forekommer på grunn av diameteren avleses visuelt med en linjal.

### *1.2.9 Metodevalidering*

Metodevalidering er en prosess der gjennom undersøkelse og dokumentasjon av objektive bevis bekreftes at en metode møter de spesifikke kravene til den tiltenkte bruken (41,42). Formålet med denne prosessen er å verifisere at den valgte metoden, når den er utført ifølge prosedyren, leverer resultater som er passende for sitt formål (41). Kravene skal defineres i forkant av undersøkelsen for å kunne objektivt bedømme om de er oppnådd. Validering er aktuelt ved innføring av en analysemetode, endring av metoden eller analyseutstyr (41,42).

En fullstendig validering bør omfatte: Klinisk nytteverdi, Praktisk egnethet og Analytisk kvalitet (41). Klinisk nytteverdi er metodens evne til å veilede den behandlende legen mot riktig behandling av pasienten (41). Praktisk egnethet går ut på konsekvensene knyttet til

innføring av en analysemetode eller et analyseinstrument i laboratoriet, med tanke på faktorer som arbeidsressurser, miljøpåvirkning og kostnader (41). Analytisk kvalitet vurderes ut ifra forskjellige parametere. Hvilke parametere som er aktuelt må vurderes fra analysens formål og metoden som skal benyttes (41).

Denne oppgaven representerer et trinn i valideringsprosessen, hvor riktighet og presisjon er de mest relevante parameterne.

#### *1.2.9.1 Riktighet*

Riktighet er grad av overenstemmelse mellom verdier fremskaffet i undersøkelse og fasitverdier fra en referansem metode (41,43). For å kvantitere riktighet kan Cohens kappa-verdi ( $\kappa$ -verdi) benyttes.  $\kappa$ -verdi er en type korrelasjonskoeffisient som kan benyttes til vurdering av samsvar mellom positive og negative svar (44) (Se vedlegg 4).

Tabell 2: Tolkning av  $\kappa$ -verdi. Tabellen viser hvordan  $\kappa$ -verdi tolkes i bakgrunn av prosentverdi og overenstemmelsesgrad. Informasjon inneholdt i tabellen er hentet fra (44).

<b><math>\kappa</math>-verdi</b>	<b>Overenstemmelsesgrad</b>
$\leq 0$	Ingen
0,01 - 0,20	Minimal
0,21 - 0,40	Svak
0,41 - 0,60	Moderat
0,61 - 0,80	Betydelig
$\geq 0,81$	Nesten perfekt

#### *1.2.9.2 Presisjon*

Ifølge definisjonen hentet fra Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll (NKK), defineres begrepet presisjon som «Presisjon er overensstemmelse mellom uavhengige måleresultater oppnådd med en måleprosedyre under angitte betingelser.» (41). Presisjon er et kvalitativt begrep som kan kvantifiseres gjennom bruk av impresisjon, som vanligvis uttrykkes ved standardavvik eller variasjonskoeffisienten (CV%) (41,43). Impresisjon representerer et mål på tilfeldige avvik knyttet til en bestemt analytisk metode og brukes for å beregne den forventede variasjonen i måleresultater (41,43). Impresisjon har forskjellige former, der det viktigste er repeterbarhet og reproduserbarhet (41,43).

### *1.2.9.3 Repeterbarhet*

Ifølge definisjonen hentet fra NKK, defineres repeterbarhet (innen-serie impresisjon) som «Overensstemmelse mellom resultatene av påfølgende målinger av samme målestørrelse utført under samme målebetingelser.» (41). Dette utføres ved at en operatør analyserer en prøve i en serie på samme tidspunkt, og ved å bruke det samme type utstyr. Repeterbarhet gir en estimat på den minste målesikkerheten, som en kan oppnå med analysemetoden (41,43).

### *1.2.9.4 Reproduserbarhet*

Ifølge definisjonen hentet fra NKK, defineres reproduserbarhet (mellom-serie impresisjon) som «Overensstemmelse mellom resultatene av påfølgende målinger av samme målestørrelse utført under endrete målebetingelser.» (41). Dette oppnås når ulike operatører utfører analyser av samme prøve over flere serier og på tvers av forskjellige dager (41). Dette gir et estimat på de totale feilene med flest mulig variabler en analysemetode kan oppnå (41,43).

## 2. Materiale og metode

I dette kapittelet presenteres materialene som ble brukt i det praktiske arbeidet. I tillegg beskrives de ulike metodenes fremgangsmåter og til slutt statistiske metoder som ble brukt i oppgaven.

### 2.1 Materiale

#### 2.1.1 Bakteriestammer/isolater

##### ESBL<sub>CARBA</sub> stammer:

20 ESBL<sub>CARBA</sub> stammer ble sendt til AMM i Ålesund fra K-res. Isolatene er hentet fra K-res' egen stammebank. Stammene er fra screeningsprøver og kliniske prøver mottatt av K-res i perioden 2022-2023. Prøvene ble innsendt til referanseundersøkelser ved K-res fra ulike mikrobiologiske laboratorier i Norge. K-res har benyttet Matrix-assisted laser desorption-ionization – Time of flight (MALDI-TOF) for å indentifisere bakterietypene. Av de 20 stammene var ti *K. pneumoniae* og ti *E. coli*. K-res har også indentifisert betalaktamaseprofilen på alle stammene ved hjelp av helgenomsekvensering, nærmere bestemt Illumina-teknologi. Alle 20 stammene har carbapenemase enzymer. 18 av de 20 har NDM enzym, to av de har OXA enzym i tillegg til NDM, og en av de har KPC enzym i tillegg til NDM. To av de 20 stammene hadde både KPC og VIM enzymer. På vedlegg 5 finner man en komplett beskrivelse av betalaktamaseprofiler. I tillegg har K-res bestemt MIC verdiene på CZA, ATM og Meropenem ved hjelp av mikrobuljongfortynning. Isolatene ble mottatt av Medisinsk mikrobiologi Molde i juni 2023 på transportmedium fra Copan (e-swab). Isolatene ble dyrket og deretter tilsatt til fryserør som inneholder kuler, slik at disse ble dekket av bakteriene. Fryserørene ble oppbevart ved –80 °C. Fryserørene ble sendt til Medisinsk mikrobiologi Ålesund i et boks med et kjøleelement 23/2-24, og mottatt på samme dag. Ved Medisinsk mikrobiologi Ålesund ble isolatene oppbevart i fryseren ved en temperatur mellom –30 og –15 °C.

##### Negative kontrollstammer:

Ti negative kontrollstammer ble samlet fra AMM i Ålesund fra egen stammebank. AMM i Ålesund hadde indentifisert stammene med MALDI-TOF. Åtte av stammene var *E. coli*, en var *Citrobacter freundii*, og en var *K. pneumoniae*. Alle isolatene ble innsamlet fra urinprøver

fra pasienter. Det laget en subkultur av disse stammene 18/3-24 på urikromagar skåler, som ble brukt 19/3-24 for synergitestning. Vedlegg 6 viser en liste over de negative kontrollstammene som ble brukt i oppgaven.

#### ESBL<sub>A/M</sub> stammer:

Ti ESBL<sub>A/M</sub> stammer ble samlet fra AMM i Ålesund fra egen stammebank. AMM i Ålesund hadde indentifisert stammene med MALDI-TOF. Seks av stammene var *E. coli*, to var *Enterobacter cloacae*, en var *C. freundii*, og en var *K. pneumoniae*. Laboratoriet gjennomført en ESBL-test med Rosco-tabletter på MH-skåler på alle stammene. Dette er en fenotypisk test for påvisning av ESBL-enzym. Resultatene viste at åtte av stammene hadde ESBL<sub>A</sub>, én hadde ESBL<sub>M</sub>, og én hadde både ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub>. Åtte av isolatene ble samlet fra eldre pasientprøver. Av de var fem fra urinprøver, to fra blodkultur og en fra sårsekret. Alle prøvene ble hentet mellom 2021 og 2023. En av isolatene var en referansestamme som ble kjøpt av laboratoriet fra THERMO FISHER DIAGNOSTICS AS og mottatt 06/12-22. Et isolat ble samlet fra stammebank ved AMM i Molde i 2014 til Vitek MS validering, det ble oppbevart i fryseren ved en temperatur mellom -30 og -16,5 °C. Vedlegg 7 viser stammene med ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub> som ble brukt i oppgaven.

#### 2.1.2 Skåler og buljong

Det ble brukt 20 MacConkey skåler for å dyrke ESBL<sub>CARBA</sub> stammene. Disse skålene er produsert av St. Olavs hospital, og kjøpt av AMM i Ålesund. Skålene ble oppbevart i kjølerommet ved en temperatur mellom 2 og 8 °C før bruk.

Det ble også brukt 20 urikromagar skåler for å dyrke ESBL<sub>A/M</sub> stammer, og negativ kontroll stammer. Disse skålene ble produsert av BD og kjøpt av AMM i Ålesund. Skålene ble oppbevart i kjølerommet ved en temperatur mellom 2 og 8 °C før bruk.

Det ble brukt 85 MH-skåler for synergitestning av alle stammene. Disse skålene ble produsert av St. Olavs hospital, og kjøpt av AMM i Ålesund. Skålene ble oppbevart i kjølerommet ved en temperatur mellom 2 og 8 °C før bruk. Ifølge holdbarhetstesting utført ved St. Olavs hospital er MH-skåler holdbar i tre uker.

Det ble brukt 608 ml MH-buljong for synergitestning av stammene. Buljongen ble produsert av St. Olavs hospital. En 500-ml-flaske ble kjøpt av AMM i Ålesund, og en 250-ml-flaske ble

kjøpt av AMM i Molde og sendt videre til Ålesund. Buljongen som ble kjøpt av AMM i Molde lekket ut av flasken under transport til Ålesund. Derfor ble det utført en kvalitetskontroll på tre paralleller for å sikre at buljongen ikke ble forurenset. Resultatene fra kvalitetskontrollen ble godkjent og det ble bekreftet at det var ingen vekst i buljongen, dermed kunne det brukes til forsøket. Buljongene ble oppbevart i kjølerommet før bruk ved temperatur mellom 2 og 8 °C. MH-Buljong er holdbar i to uker (45).

### *2.1.3 Antibiotikalapper*

Det ble brukt 340 CZA-lapper med en konsentrasjon på 10 µg/4 µg. Disse lappene, produsert av Oxoid, ble kjøpt av AMM i Ålesund og av AMM i Molde. Det ble brukt tilsvarende 340 ATM lapper med en konsentrasjon på 30 µg. Disse lappene, produsert av Oxoid, ble kjøpt av AMM i Ålesund. Uåpnet pakker ble oppbevart i kjølerom ved en temperatur mellom 2 og 8 °C. Åpnet antibiotika-dispenser ble oppbevart i romtemperatur.

### *2.1.4 Andre materialer*

Andre materialer som ble brukt ved det praktiske arbeidet, samt produsenten av disse, er oppsummert i vedlegg 8.

## **2.2 Metode**

### *2.2.1 Forberedelse*

Første dag ble alle bakteriestammene sådd ut. ESBL<sub>CARBA</sub> stammene ble mottatt i fryserør med kulene dekket av bakteriene. En kule fra hver stamme ble sådd ut på en MacConkey skål ved hjelp av en øse. Det ble valgt MacConkey skåler fordi de favoriserer vekst av gramnegative bakterier. Deretter ble skålene inkubert i varmeskap mellom 16-20 timer. ESBL<sub>LAM</sub> og negative kontroller ble sådd ut på samme dag. Det ble valgt urikromagar skåler. Skålene ble inkubert i varmeskap mellom 16-20 timer.

I forkant av laboratoriearbeid ble glassrørene, metallkorker og dispenser vasket og sterilisert ved hjelp av autoklaver. Det ble utført en steriliseringskontroll av dispensereren for å sikre at det var sterilt før bruk. 2 ml MH-buljong ble fordelt til sterile glassrør ved hjelp av dispensereren. Deretter ble rørene med buljong oppbevart i kjølerom før bruk, ved en temperatur mellom 2 og 8 °C.



MH-skåler ble tatt ut av kjølerommet dagen før bruk for at de skulle bli romtempererte. Dette gjøres for å hindre at antibiotika diffunderer ut fra lappene på grunn av kondens. I tillegg ble skålene merket og det ble laget to prikker med 15 mm avstand for å forenkle plassering av antibiotikalappene på skålene.

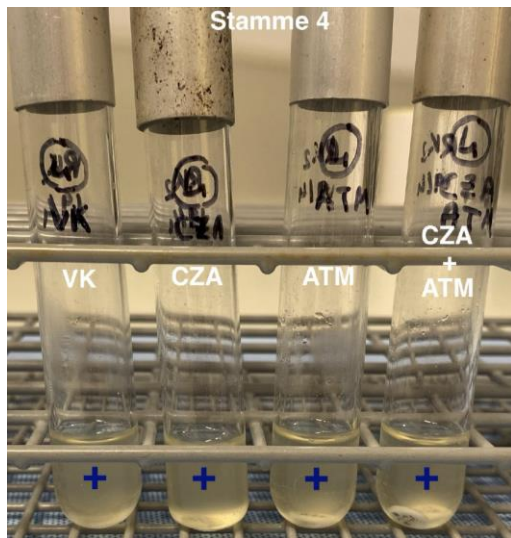
### 2.2.2 Disk eluerings metode

Sterile glassrør med 2 ml MH-buljong som ble tillaget i forkant ble tatt ut av kjølerommet. Etter at MH-buljongene hadde nådd romtemperatur ble det tilsatt antibiotikalapper. For hver analyse ble det tillaget fire buljongrør: ett uten antibiotika (vekstkontroll), ett med en ATM-lapp, ett med en CZA-lapp og ett med både en CZA-lapp og en ATM-lapp. Under tilsetningen av antibiotikalappene ble det benyttet hansker og munnbind for å sikre at buljongen forble steril før bruk, og at oppveksten ikke skyldtes forurensing. Rørene med antibiotikalapper ble inkubert i 30 minutter i romtemperatur. Det ble tillaget 0,5 McFarland oppslemming av hver bakteriestamme fra kolonier sådd ut dagen før på MacConkey og urikromagar skåler. 12 µl av hver oppslemming ble tilsatt til de fire buljongrørene. Buljongrørene ble inkubert mellom 16-20 timer ved 34,9 – 35,4 °C.

Resultatene ble visuelt avlest etter inkuberingstiden. Det ble vurdert om det var synlig vekst, markert med «+» på figur 4 og 5, eller ikke synlig vekst, markert med «-» på figur 5. En stamme ble ansett som positiv for synergi dersom det ikke var synlig vekst i røret som inneholdte både CZA og ATM lapper, men det var synlig vekst i rørene som inneholdte enkle antibiotikalapper.



Figur 4: Eksempel av positiv synergi ved disk elueringsmetoden. Figuren viser et eksempel på en stamme som ble vurdert som positiv for synergi, ved disk elueringsmetoden.

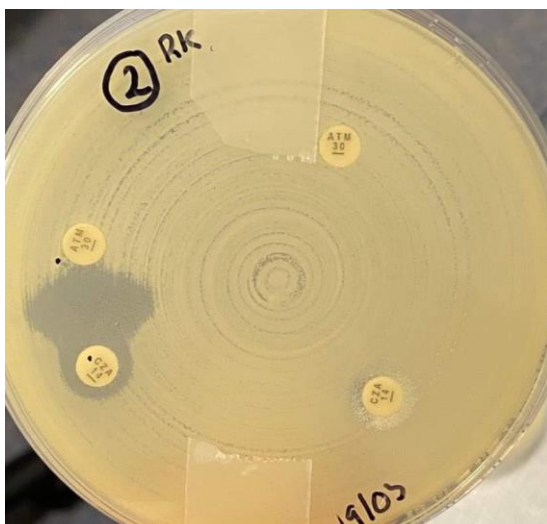


Figur 5: Eksempel av negativ synergi ved disk elueringsmetoden. Figuren viser et eksempel på en stamme som ble vurdert som negativ for synergi, ved disk elueringsmetoden.

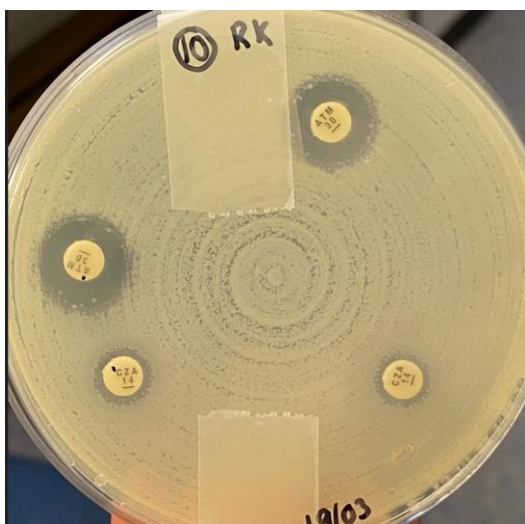
### 2.2.3 Disk diffusjons metode

Det ble laget 0,5 McFarland oppslemming av hver bakteriestamme. Det ble laget kun én oppslemming av hver stamme, som ble brukt til begge metodene. De ble sådd ut på MH-skåler som ble tatt ut i forkant. Videre ble det plassert fire antibiotikalapper på hver skål ved hjelp av nåler. En CZA- og en ATM-lapp ble plassert med 15 mm avstand mellom sonekanten på lappene på det ene halvdel av MH-skålen. En CZA- og en ATM-lapp ble plassert med god avstand på den andre halvdel av MH-skålen. Skålene ble inkubert i 16-20 timer i 34,9 – 35,4 °C.

Etter inkuberingsstiden ble det målt hemningssone rundt CZA- og ATM-lapper ved hjelp av en linjal og det ble vurdert om stammen var positiv eller negativ for synergi. En stamme ble ansett som positiv for synergi dersom det fantes oppklaring/invers D sone mellom de to antibiotika som ble plassert med 15 mm avstand. I tillegg er det krav at stammen viser resistens både for CZA og ATM når de ligger hver for seg. Mønsteret invers D-sone er vist på figur 6 mellom antibiotikalappene CZA og ATM. Dette mønsteret er ikke observert på figur 7.



Figur 6: Eksempel av positiv synergi ved disk diffusjonsmetoden. Figuren viser et eksempel på en stamme som ble vurdert som positiv for synergi, ved disk diffusjonsmetoden.



Figur 7: Eksempel av negativ synergi ved diskdiffusjonsmetoden. Figuren viser et eksempel på en stamme som ble vurdert som negativ for synergi, ved disk diffusjonsmetoden.

#### 2.2.4 Riktighetsforsøk

For å vurdere riktighet av metodene, ble alle isolatene testet en gang med begge metodene. Resultatene fra  $ESBL_{CARBA}$  stammene ble sammenlignet med resultater som ble tilsendt fra K-res. Ved vurderingen av de to metodene ble det tatt hensyn til resultatene fra  $ESBL_{A/M}$  og negative kontroller.

#### 2.2.5 Repeterbarhetsforsøk

For å vurdere repeterbarhet av metodene, ble tre isolater valgt ut. Det ble valgt én  $ESBL_{CARBA}$  stamme, som ut ifra resultatene fra K-res, var positiv for synergi ved både disk eluering og disk diffusjon. Videre ble det valgt én  $ESBL_A$  stamme og én negativ kontrollstamme.

Det ble satt opp ti paralleller for hver stamme med begge metoder. Alle ESBL<sub>CARBA</sub> paralleller ble utført av en person i gruppen, og satt opp på samme dag. Alle paralleller av ESBL<sub>A</sub> og negativ kontrollstamme ble utført av en annen person i gruppen, og satt opp på samme dag. Det ble kun laget ett 0,5 McFarland oppslemming for hver av de tre stammene. Dette ble brukt for å sette opp alle de 10 paralleller for hver av de tre stammene. Avlesning av alle paralleller ble utført av den samme personen.

#### 2.2.6 Reproduserbarhetsforsøk

For å vurdere reproduserbarhet av metodene, ble det benyttet de samme tre stammene som ble brukt til å vurdere repeterbarhet, én ESBL<sub>CARBA</sub> stamme, én ESBL<sub>A</sub> stamme, og én negativ kontrollstamme. Det ble satt opp to paralleller for de tre stammene med begge metodene, en gang per dag i fire påfølgende dager. Det ble benyttet kolonier som var ikke eldre enn 20 timer. Disse ble hentet fra skåler sådd ut dagen før. Det ble laget ett 0,5 McFarland oppslemming hver dag som ble brukt på begge parallellene. Parallellene ble utført av ulike personer hver dag. Avlesning ble også utført av ulike personer hver dag.

#### 2.2.7 Innsamling av data

Under arbeid på laboratoriet ble resultatene av forsøket samlet i tabeller på Excel. Det ble tillaget tre faner på Excel, en til riktighet, en til repeterbarhet og en til reproduserbarhet. Hver av disse fanene inneholdt en tabell med resultater.

#### 2.2.8 Statistiske metoder:

##### Riktighet

For å kvantitere riktighet i denne oppgaven benyttes det krysstabell og Cohens  $\kappa$ -verdi. For å beregne Cohens  $\kappa$ -verdi brukes det denne formelen:

##### **Formel 1:**

$$k = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

Po er prosenten av overenstemmelse. Pe indikerer hypotetisk sannsynlighet for tilfeldig samsvar (46).

### Presisjon

For å måle presisjon for de to metodene ble det benyttet repeterbarhet og reproduserbarhet.

For å vurdere disse parameterer brukes de følgende formlene:

#### **Formel 2:**

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{2n}}$$

S er standardavvik, som brukes til å beregne variasjonskoeffisienten. n er antall prøver.  $d_i$  er differansen mellom duplikate målinger (47).

#### **Formel 3:**

$$CV\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

CV% er variasjonskoeffisienten. S er standardavvik.  $\bar{x}$  er gjennomsnitt av alle målingene i en serie (47).

### Krav på metodevalidering

Kravet til validering av metoden ble bestemt av prosjektansvarlig til å være CV% <15 ved repeterbarhets- og reproduserbarhetsforsøk (Se vedlegg 4). I tillegg krever valideringen 100% overenstemmelse mellom resultat fra undersøkelsen og resultatene tilsendt fra K-res. For metoder som skal brukes ved kliniske laboratorier, er det ønskelig med en Cohens  $\kappa$ -verdi >0,8.

## 3. Resultater

I dette kapittelet presenteres resultater av forsøket. Først vises resultater fra riktighetsforsøket for  $ESBL_{CARBA}$  stammer, negative kontrollstammer og  $ESBL_{A/M}$  stammer. Deretter presenteres krysstabellene som ble benyttet til utregning av Cohens  $\kappa$ -verdi til disk eluering og disk diffusjonsmetodene. Til slutt vises det resultatene fra repeterbarhets- og reproducerbarhetsforsøket sammen med utregning av de tilsvarende CV% verdiene.

Vedlegg 9 inneholder noen representative bilder av resultater fra dette forsøket.

### 3.1 Riktighet

#### 3.1.1 $ESBL_{CARBA}$

I tabell 3 vises det resultater fra riktighetsforsøket av de 20  $ESBL_{CARBA}$  stammene.

Ved disk eluering, var det samsvar mellom resultater fra K-res og fra denne studien ved 15 av de 20 stammene. Ifølge resultater, ved denne studien viste alle de 20 stammene vekst i alle vekstkontrollrør. Videre viste disse 20 stammene vekst i buljongsrørene som inneholdte CZA og ATM hver for seg. Ved dette forsøket var 16 stammer synergi positive, mens fire stammer var synergi negative. Ved K-res sine resultater var 13 stammer synergi positive, to stammer var synergi negative og fem stammer var inkonklusive. De sistnevnte stammene ble vurdert som inkonklusive av K-res fordi de observerte ingen vekst i buljongsrørene med enkelte antibiotikalapper.

Ved disk diffusjon, var det samsvar mellom resultater fra K-res og fra denne studien ved 18 av de 20 stammene. Ifølge resultater fra dette forsøket hadde alle stammene en hemningssone rundt CZA-lapp som var  $<13$  mm, og en hemningssone rundt ATM-lapp som var  $<21$  mm. Derfor ble alle stammene vurdert som resistent mot CZA og ATM. Ved dette forsøket var 16 stammer synergi positive, mens fire var synergi negative. Ved K-res sine resultater var 14 stammer synergi positive, mens seks var synergi negative.

Syv stammer (nummer 4, 8-12 og 16) viste ikke samsvar med K-res sine resultater, og ble derfor testet på nytt; vist i vedlegg 10. Stammene 8-12 viste ikke samsvar ved disk elueringsmetoden, og selv etter andre testrunden hadde resultatene ikke endret seg. Stamme 16 viste ikke samsvar ved disk diffusjonsmetoden både ved første og andre testrunden. Stamme 4 viste ikke samsvar verken med disk eluerings- eller disk diffusjonsmetoden ved første testrunden. Stammen ble vurdert som positiv for synergi ved første testrunden, ved

begge metodene. Ifølge resultatene fra K-res var stamme 4 negativ på synergi ved begge metodene. Etter at stammen ble testet på nytt, har resultatet endret seg ved diskeleringsmetoden, og dermed viste samsvar. Stammen ble derfor testet en tredje gang, og det ble igjen ikke observert synergi ved disk elueringsmetoden. Det ble valgt å benytte negativ på synergi som endelig resultat ved denne metoden. Det ble observert ingen endring ved de gjentatte testene ved disk diffusjonsmetoden.

Tabell 3: Riktighet ESBL<sub>CARBA</sub>. Tabellen viser resultater av riktighetsforsøket av de 20 ESBL<sub>CARBA</sub> stammene. På venstre side presenteres resultatene av disk elueringsmetoden, og på høyre side presenteres resultatene av disk diffusjonsmetoden. Tabellen inneholder også resultatene som ble tilsendt fra K-res. For hver metode finnes det en kolonne som viser om det var samsvar eller ikke mellom resultatene observert ved de to laboratoriene.

Stammene	Disk eluering							Disk diffusjon				
	Vekstkontroll	ATM	CZA	CZA-ATM	Synergi*	K-res (synergi)*	Samsvar	ATM (mm)	CZA (mm)	Synergi*	K-res (synergi)*	Samsvar
1	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	13	10	Pos	Pos	Ja
2	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	10	Pos	Pos	Ja
3	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	6	Pos	Pos	Ja
4	Vekst	Vekst	Vekst	Vekst	Neg	Neg	Ja	10	6	Pos	Neg	Nei
5	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	6	Pos	Pos	Ja
6	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	6	Pos	Pos	Ja
7	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	10	Pos	Pos	Ja
8	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Ink (iv CZA)	Nei	6	6	Pos	Pos	Ja
9	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Ink (iv CZA og iv ATM)	Nei	10	9	Pos	Pos	Ja
10	Vekst	Vekst	Vekst	Vekst	Neg	Ink (iv ATM)	Nei	11	6	Neg	Neg	Ja
11	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Ink (iv ATM)	Nei	6	6	Pos	Pos	Ja
12	Vekst	Vekst	Vekst	Vekst	Neg	Ink (iv ATM)	Nei	9	6	Neg	Neg	Ja
13	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	8	Pos	Pos	Ja
14	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	10	6	Neg	Neg	Ja
15	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	6	Pos	Pos	Ja
16	Vekst	Vekst	Vekst	Vekst	Neg	Neg	Ja	6	6	Pos	Neg	Nei
17	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	6	Pos	Pos	Ja
18	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	6	6	Neg	Neg	Ja
19	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	11	6	Pos	Pos	Ja
20	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	Pos	Ja	10	8	Pos	Pos	Ja

\* Pos = Positiv, Neg = Negativ, Ink = Inkonklusiv, iv = ingen vekst



### *3.1.2 Negative kontroller*

I tabell 4 vises det resultater fra riktighetsforsøket av de ti negative kontrollstammene.

Ved disk eluering, var det vekst i alle vekstkontrollrørene, og ingen vekst i alle buljongrørene som inneholdt antibiotikalapper. Synergi ble derfor vurdert som inkonklusiv, fordi bakteriestammene var følsomme for både CZA og ATM.

Ved disk diffusjon, var alle hemningssoner rundt ATM-lapp >26mm, og alle hemningssoner rundt CZA-lapp >13mm. Disse er de fastsatte brytningspunkter for CZA og ATM følsomhet hos Enterobacteriales. Synergi ble derfor vurdert som inkonklusiv fordi bakteriestammene var følsomme for både CZA og ATM.

Tabell 4: Riktighet negative kontroller. Tabellen viser resultater av riktighetsforsøket av de ti negative kontrollstammene. På venstre side presenteres resultatene av disk elueringsmetoden, og på høyre side presenteres resultatene av disk diffusjonsmetoden.

Stammene	Disk eluering					Disk diffusjon		
	Vekstkontroll	ATM	CZA	CZA-ATM	Synergi*	ATM (mm)	CZA (mm)	Synergi*
21	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	33	29	Ink
22	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	34	30	Ink
23	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	37	31	Ink
24	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	30	25	Ink
25	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	34	28	Ink
26	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
27	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	36	31	Ink
28	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	33	30	Ink
29	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	37	32	Ink
30	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	33	29	Ink

\* Ink = inkonklusiv

### 3.1.3 *ESBL<sub>A/M</sub>*

I tabell 5 vises det resultater fra riktighetsforsøket av de ti *ESBL<sub>A/M</sub>* stammene.

Ved disk eluering, var det vekst i alle vekstkontrollrørene. Ved syv stammer var det vekst i buljongrør som inneholdt ATM, mens tre stammer hadde ingen vekst i dette røret. Ved én stamme var det vekst i buljongrør som inneholdt CZA, mens de resterende ni stammene hadde ingen vekst i dette røret. Den ene stammen som hadde vekst i CZA-rør (stamme 36), hadde også vekst i ATM-rør, men den hadde ingen vekst i røret med både CZA og ATM. Derfor ble denne stammen vurdert som synergi positiv. Hos de resterende ni stammene ble synergien vurdert som inkonklusiv.

Ved disk diffusjon, var det syv stammer som hadde en hemningssone rundt ATM-lapp som var <21mm, en stamme hadde en ATM-hemningssone som var >26mm, og to stammer hadde en ATM-hemningssone på 25mm. Ni stammer hadde en hemningssone rundt CZA-lapp >13mm. Én stamme, stamme 36, hadde en hemningssone rundt CZA-lapp på 10 mm, og ble vurdert som synergi positiv, mens hos de resterende stammer ble synergi vurdert som inkonklusiv.

Tabell 5: Riktighet  $ESBL_{A/M}$ . Tabellen viser resultater av riktighetsforsøket av de ti  $ESBL_{A/M}$  stammene. På venstre side presenteres resultatene av disk elueringsmetoden, og på høyre side presenteres resultatene av disk diffusjonsmetoden.

Stammene	Disk eluering					Disk diffusjon		
	Vekstkontroll	ATM	CZA	CZA-ATM	Synergi*	ATM (mm)	CZA (mm)	Synergi*
31	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	25	Ink
32	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	12	32	Ink
33	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	25	30	Ink
34	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	6	27	Ink
35	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	17	28	Ink
36	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	9	10	Pos
37	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	34	28	Ink
38	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	11	22	Ink
39	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	6	22	Ink
40	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	25	29	Ink

\* Pos = positiv, Ink = inkonklusiv

### *3.1.4 Statistiske analyser - riktighet*

Resultatene fra riktighetsforsøket av de 20 ESBL<sub>CARBA</sub> stammene (tabell 3) ble plottet i to krysstabeller.

I tabell 6 ble resultatene av riktighetsforsøket ved disk elueringsmetoden satt inn. Det vises at 13 stammer ble vurdert som synergi positive og to stammer ble vurdert som synergi negative av både dette forsøket og K-res. Tre stammer ble vurdert som synergi positive ved dette forsøket, mens K-res vurderte dem som inkonklusive. To stammer ble vurdert som synergi negative ved dette forsøket, mens K-res vurderte dem som inkonklusive. Verdiene fra tabell 6 ble benyttet til å regne ut  $P_o$  (prosent samsvar) og  $\kappa$ -verdi ved disk eluering metoden.  $P_o$  ble regnet ut til å være 0,75, mens  $\kappa$ -verdi ble regnet ut til å være 0,45.

I tabell 7 ble resultatene av riktighetsforsøket ved disk diffusjonsmetoden satt inn. Det vises at 14 stammer ble vurdert som synergi positive og fire stammer ble vurdert som synergi negative av både dette forsøket og K-res. To stammer ble vurdert som synergi positive ved dette forsøket, mens K-res vurderte dem som synergi negative. Verdiene fra tabell 7 ble benyttet til å regne ut  $P_o$  og  $\kappa$ -verdi ved disk diffusjonsmetoden.  $P_o$  ble regnet ut til å være 0,9, mens  $\kappa$ -verdi ble regnet ut til å være 0,74.

Tabell 6: Krysstabell til disk elueringsmetoden. Synergi resultatet fra riktighetsforsøket av de 20 ESBL<sub>CARBA</sub> stammene ble satt inn i krysstabellen.

		K-res			Sum
		Positiv	Negativ	Inkonklusiv	
Dette forsøket	Positiv	13	0	3	16
	Negativ	0	2	2	4
	Inkonklusiv	0	0	0	0
	Sum	13	2	5	20

Tabell 7: Krysstabell til disk diffusjonsmetoden. Synergi resultatet fra riktighetsforsøket av de 20 ESBL<sub>CARBA</sub> stammene ble satt inn i krysstabellen.

		K-res		Sum
		Positiv	Negativ	
Dette forsøket	Positiv	14	2	16
	Negativ	0	4	4
	Sum	14	6	20

### κ-verdi disk eluering

$$P_o = \frac{15}{20} = 0,75$$

$$P_e = \frac{16}{20} \times \frac{13}{20} + \frac{4}{20} \times \frac{2}{20} + \frac{0}{20} \times \frac{5}{20} = 0,54$$

$$\kappa = \frac{0,75 - 0,54}{1 - 0,54} = 0,45$$

### κ-verdi disk diffusjon

$$P_o = \frac{18}{20} = 0,9$$

$$P_e = \frac{16}{20} \times \frac{14}{20} + \frac{4}{20} \times \frac{6}{20} = 0,62$$

$$\kappa = \frac{0,9 - 0,62}{1 - 0,62} = 0,74$$

## 3.2 Presisjon

### 3.2.1 Repeterbarhet

I tabell 8 vises det resultater fra repeterbarhetsforsøket for de tre utvalgte bakteriestammene: Stamme 1 (ESBL<sub>CARBA</sub>), Stamme 21 (negativ kontroll), og Stamme 31 (ESBL<sub>A</sub>).

#### Stamme 1

Ved disk eluering, viste alle ti parallellene vekst i buljongrør med CZA og i buljongrør med ATM, og ingen vekst i buljongrør med CZA-ATM. Dermed ble stammen vurdert som positiv for synergi ved alle paralleller. Resultatene fra disk elueringsmetodene var uendrede gjennom alle parallellene.

Ved disk diffusjon, viste alle ti parallellene hemningssoner rundt CZA-lapp <13mm, og hemningssoner rundt ATM-lapp <21mm. Millimetersonene rundt både CZA og ATM hadde en variasjon på 1-2mm. Ved alle paralleller ble stamme 1 vurdert som positiv for synergi ved denne metoden.

#### Stamme 21

Ved disk eluering, viste alle ti parallellene ingen vekst i buljongrør med CZA og i buljongrør med ATM, og i buljongrør med CZA-ATM. Dermed ble synergi vurdert som inkonklusiv ved alle paralleller. Resultatene fra disk elueringsmetodene var uendrede gjennom alle parallellene.

Ved disk diffusjon, viste alle ti parallellene hemningssoner rundt CZA-lapp >13mm, og hemningssoner rundt ATM-lapp >26mm. Millimetersonene rundt både CZA og ATM hadde en variasjon på 1-2mm. Ved alle paralleller ble stamme 21 vurdert som inkonklusiv for synergi ved denne metoden.

#### Stamme 31

Ved disk eluering, viste alle ti parallellene vekst i buljongrør med ATM og ingen vekst i buljongrør med CZA og CZA-ATM. Dermed ble synergi vurdert som inkonklusiv ved alle paralleller. Resultatene fra disk elueringsmetodene var uendrede gjennom alle parallellene.

Ved disk diffusjon, viste alle ti parallellene hemningssoner rundt CZA-lapp >13mm, og hemningssoner rundt ATM-lapp <21mm. Millimetersonene rundt både CZA og ATM hadde en variasjon på 1mm. Ved alle paralleller ble stamme 31 vurdert som inkonklusiv for synergi ved denne metoden.

Tabell 8: Repeterbarhetsforsøk. Tabellen viser resultatene fra repeterbarhetsforsøket utført på de tre utvalgte bakteriestammene. På venstre side presenteres resultatene av disk elueringsmetoden, og på høyre side presenteres resultatene av disk diffusjonsmetoden.

Stammene	Parallell	Disk eluering					Disk diffusjon		
		Vekstkontroll	ATM	CZA	CZA-ATM	Synergi*	ATM (mm)	CZA (mm)	Synergi*
1	1	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	13	10	Pos
	2		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
	3		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	13	9	Pos
	4		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
	5		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
	6		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	10	Pos
	7		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	13	10	Pos
	8		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
	9		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
	10		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
21	1	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	33	29	Ink
	2		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
	3		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
	4		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
	5		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	31	27	Ink
	6		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
	7		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
	8		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
	9		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	31	27	Ink
	10		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	33	29	Ink
31	1	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	25	Ink
	2		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	26	Ink
	3		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	25	Ink
	4		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	14	26	Ink
	5		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	26	Ink
	6		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	26	Ink
	7		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	25	Ink
	8		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	26	Ink
	9		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	25	Ink
	10		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	25	Ink

\* Pos = positiv, Ink = inkonklusiv



### 3.2.1.1 Statistiske analyser - repeterbarhet:

Repeterbarheten er beregnet ut fra de ti parallellene av de tre bakteriestammene fra tabell 8. Det er kun millimeteronene ved disk diffusjon som ble benyttet i beregningen. Standardavviket er beregnet i henhold til formel 2, og variasjonskoeffisienten i henhold til formel 3, presentert under 2.2.8 Statistiske metoder.

#### Stamme 1

$$\sigma_{ATM} = 0,46$$

$$\sigma_{CZA} = 0,46$$

$$\bar{x}_{ATM} = 12,3$$

$$\bar{x}_{CZA} = 9,3$$

$$CV\% = \frac{0,46}{12,3} \times 100 = 3,7 \%$$

$$CV\% = \frac{0,46}{9,3} \times 100 = 4,9 \%$$

Verdiene fra hemningssonene i mm ble brukt for å beregne standardavvik, gjennomsnitt og variasjonskoeffisienten til stamme 1. Standardavviket ble beregnet til å være 0,46 for både ATM og CZA. Gjennomsnittet ble beregnet til å være 12,3 for ATM og 9,3 for CZA. Variasjonskoeffisienten ble beregnet til å være 3,7% for ATM og 4,9% for CZA.

#### Stamme 21

$$\sigma_{ATM} = 0,63$$

$$\sigma_{CZA} = 0,63$$

$$\bar{x}_{ATM} = 32$$

$$\bar{x}_{CZA} = 28$$

$$CV\% = \frac{0,63}{32} \times 100 = 1,96 \%$$

$$CV\% = \frac{0,63}{28} \times 100 = 2,25 \%$$

Verdiene fra hemningssonene i mm ble brukt for å beregne standardavvik, gjennomsnitt og variasjonskoeffisienten til stamme 21. Standardavviket ble beregnet til å være 0,63 for både ATM og CZA. Gjennomsnittet ble beregnet til å være 32 for ATM og 28 for CZA. Variasjonskoeffisienten ble beregnet til å være 1,96% for ATM og 2,25 % for CZA.

#### Stamme 31

$$\sigma_{ATM} = 0,3$$

$$\sigma_{CZA} = 0,49$$

$$\bar{x}_{ATM} = 13,1$$

$$\bar{x}_{CZA} = 25,4$$

$$CV\% = \frac{0,3}{13,1} \times 100 = 2,2 \%$$

$$CV\% = \frac{0,49}{25,4} \times 100 = 1,93 \%$$

Verdiene fra hemningssonene i mm ble brukt for å beregne standardavvik, gjennomsnitt og variasjonskoeffisienten til stamme 31. Standardavviket ble beregnet til å være 0,3 for ATM og 0,49 for CZA. Gjennomsnittet ble beregnet til å være 13,1 for ATM og 25,4 for CZA. Variasjonskoeffisienten ble beregnet til å være 2,2% for ATM og 1,93 % for CZA.

### *3.2.2 Reproduserbarhet*

Tabell 9 viser resultatene for testing av reproduserbarhet. De samme tre stammene ble benyttet til reproduserbarhet som til repeterbarhet: Stamme 1 (ESBL CARBA), Stamme 21 (negativ kontroll) og Stamme 31 (ESBL A). Alle de tre stammene viste vekst i vekst-kontrollsrør, ble dermed godkjent.

#### Stamme 1

Ved disk eluering, viste alle ti parallellene vekst i buljongrør med CZA og i buljongrør med ATM, og ingen vekst i buljongrør med CZA-ATM. Dermed ble stammen vurder som positiv for synergi ved alle paralleller. Resultatene fra disk elueringsmetodene var uendrede gjennom alle parallellene.

Stamme 1, ved disk elueringsmetoden, viste vekst i buljongsrør med ATM og buljongsrør med CZA, men ingen vekst i buljongsrør med CZA og ATM. Dermed ble stammen vurdert som positiv for synergi. Disse resultatene var akkurat det samme gjennom de fire ulike dagene. Ved disk diffusjon, hadde millimeteronene rundt ATM antibiotikalapp variasjon på 1-2mm og var <21mm, mens millimeteronene rundt CZA ble avlest til å være 9mm gjennom de fire dagene. Stamme 1 var positiv for synergi, også ved denne metoden.

#### Stamme 21

Stamme 21, ved disk elueringsmetoden, viste ingen vekst i buljongsrør med ATM, med CZA, dermed ingen vekst i buljongsrør med CZA-ATM. De samme resultatene ble observert gjennom de fire ulike dagene, for denne stammen også. Resultatene fra disk elueringsmetodene var uendrede gjennom alle parallellene.

Ved disk diffusjonsmetoden hadde millimeteronene rundt både CZA og ATM en variasjon på 1-2mm gjennom de fire dagene. Hemningssoner rundt CZA-lapp var >13mm, og hemningssoner rundt ATM-lapp var >26mm. Synergien ble vurdert som inkonklusiv for denne stammen.

#### Stamme 31

Stamme 31, ved disk elueringsmetoden, viste vekst i buljongsrør med ATM, derimot ingen vekst i buljongsrør med CZA, dermed ingen vekst i buljongsrør med CZA-ATM kombinasjonen heller. De samme resultatene ble observert gjennom de fire ulike dagene, for denne stammen også. Resultatene fra disk elueringsmetodene var uendrede gjennom alle parallellene.

Ved disk diffusjonsmetoden hadde millimeterzonene rundt både CZA og ATM en variasjon på 1-2mm gjennom de fire dagene. Hemningssoner rundt CZA-lapp var >13mm, og hemningssoner rundt ATM-lapp var <21mm. Synergien for denne stammen kunne ikke vurderes, dermed ble svaret inkonklusiv.

Tabell 9: Reproduserbarhetsforsøk. Tabellen viser resultatene fra reproduserbarhetsanalyser, utført på de tre utvalgte stammene. Til venstre vises resultatene for disk elueringsmetoden, og til høyre resultatene fra disk diffusjonsmetoden.

Stammene	Dag	Parallell	Disk eluering					Disk diffusjon		
			Vekst-kontroll	ATM	CZA	CZA-ATM	Synergi*	ATM (mm)	CZA (mm)	CZA-ATM/Synergi*
1	1 (20/3)	1	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
		2		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	13	9	Pos
	2 (21/3)	1	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	11	9	Pos
		2		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	11	9	Pos
	3 (22/3)	1	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
		2		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	12	9	Pos
	4 (23/3)	1	Vekst	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	13	9	Pos
		2		Vekst	Vekst	Ikke vekst	Pos	13	9	Pos
21	1 (20/3)	1	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
		2		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
	2 (21/3)	1	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	33	29	Ink
		2		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	34	30	Ink
	3 (22/3)	1	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
		2		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	32	28	Ink
	4 (23/3)	1	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	31	27	Ink
		2		Ikke vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	31	28	Ink
31	1 (20/3)	1	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	26	Ink
		2		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	13	25	Ink
	2 (21/3)	1	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	15	28	Ink
		2		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	14	28	Ink
	3 (22/3)	1	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	14	27	Ink
		2		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	15	27	Ink
	4 (23/3)	1	Vekst	Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	14	26	Ink
		2		Vekst	Ikke vekst	Ikke vekst	Ink	14	26	Ink

\* Pos = positiv, Ink = inkonklusiv

### 3.2.2.1 Statistiske analyser - reproduserbarhet

Reproduserbarhet er beregnet ut ifra to paralleller for de tre stammene som ble satt opp en gang per dag i fire ulike dager, vist i tabell 9. Det er kun millimeter sonene ved disk diffusjon som ble benyttet i beregningen. Standardavviket er beregnet i henhold til formel 2, og variasjonskoeffisienten i henhold til formel 3.

#### Stamme 1

$$\sigma_{ATM} = 0,78$$

$$\sigma_{CZA} = 0$$

$$\bar{x}_{ATM} = 12,1$$

$$\bar{x}_{CZA} = 9$$

$$CV\% = \frac{0,78}{12,1} \times 100 = 6,4 \%$$

$$CV\% = \frac{0}{9} \times 100 = 0 \%$$

Verdiene fra hemningssonene i mm ble brukt for å beregne standardavvik, gjennomsnitt og variasjonskoeffisienten til stamme 1. Standardavviket ble beregnet til å være 0,78 for ATM og 0 for CZA. Gjennomsnittet ble beregnet til å være 12,1 for ATM og 9 for CZA. Variasjonskoeffisienten ble beregnet til å være 6,4% for ATM og 0% for CZA.

#### Stamme 21

$$\sigma_{ATM} = 0,92$$

$$\sigma_{CZA} = 0,83$$

$$\bar{x}_{ATM} = 33,1$$

$$\bar{x}_{CZA} = 28,3$$

$$CV\% = \frac{0,92}{33,1} \times 100 = 2,8 \%$$

$$CV\% = \frac{0,83}{28,3} \times 100 = 2,9 \%$$

Verdiene fra hemningssonene i mm ble brukt for å beregne standardavvik, gjennomsnitt og variasjonskoeffisienten til stamme 21. Standardavviket ble beregnet til å være 0,92 for ATM og 0,83 for CZA. Gjennomsnittet ble beregnet til å være 33,1 for ATM og 28,3 for CZA. Variasjonskoeffisienten ble beregnet til å være 2,8% for ATM og 2,9% for CZA.

#### Stamme 31

$$\sigma_{ATM} = 0,7$$

$$\sigma_{CZA} = 0,99$$

$$\bar{x}_{ATM} = 14$$

$$\bar{x}_{CZA} = 26,6$$

$$CV\% = \frac{0,7}{14} \times 100 = 5,0\%$$

$$CV\% = \frac{0,99}{26,6} \times 100 = 3,7 \%$$

Verdiene fra hemningssonene i mm ble brukt for å beregne standardavvik, gjennomsnitt og variasjonskoeffisienten til stamme 31. Standardavviket ble beregnet til å være 0,7 for ATM og 0,99 for CZA. Gjennomsnittet ble beregnet til å være 14,0 for ATM og 26,6 for CZA. Variasjonskoeffisienten ble beregnet til å være 5,0% for ATM og 3,7% for CZA.

## 4. Diskusjon

I dette kapittelet tolkes og diskuteres resultatene fra forsøket.

### 4.1 ESBL<sub>CARBA</sub>

Innsamlet data fra synergitestning blir vurdert opp mot resultatene fra K-res. Hensikten med sammenligningen er å vurdere graden av samsvaret mellom laboratoriene. Forventede resultat for ESBL<sub>CARBA</sub> stammene er resultatene som ble mottatt fra K-res (Se vedlegg 5).

Ifølge statistiske analyser av riktighetsforsøket, ligger prosentvist samsvar for disk diffusjonsmetoden på 90%, mellom dette forsøket og resultatene fra K-res, som er høyere enn prosentvist samsvar for disk elueringsmetoden, som ligger på 75%. I tillegg, ifølge tabell 2, tyder  $\kappa$ -verdi 0,74 fra disk diffusjonsmetoden på at det er et betydelig samsvar mellom resultatene fra dette forsøket og K-res. Derimot tyder  $\kappa$ -verdi 0,45 fra disk elueringsmetodene på at det er moderat samsvar mellom resultatene, som vist i tabell 2. Disse resultatene oppfyller ikke kravet for metodevalidering, men de viser at diffusjonsmetoden har større evne til å bli reproduserbar mellom laboratorier. Denne observasjonen støttes av andre studier, som har vurdert disk diffusjonsmetoden til å være en pålitelig metode for screening av synergi blant CPE (38,39).

De ESBL<sub>CARBA</sub> stammene som ble benyttet i dette forsøket hadde begrenset variasjon i carbapenemase-enzymet. Dette representerer en utfordring, ettersom metodevalidering krever testing mot et bredere spekter av carbapenemaser for å sikre metodens egenhet og pålitelighet.

### 4.2 ESBL<sub>A/M</sub>

Som nevnt i delkapittel 2.1.1 er ikke ESBL<sub>A/M</sub> stammene sekvensert, og tilstedeværelsen av disse enzymene ble påvist kun fenotypisk. Hos disse stammene kan det være ulike enzymer som påvirker resistensmønster, men som ikke kan påvises ved fenotypiske tester. Derfor er det ikke et spesifikt forventet resultat for disse stammene.

Hos Enterobacteriales med ESBL<sub>A</sub> og/eller ESBL<sub>M</sub> enzymer er det vanligvis observert resistens mot ATM og følsomhet mot CZA (25,27,32). Dette resistensmønsteret ble observert i seks av de ti ESBL<sub>A/M</sub> stammene som ble testet i dette forsøket, som vist i tabell 5. For disse stammene ble synergien vurdert som inkonklusiv, på grunn av deres følsomhet for CZA. De resterende fire stammene viste ulikt resistensmønster mot de to antibiotika.

Stamme 36 viste resistens mot både CZA og ATM med begge to metodene. Derimot viste stammen følsomhet mot CZA-ATM kombinasjonen og ble vurdert som positiv for synergi. Stamme 37 viste følsomhet for både CZA og ATM med begge to metodene. Stammene 33 og 40 hadde ingen vekst på buljongrør som inneholdte ATM-lapp ved disk elueringsmetoden, og de hadde en 25 mm hemningssoner rundt ATM-lapp ved disk diffusjonsmetoden. Brytningspunktet for ATM-følsomhet er  $\geq 26$  mm. Dette tyder på at de to stammene er følsomme ved økt eksponering for ATM. Disse observasjonene understreker at det er vanskelig å forutse resistens ut fra bare fenotypisk påvist ESBL. For å kunne best predikere behandlingseffekt hos disse type mikroben er det behov for å utføre både genotypisk testing og synergitestning.

I tillegg, ut ifra resultater av denne delen av forsøket, er den største forskjellen mellom de to metodene at med disk diffusjonsmetode kan man kategorisere følsomhet på bakgrunn av brytningspunktene. Dette gjør det mulig å vurdere om bakteriestammen er følsom, følsom ved økt eksponering eller resistent mot en gitt antibiotika. I motsetning, ved disk elueringsmetode, kan man kun vurdere visuelt om det er vekst eller ikke i buljongrørene. Dette gjør det utfordrende å vurdere følsomhetsgraden til bakteriestammen. Et eksempel på dette er stamme 33 og 40, som ble vurdert som følsom ved økt eksponering for ATM ved disk diffusjonsmetoden, mens det var ingen vekst ved disk eluering.

### **4.3 Negative kontroller**

De forventede resultatet ved testing av negative kontrollstammer er at de skal være følsomme for ATM og CZA. Siden stammene skal være følsomme for antibiotikaene, er det ikke forventet noe synergi. Ved disk eluering er det forventet ingen vekst i buljongrørene som inneholder CZA og ATM alene. Ved disk diffusjon er det forventet at hemningssonene rundt CZA skal være  $\geq 13$  mm. Videre er det forventet at hemningssonene rundt ATM skal være  $\geq 26$  mm (Se vedlegg 2). Det er forventet at disse stammene skal være følsomme for både CZA og ATM fordi de har ingen ESBL enzym.

Tabell 4 viser resultater fra synergitestning for de negative kontrollene. Det er observert 100% overenstemmelse med forventet resultat for både disk eluering og disk diffusjonsmetode.



#### 4.4 Presisjon

For å vurdere presisjon, ble parameterne repeterbarhet og reproduserbarhet benyttet. Kravet til disse parametrene ble bestemt til å være CV% <15 (Se vedlegg 4). Dette ble beregnet kun på disk diffusjonsmetoden, vist under 3.2.1.1 Statistiske analyser – repeterbarhet og 3.2.2.1 Statistiske analyser – reproduserbarhet. Her ble variasjonen på avlesning av millimersonene benyttet.

Resultatene fra disk diffusjon oppfylte kravene for CV%. Disk elueringsmetoden hadde ikke et tallfestet mål, derfor måtte metoden vurderes på en annen måte. Disk elueringsmetoden viste 100% overenstemmelse mellom resultatene av påfølgende målingene utført under repeterbarhet- og reproduserbarhetsforsøket. Dermed var det ingen variasjon i innen-serie og mellom-serie målingene. Resultatene fra presisjonsforsøket av disk elueringsmetoden støttes av studiet gjennomført av Khan et al. (2021) (40). Allikevel viste en gjentatt test av en ESBL<sub>CARBA</sub>-stamme i denne oppgaven, ved disk elueringsmetoden, en betydelig avvikelse fra disse funnene (Se vedlegg 10). En av resultatene endret seg og viste dårlig reproduserbarhet, noe som strider mot det som ble observert i presisjonsforsøkene.

#### 4.5 Praktisk egenhet

Med hensyn til definisjonen av praktisk egenhet, ble metodene disk eluering og disk diffusjon sammenlignet. I dette delavsnittet vurderes egenheten av metodene ved AMM i Molde og Ålesund med tanke på materialer, tidsbruk og kostnader. Videre skal det presenteres observasjoner fra det praktiske arbeidet og sammenlignes med funn fra andre studier. Direkte sammenligning med disse funnene er utfordrende på grunn av bruk av andre ESBL<sub>CARBA</sub>-resistente stammer, enn *E.coli* og *K.pneumoniae*, med andre mulige resistensmekanismer enn enzymproduksjon som gjør dem resistente mot CZA-ATM kombinasjonen. I noen tilfeller blir den fullstendige resistensprofilen heller ikke inkludert for de mikrobenene brukt i studien. Derfor bør disse resultatene tolkes med forsiktighet.

Flere studier hevder at avlesning av resultater ved disk diffusjonsmetoden kan være utfordrende (36,40). I motsetning, ut ifra observasjoner under det praktiske arbeidet av dette forsøket, var det lettere å vurdere synergi resultater ved disk diffusjonsmetoden enn ved disk eluering metoden. Dette er fordi det kan være utfordrende å vurdere om buljongrør er blakket eller ikke uten en referanse. Derimot var det enkelt å vurdere tilstedeværelse av hemningssoner mellom CZA og ATM lapper på agaren. Videre har det kommet fram i studiene at disk

elueringsmetoden er rimelig og at materialene er lett tilgjengelige for mikrobiologiske laboratorier (36,40). Dette er ikke tilfelle ved AMM i Molde og Ålesund, der MH-buljong blir ikke benyttet, mens MH-skåler benyttes rutinemessig til resistensbestemmelse. Om de to laboratoriene velger å innføre disk elueringsmetoden, vil det føre til tilleggskostnader hos de to avdelingene.

Ifølge overlegen ved AMM i Molde og Ålesund, er funn av carbapenemaseproduserende mikrober sjeldent ved avdelingen på dette tidspunktet; ca. 10 ganger per år. Bruk av disk elueringsmetoden vil kreve at laboratoriene har MH-buljong tilgjengelig til enhver tid, som er klar til bruk ved tilfeldig funn av CPE stammer. Siden MH-buljong har to ukers holdbarhetstid, vil den ofte utløpe før den blir oppbrukt (45). Dette skyldes den lave prøvemengden per år, og at AMM i Molde og Ålesund ikke benytter dette materialet til vanlig. MH-skåler har tre ukers holdbarhetstid, men er i bruk rutinemessig i laboratoriene, som gjør at de blir brukt opp før de går ut på dato.

Disk eluering er en mer tidkrevende metode enn disk diffusjon. Dette skyldes at buljongene må inkuberes sammen med antibiotikalapper i 30 minutter før de inokuleres, i motsetning til disk diffusjonsmetoden som ikke krever inkubering med antibiotikalapper. Om avdelingen velger å benytte gjenbrukbart utstyr til utføring av disk elueringsmetoden, herunder glassrør, metalltopper og dispenser, må disse autoklaveres i forkant av bruk (denne prosessen tar cirka en time). Dette er fordi utstyret må være sterilt. Dette forlenger den nødvendige tiden denne metoden krever. I motsetning, er disk diffusjon mindre tidkrevende enn disk eluering, fordi utstyret som blir brukt for denne metoden er engangsutstyr.

Det som er likt for disk eluering og disk diffusjon er at begge metoder krever at arbeid utføres i avtrekkskap der personalet benytter smittefrakk og hansker.

Med tanke på praktisk egenhet, som går ut på arbeidsressurser og kostnader, så er det lite hensiktsmessig å benytte disk elueringsmetoden fremfor disk diffusjon i laboratorier ved AMM i Molde og Ålesund.

#### **4.6 Klinisk nytteverdi**

Klinisk nytteverdi refererer til metodenes evne til å veilede den behandlende legen mot den riktige behandlingen av pasienter (41). Selv om kombinasjonen av CZA og ATM er den anbefalt behandlingen for infeksjoner forårsaket av MBL-produserende CPE, er det utfordrende å predikere behandlingsutfall ut ifra resultatene av in-vitro synergitestning (5). Selv

når synergien mellom CZA og ATM er synlig, kan det være vanskelig å oversette dette til konkret behandlingseffekt. Dette skyldes blant annet at det er ikke mulig å kvantifisere synergien nøyaktig ved bruk av disk eluering og disk diffusjon. Per dagsdato er det få kliniske studier som sammenligner funn av synergi in-vitro og observert klinisk effekt av behandlingen. I tillegg finnes det andre faktorer som spiller en rolle i behandlingsutfall, som bl.a. tilstedeværelsen av andre resistensmekanismer i bakteriestammen som forårsaker infeksjon. Resultatene bør derfor tolkes med forsiktighet, og det er viktig at den ansvarlige legen vurderer alle aspekter av pasientens tilstand.

## 5. Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven var å finne ut hvilken metode er mest egnet og pålitelig for å påvise synergi mellom CZA-ATM på carbapenemaseproduserende Enterobacterales. For å evaluere metodene ble variablene riktighet og presisjon fra metodevalidering benyttet.

Resultatene fra forsøket viser at disk diffusjonsmetoden har større evne for reproduserbarhet mellom laboratorier. Med tanke på arbeidsressurser og kostnader, ble det konkludert at det er mer hensiktsmessig å benytte disk diffusjonsmetoden i laboratorier ved AMM i Molde og Ålesund.

Oppsummert viser resultatene av dette forsøket at disk diffusjonsmetoden er bedre egnet og mer pålitelig enn disk elueringsmetoden for å påvise synergi på ESBL<sub>CARBA</sub> produserende stammer. En begrensning med forsøket var bruk av ESBL<sub>CARBA</sub> produserende stammer med lite variasjon i MBL enzymer. Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi i Molde og Ålesund bør velge en av de metodene i bakgrunn av resultatene fra dette forsøket, og fortsette med metodevalidering med mer varierende isolater med forskjellige betalaktamaser. I tillegg bør sammenhengen mellom funn av synergi in-vitro og effekten av behandling undersøkes videre ved kliniske studier.

## 6. Referanseliste

1. Veterinærinstituttet, Folkehelseinstituttet. NORM NORM-VET 2022 Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø/Oslo 2023;
2. Folkehelseinstituttet [Internett]. 2023 [sitert 13. april 2024]. ESBL-produserende gramnegative bakterier, herunder karbapenemaseproduserende bakterier (CPO). Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/sm/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>
3. Sare M, Langlete P, Molvik M, Raastad R, Eriksen-Volle HM. Forekomst av resistente bakterier og sopp med spesiell betydning for smittevern i helsetjenesten i Norge.
4. Liu Z, Xiubing H, Yan T, Chu W, Gong Z, Liu Y, mfl. A Simple Disk Stacking Plus Micro-Elution Method for Rapid Detection of the Synergistic Effect of Aztreonam and Ceftazidime/Avibactam Against Metallo- $\beta$ -Lactamase Producing Enterobacterales [Internett]. [sitert 10. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.2147/IDR.S402275?needAccess=true>
5. Infectious Disease Society of America I. IDSA 2023 Guidance on the Treatment of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Infections. [sitert 16. mai 2024]. AMR Guidance. Tilgjengelig på: <https://www.idsociety.org/practice-guideline/amr-guidance/>
6. Rollag H, Muller F, Tønjum T. Medisinsk mikrobiologi. 4. utgave. Oslo: Gyldendal; 2019.
7. Bhonchal Bhardwaj S, redaktør. Enterobacteria [Internett]. IntechOpen; 2022 [sitert 13. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.intechopen.com/books/11375>
8. Moreira de Gouveia MI, Bernalier-Donadille A, Jubelin G. Enterobacteriaceae in the Human Gut: Dynamics and Ecological Roles in Health and Disease. *Biology*. mars 2024;13(3):142.
9. Etebu E, Arikekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*. 1. januar 2016;4:90–101.
10. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. august 2016;6(8):a025247.
11. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*. 28. januar 2020;8(1):13.
12. Bonomo RA.  $\beta$ -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*. januar 2017;7(1):a025239.

13. Norsk legemiddelhåndbok. L1.2.4 Cefalosporiner | Legemiddelhåndboka [Internett]. [sitert 4. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.4/Cefalosporiner>
14. Norsk legemiddelhåndbok. L1.2.4.11 Cefuroksim | Legemiddelhåndboka [Internett]. [sitert 4. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.4.11/Cefuroksim>
15. Norsk legemiddelhåndbok. L1.2.4.7 Ceftazidim | Legemiddelhåndboka [Internett]. [sitert 4. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.4.7/Ceftazidim>
16. Norsk legemiddelhåndbok. L1.2.6 Karbapenemer | Legemiddelhåndboka [Internett]. [sitert 4. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.6/Karbapenemer>
17. Norsk legemiddelhåndbok. L1.2.5.1 Aztreonam | Legemiddelhåndboka [Internett]. [sitert 4. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.5.1/Aztreonam>
18. Folkehelseinstituttet [Internett]. 2023 [sitert 10. april 2024]. Antimikrobiell resistens - veileder for helsepersonell om antibiotikaresistens, antibiotikabruk og antiviral resistens. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/sm/smittevernveilederen/temakapitler/antibiotikaresistens/>
19. Universitet I Oslo, Institutt for biovitenskap. Integron [Internett]. [sitert 10. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/i/integron.html>
20. Murray LM, Hayes A, Snape J, Kasprzyk-Hordern B, Gaze WH, Murray AK. Co-selection for antibiotic resistance by environmental contaminants. *npj Antimicrob Resist.* 1. april 2024;2(1):1–13.
21. Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1. juni 1998;41(suppl\_4):25–41.
22. Palzkill T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2013;1277(1):91–104.
23. Bradford A. P. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews.* oktober 2001;14:933–51.
24. Giske CG, Martinez-Martine L, Cantón R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, mfl. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017.
25. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, mfl. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* januar 2009;63(1):1–4.
26. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* mars 2010;54(3):969–76.

27. Bush K. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* oktober 2018;62(10):e01076-18.
28. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol* [Internett]. 5. september 2016 [sitert 11. april 2024];7. Tilgjengelig på: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.01374/full>
29. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews.* januar 2009;22(1):161–82.
30. Jacoby GA.  $\beta$ -Lactamase Nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* april 2006;50(4):1123–9.
31. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* januar 2010;23(1):160–201.
32. Carcione D, Siracusa C, Sulejmani A, Leoni V, Intra J. Old and New Beta-Lactamase Inhibitors: Molecular Structure, Mechanism of Action, and Clinical Use. *Antibiotics.* august 2021;10(8):995.
33. Bush K. Synergistic Antibiotic Combinations. I: Fisher JF, Mobashery S, Miller MJ, redaktører. *Antibacterials: Volume I* [Internett]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [sitert 10. april 2024]. s. 69–88. Tilgjengelig på: [https://doi.org/10.1007/7355\\_2017\\_23](https://doi.org/10.1007/7355_2017_23)
34. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. eucast: New S, I and R definitions [Internett]. [sitert 18. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.eucast.org/newsiandr>
35. Turnidge J, Paterson DL. Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. *Clin Microbiol Rev.* juli 2007;20(3):391–408.
36. Collar G da S, Moreira NK, Becker J, Barth AL, Caierão J. Determination of aztreonam/ceftazidime-avibactam synergism and proposal of a new methodology for the evaluation of susceptibility *in vitro*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 1. juni 2024;109(2):116236.
37. Finegold SM, Rolfe RD. Susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 1. mars 1983;1(1):33–40.
38. Wilhelm CM, Inamine E, Martins AF, Barth AL. Evaluation of Aztreonam and Ceftazidime/Avibactam Synergism against *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS. *Antibiotics (Basel).* 16. juni 2023;12(6):1063.
39. Verschelden G, Noeparast M, Stoefs A, Van Honacker E, Vandoorslaer K, Vandervore L, mfl. Aztreonam-avibactam synergy, a validation and comparison of diagnostic tools. *Front Microbiol* [Internett]. 29. november 2023 [sitert 23. april 2024];14. Tilgjengelig på: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1322180/full>

40. Khan A, Erickson SG, Pettaway C, Arias CA, Miller WR, Bhatti MM. Evaluation of Susceptibility Testing Methods for Aztreonam and Ceftazidime-Avibactam Combination Therapy on Extensively Drug-Resistant Gram-Negative Organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 18. oktober 2021;65(11):10.1128/aac.00846-21.
41. Noklus. Validering/verifisering av kliniske analyser [Internett]. Norsk klinisk-kjemisk kvaliteteskontroll; 2002. Tilgjengelig på:  
[https://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val\\_NKK.pdf](https://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val_NKK.pdf)
42. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*. 1. august 2009;877(23):2224–34.
43. Noklus. ehandboken.ous-hf.no. [sitert 8. april 2024]. Validering/verifisering av analysemetoder, MBK. Tilgjengelig på: <https://ehandboken.ous-hf.no/document/35778>
44. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)*. 15. oktober 2012;22(3):276–82.
45. LABOQUIMIA. Merck Microbiology Manual [Internett]. 12. utgave. Tilgjengelig på:  
[http://www.laboquimia.es/pdf\\_catalogo/MERCK\\_Manual\\_de\\_microbiologia\\_12a\\_edicion.pdf](http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/MERCK_Manual_de_microbiologia_12a_edicion.pdf)
46. Lydersen S. Cohens kappa – et mål på samsvar mellom observatører. *Tidsskrift for Den norske legeforening* [Internett]. 5. mars 2018 [sitert 13. april 2024]; Tilgjengelig på:  
<https://tidsskriftet.no/2018/03/medisin-og-tall/cohens-kappa-et-mal-pa-samsvar-mellom-observatorer>
47. Bolann BJ, Åsberg A. Riktig svar på biokjemiske analyser: praktisk veileder i kvalitetskontroll for medisinske laboratorier. 1. utgave, 1. opplag 2020. Oslo: Cappelen Damm akademisk; 2020.



## 7. Vedlegg

### 7.1 Liste over vedlegg

Vedlegg 1: Utdrag fra EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, v.12.0

Vedlegg 2: Utdrag fra Enterobacterales EUCAST kliniska brytpunkter v. 14.0, NordicAST v. 14.0

Vedlegg 3: Prosedyre – Synergitestning CAZ-AVI + ATM fra K-res

Vedlegg 4: Validerings- og verifiseringsmetodikk fra Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi i Molde og Ålesund

Vedlegg 5: Stammemateriale ESBL<sub>CARBA</sub> fra K-res

Vedlegg 6: Stammemateriale negative kontroller

Vedlegg 7: Stammemateriale ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub>

Vedlegg 8: Andre materialer

Vedlegg 9: Bilde av resultater

Vedlegg 10: Nye testrunder

Vedlegg 11: Risikoanalyse

**Vedlegg 1: Utdrag fra EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, v.12.0**



**EUCAST**

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

# **Antimicrobial susceptibility testing**

## **EUCAST disk diffusion method**

**Version 12.0**

**January 2024**

<b>Contents</b>		<b>Page</b>
	<a href="#">Changes from previous version</a>	
	<a href="#">Abbreviations and terminology</a>	
1	<a href="#">Introduction</a>	5
2	<a href="#">Preparation and storage of media</a>	6
3	<a href="#">Preparation of inoculum</a>	8
4	<a href="#">Inoculation of agar plates</a>	10
5	<a href="#">Application of antimicrobial disks</a>	11
6	<a href="#">Incubation of plates</a>	12
7	<a href="#">Examination of plates after incubation</a>	14
8	<a href="#">Measurement of zones and interpretation of susceptibility</a>	15
9	<a href="#">Quality control</a>	17
	<a href="#">Appendix A</a>	21

Changes from previous version (v. 11.0)

<b>Section</b>	<b>Change</b>
<b>Abbreviations and terminology</b>	Definition of overnight culture added
<b>Table 1</b>	<i>Brucella melitensis</i> added
<b>3.3</b>	Acceptable interval for 0.5 McFarland added
<b>3.3.3</b>	Acceptable interval for 1.0 McFarland added
<b>Table 3</b>	<i>Bacillus anthracis</i> and <i>Brucella melitensis</i> added
<b>8.9.2</b>	Specific reading instructions for <i>Brucella melitensis</i> with trimethoprim-sulfamethoxazole added
<b>8.9.13</b>	Specific reading instructions for <i>Brucella melitensis</i> with rifampicin added
<b>Appendix Table A1</b>	<b>A</b> Acceptable interval for incubation of <i>Campylobacter</i> added

## Abbreviations and terminology

ATCC	American Type Culture Collection <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
CCUG	Culture Collection University of Gothenburg <a href="http://www.ccug.se">http://www.ccug.se</a>
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo <a href="http://www.cect.org">http://www.cect.org</a>
CFU	Colony Forming Unit
CIP	Collection de l'Institut Pasteur <a href="https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collectioninstitut-pasteur-cip">https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collectioninstitut-pasteur-cip</a>
DSM	Bacterial cultures from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) <a href="https://www.dsmz.de">https://www.dsmz.de</a>
ESBL	Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a>
MH	Mueller-Hinton agar
MH-F	Mueller-Hinton agar for Fastidious organisms (MH supplemented with 5% defibrinated horse blood and 20 mg/L $\beta$ -NAD)
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (with <i>mecA</i> or <i>mecC</i> gene)
NCTC	National Collection of Type Cultures <a href="https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc">https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc</a>
$\beta$ -NAD	$\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide
QC	Quality Control
Saline	A 0.85% solution of NaCl in water (8.5 g/L)
Overnight culture	Bacterial culture incubated for 16-24 h

**1****Introduction**

Disk diffusion is one of the oldest approaches to antimicrobial susceptibility testing and remains one of the most widely used antimicrobial susceptibility testing methods in routine clinical laboratories. It is suitable for testing the majority of bacterial pathogens, including the more common fastidious bacteria, is versatile in the range of antimicrobial agents that can be tested and requires no special equipment.

In common with several other disk diffusion techniques, the EUCAST method is a standardised method based on the principles defined in the report of the International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing, 1971<sup>1</sup>, and the experience of expert groups worldwide.

The zone diameter breakpoints in the EUCAST disk diffusion method are calibrated to the harmonised European MIC breakpoints that are published by EUCAST and are freely available from the EUCAST website (<http://www.eucast.org>).

As with all standardised methods, the described technique must be followed without modification in order to produce reliable results.

The EUCAST methodology for disk diffusion of anaerobic bacteria is described in a separate document ([https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology)).

---

<sup>1</sup> H M Ericsson and J C Sherris. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*. 1971;217:Suppl 217:1+.

**2****Preparation and storage of media**

- 2.1 Prepare Mueller-Hinton (MH) agar according to the manufacturer's instructions, with supplementation for fastidious organisms as indicated in **Table 1**. Preparation and addition of supplements are described in detail at <http://www.eucast.org>.
- 2.2 The medium should have a level depth of 4.0 ± 0.5 mm (approximately 25 mL in a 90 mm circular plate, 31 mL in a 100 mm circular plate, 71 mL in a 150 mm circular plate, 40 mL in a 100 mm square plate). Ascertain that a correct volume, based on the true dimensions of the Petri dish in use, is calculated. Plate dimensions may differ between manufacturers.
- 2.3 The surface of the agar should be dry before use. No drops of water should be visible on the surface of the agar or inside the lid. If necessary, dry plates either at 20-25°C overnight, or at 35°C, with the lid removed, for 15 min. Do not over-dry plates.
- 2.4 Store plates prepared in-house at 4-8°C.
- 2.5 For plates prepared in-house, plate drying, storage conditions and shelf life should be determined as part of the laboratory quality assurance programme.
- 2.6 Commercially prepared plates should be stored as recommended by the manufacturer and used within the labelled expiry date.
- 2.7 For agar plates (commercially or in-house prepared) stored in plastic bags or sealed containers, it may be necessary to dry the plates prior to use (see section 2.3). This is to avoid excess moisture, which may result in problems with fuzzy zone edges and/or haze within zones.

<b>Table 1 Media for antimicrobial susceptibility testing</b>	
<b>Organism</b>	<b>Medium</b>
<i>Enterobacteriales</i>	MH agar
<i>Pseudomonas</i> spp.	MH agar
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MH agar
<i>Acinetobacter</i> spp.	MH agar
<i>Staphylococcus</i> spp.	MH agar
<i>Enterococcus</i> spp.	MH agar
Streptococcus groups A, B, C and G	MH-F agar <sup>2</sup>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
Viridans group streptococci	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Haemophilus influenzae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Pasteurella multocida</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i> and <i>coli</i>	MH-F agar <sup>1</sup> (see Appendix A)
<i>Corynebacterium</i> spp.	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Aerococcus sanguinicola</i> and <i>urinae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Kingella kingae</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Aeromonas</i> spp.	MH agar
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	MH agar
<i>Vibrio</i> spp.	MH agar
<i>Bacillus</i> spp.	MH agar
<i>Brucella melitensis</i>	MH-F agar <sup>1</sup>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	MH agar

<b>3</b>	<b>Preparation of inoculum</b>
3.1	<p>Use the direct colony suspension method to make a suspension of the organism in saline to the density of a 0.5 McFarland turbidity standard (<b>Table 2</b>), approximately corresponding to 1-2 x 10<sup>8</sup> CFU/mL for <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>The direct colony suspension method is appropriate for all organisms, including fastidious organisms in <b>Table 1</b>.</p>
3.2	<p>Use a sterile loop or a cotton swab to pick colonies from an overnight culture nonselective media. Use several morphologically similar colonies (when possible) to avoid selecting an atypical variant. Suspend the colonies in saline and mix to an even turbidity.</p>

<sup>2</sup> MH + 5% mechanically defibrinated horse blood + 20 mg/L β-NAD

### 3.3

Adjust the density of the organism suspension to 0.5 (acceptable variation 0.4-0.6) McFarland by adding saline or more bacteria. A denser inoculum will result in reduced zones of inhibition and a decreased inoculum will have the opposite effect.

#### 3.3.1

It is recommended that a photometric device is used to adjust the density of the suspension. The photometric device must be calibrated against a 0.5 McFarland standard according to the manufacturer's instruction.

#### 3.3.2

Alternatively, the density of the suspension can be compared visually to a 0.5 McFarland turbidity standard. To aid comparison, compare the test and standard against a white background with black lines.

#### 3.3.3

*Streptococcus pneumoniae* is, preferably, suspended from a blood agar plate to the density of a 0.5 McFarland standard. When *Streptococcus pneumoniae* is suspended from a chocolate agar plate, the inoculum must be equivalent to a 1.0 (acceptable variation 0.9-1.1) McFarland standard.

### 3.4

The suspension should optimally be used within 15 min<sup>3</sup> and always within 60 min of preparation.

**Table 2**

**Preparation of 0.5 McFarland turbidity standard**

1	Add 0.5 mL of 0.048 mol/L BaCl <sub>2</sub> (1.175% w/v BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O) to 99.5 mL of 0.18 mol/L (0.36 N) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1% v/v) and mix thoroughly.
2	Check the density of the suspension in a spectrophotometer with a 1 cm light path and matched cuvettes. The absorbance at 625 nm should be in the range 0.08 to 0.13.
3	Distribute the suspension into tubes of the same size as those used for bacterial inoculum suspensions. Seal the tubes.
4	Store sealed standards in the dark at room temperature.
5	Mix the standard thoroughly on a vortex mixer immediately before use.

<sup>3</sup> Part of the 15-15-15 minute rule: use the inoculum suspension within 15 minutes of preparation, apply disks within 15 minutes of inoculation and incubate plates within 15 minutes of disk application.



4	Inoculation of agar plates
4.1	Make sure that agar plates are at room temperature prior to inoculation.
4.2	Optimally, use the adjusted inoculum suspension within 15 min <sup>4</sup> of preparation. The suspension must always be used within 60 min of preparation.
4.3	Dip a sterile cotton swab into the suspension.
4.3.1	To avoid over-inoculation of Gram-negative bacteria, remove excess fluid by pressing and turning the swab against the inside of the tube.
4.3.2	For Gram-positive bacteria, do not press or turn the swab against the inside of the tube.
4.4	When inoculating several agar plates with the same inoculum suspension, repeat the procedure in section 4.3 for each agar plate.
4.5	Plates can be inoculated either by swabbing in three directions or by using an automatic plate rotator. Spread the inoculum evenly over the entire agar surface ensuring that there are no gaps between streaks.
4.5.1	For Gram-positive bacteria, take particular care to ensure that there are no gaps between streaks.
4.6	Apply disks within 15 min <sup>1</sup> of inoculation. If inoculated plates are left at room temperature for prolonged periods of time before the disks are applied, the organism may begin to grow, resulting in erroneous reduction in sizes of inhibition zone diameters.

---

<sup>4</sup> Part of the 15-15-15 minute rule: use the inoculum suspension within 15 minutes of preparation, apply disks within 15 minutes of inoculation and incubate plates within 15 minutes of disk application.

<b>5</b>	<b>Application of antimicrobial disks</b>
5.1	The required disk contents are listed in the Breakpoint and Quality Control Tables at <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> .
5.1.1	The EUCAST zone diameter breakpoints and disk quality control criteria are validated for 6-mm paper disks.
5.2	Allow disks to reach room temperature before opening cartridges or containers used for disk storage. This is to prevent condensation, leading to rapid deterioration of some agents.
5.3	Apply disks firmly to the surface of the inoculated agar plate within 15 minutes of inoculation <sup>5</sup> . Disks must be in close and even contact with the agar surface and must not be moved once they have been applied as the initial diffusion of antimicrobial agents from disks is very rapid.
5.4	The number of disks on a plate should be limited to avoid overlapping of zones and interference between agents. It is important that zone diameters can be reliably measured. The maximum number of disks depends on the organism and the selection of disks. Normally 6 and 12 disks are the maximum possible number on a 90 and 150 mm circular plate, respectively.
5.4.1	To be able to detect inducible clindamycin resistance in staphylococci and streptococci, the erythromycin and clindamycin disks must be placed at a distance of 12-20 mm from edge to edge for staphylococci and 12-16 mm from edge to edge for streptococci.
5.5	Loss of potency of antimicrobial agents in disks results in reduced inhibition zone diameters and is a common source of error. The following are essential:
5.5.1	Store disks, including those in dispensers, in sealed containers with a moisture-indicating desiccant and protected from light (some agents, including metronidazole, chloramphenicol and the fluoroquinolones, are inactivated by prolonged exposure to light).
5.5.2	Store disk stocks according the manufacturers' instructions. Some agents are more labile than others (e.g. amoxicillin-clavulanic acid, cefaclor and carbapenems) and specific recommendations may be available from the manufacturers.

<sup>5</sup> Part of the 15-15-15 minute rule: use the inoculum suspension within 15 minutes of preparation, apply disks within 15 minutes of inoculation and incubate plates within 15 minutes of disk application.

- |       |  |
|-------|--|
| 5.5.3 | Store working supplies of disks according to the manufacturers' instructions. Once disk containers have been opened, disks should be used within the time limit specified by the manufacturer. |
| 5.5.4 | Discard disks on the manufacturer's expiry date shown on the container.  |
| 5.5.5 | Perform frequent quality control (see Section 9) of working supplies to control that the antimicrobial disks have not lost potency during storage.   |

<b>6</b>	<b>Incubation of plates</b>
----------	-----------------------------

- |       |  |
|-------|--|
| 6.1   | Invert agar plates and make sure disks do not fall off the agar surface. Incubate plates within 15 min <sup>6</sup> of disk application. If the plates are left at room temperature after disks have been applied, pre-diffusion may result in erroneously large zones of inhibition.  |
| 6.2   | Stacking plates in the incubator may affect results due to uneven heating. The efficiency of incubators varies and therefore the control of incubation, including appropriate number of plates in any one stack, should be determined as part of the laboratory's quality assurance programme. For most incubators, a maximum of five plates per stack is appropriate. |
| 6.3   | Incubate plates in the conditions shown in <b>Table 3</b> .  |
| 6.3.1 | Incubation beyond the recommended time limits should not be performed as this may result in growth within inhibition zones and reporting isolates as false resistant.  |
| 6.3.2 | With glycopeptide susceptibility tests on <i>Enterococcus</i> spp. resistant colonies may not be visible until plates have been incubated for 24 h. However, plates may be examined after 16-20 h and any resistance reported, but plates of isolates appearing susceptible must be re-incubated and reread at 24 h.   |

---

<sup>6</sup> Part of the 15-15-15 minute rule: use the inoculum suspension within 15 minutes of preparation, apply disks within 15 minutes of inoculation and incubate plates within 15 minutes of disk application.

<b>Table 3</b>	<b>Incubation conditions for antimicrobial susceptibility test plates</b>	
<b>Organism</b>	<b>Incubation conditions</b>	
<i>Enterobacterales</i>	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Pseudomonas</i> spp.	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Acinetobacter</i> spp.	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Staphylococcus</i> spp.	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Enterococcus</i> spp.	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h (24 h for glycopeptides)	
<i>Aeromonas</i> spp.	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Vibrio</i> spp.	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Bacillus</i> spp.	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	35 ± 1°C in air for 18 ± 2 h	
<i>Bacillus anthracis</i>	35 ± 1°C in air for <b>17 ± 1 h</b>	
Streptococcus groups A, B, C and G	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h	
Viridans group streptococci	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h	
<i>Haemophilus influenzae</i>	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h	
<i>Listeria monocytogenes</i>	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h	
<i>Pasteurella multocida</i>	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h	
<i>Brucella melitensis</i>	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for <b>48 ± 2 h</b>	
<i>Campylobacter jejuni</i> and <i>coli</i>	See <b>Appendix A</b>	
<i>Corynebacterium</i> spp.	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h. Isolates with insufficient growth after 16-20 h are re-incubated immediately and inhibition zones read after a total of 40-44 h incubation.	
<i>Aerococcus sanguinicola</i> and <i>urinae</i>	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h. Isolates with insufficient growth after 16-20 h are re-incubated immediately and inhibition zones read after a total of 40-44 h incubation.	
<i>Kingella kingae</i>	35 ± 1°C in 4-6% CO <sub>2</sub> in air for 18 ± 2 h. Isolates with insufficient growth after 16-20 h are re-incubated immediately and inhibition zones read after a total of 40-44 h incubation.	

<b>7</b>	<b>Examination of plates after incubation</b>
7.1	A correct inoculum and satisfactorily streaked plates should result in a confluent lawn of growth.
7.1.1	If individual colonies can be seen, the inoculum is too light and the test must be repeated.
7.2	The growth should be evenly distributed over the agar surface to achieve uniformly circular (non-jagged) inhibition zones.
7.3	Check that inhibition zones for quality control strains are within acceptable ranges ( <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> ).

<b>8</b>	<b>Measurement of zones and interpretation of susceptibility</b>
8.1	For all agents (unless otherwise stated in section 8.9), the zone edge should be read at the point of complete inhibition as judged by the naked eye with the plate held about 30 cm from the eye. Holding the plate at a 45-degree angle to the work bench may facilitate reading when zone edges are difficult to define.
8.2	Read un-supplemented plates from the back with reflected light and the plate held above a dark background.
8.3	Read supplemented plates from the front with the lid removed and with reflected light.
8.4	Do not use transmitted light (plate held up to light) or a magnifying glass, unless otherwise stated (see section 8.9).
8.5	Measure the inhibition zone diameters to the nearest millimetre with a ruler or a calliper.
8.5.1	If an automated zone reader is used, it must be calibrated to manual reading.
8.6	Interpret zone diameters into susceptibility categories according to the current breakpoint tables at <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> .
8.7	If templates are used for interpreting zone diameters, the plate is placed over the template and zones interpreted according to the EUCAST breakpoints marked on the template. Make certain that the breakpoints used are in accordance with the latest version of the EUCAST breakpoint tables. A program for preparation of templates is freely available from <a href="http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program">http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program</a> .
8.8	Several examples of pictures showing reading of inhibition zone diameters are available in the Reading Guide at <a href="http://www.eucast.org">http://www.eucast.org</a> . This document also includes reading instructions for specific organism-antimicrobial agent combinations.
8.9	Specific reading instructions:
8.9.1	In case of double zones, or distinct colonies within zones, check for purity and repeat the test if necessary. If cultures are pure, colonies within zones should be taken into account when measuring the diameter.

8.9.2

For trimethoprim and trimethoprim-sulfamethoxazole, faint growth up to the disk may appear due to antagonists in the medium. Such growth should be ignored and the zone diameter measured at the more obvious zone edge.

For *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Burkholderia pseudomallei* with trimethoprim-sulfamethoxazole, an isolate showing any sign of inhibition zone  $\geq$  the susceptible breakpoint should be reported susceptible. Note that there may be substantial growth within zones. Read as no zone only if there is growth up to the disk and no sign of an inhibition zone.

For *Aeromonas* spp. and *Brucella melitensis* with trimethoprim-sulfamethoxazole, read the obvious zone edge and disregard haze or growth within the inhibition zone. If there is an obvious inner zone edge, read the inhibition zone as the inner zone.

8.9.3

For *Enterobacterales* with ampicillin, ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanic acid, ignore growth that may appear as a thin film producing an inner zone on some batches of Mueller-Hinton agar.

8.9.4

For *Enterobacterales* with temocillin, ignore isolated colonies within the inhibition zone and read the outer zone edge.

8.9.5

For *Enterobacterales* with mecillinam, ignore isolated colonies within the inhibition zone and read the outer zone edge.

8.9.6

For *Escherichia coli* with fosfomycin, ignore isolated colonies within the inhibition zone and read the outer zone edge.

8.9.7

For *Proteus* spp., ignore swarming and read inhibition of growth.

8.9.8

For *Staphylococcus aureus* with benzylpenicillin zone diameters  $\geq$  26 mm, examine the zone edge closely from the front of the plate with the plate held up to light (transmitted light). Isolates with inhibition zone diameters  $\geq$  the susceptible breakpoint, but with sharp zone edges should be reported resistant.

8.9.9

When using cefoxitin for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus* spp., measure the obvious zone, and examine zones carefully in good light to detect colonies within the zone of inhibition. These may be either a contaminating species or the expression of heterogeneous methicillin resistance.

- 8.9.10 For enterococci with vancomycin zone diameters  $\geq 12$  mm, examine the zone edge closely from the front of the plate with the plate held up to light (transmitted light). Fuzzy zone edges and colonies within zone indicate vancomycin resistance and should be investigated further. Isolates must not be reported susceptible before 24 h incubation.
- 8.9.11 For haemolytic streptococci, read inhibition of growth and not inhibition of haemolysis.  $\beta$ -Haemolysis is usually free from growth, whereas  $\alpha$ -haemolysis and growth usually coincide. Tilt the plate back and forth to better differentiate between haemolysis and growth.
- 8.9.12 For *H. influenzae* and beta-lactam agents, read the outer edge of zones where an otherwise clear inhibition zone contains an area of growth around the disk.
- 8.9.13 For *Brucella melitensis* and rifampicin, examine zones carefully for colonies close to the zone edge. Colonies should be taken into account when reading.



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases



## Vedlegg 2: Utdrag fra Enterobacterales EUCAST klinisk brytpunkter v. 14.0, NordicAST v. 14.0

### *Enterobacterales*\*

EUCAST kliniska brytpunkter v. 14.0, NordicAST v. 14.0,  
2024-01-19

#### Expert Rules and Expected Phenotypes

For abbreviations and explanations of breakpoints, see the Notes sheet

**MIC determination (broth microdilution according to ISO standard 20776-1 except for mecillinam and fosfomycin where agar dilution is used)**

**Medium:** Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (for cefiderocol, see

<https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments/>)

**Inoculum:** 5x10<sup>5</sup> CFU/mL

**Incubation:** Sealed panels, air, 35±1°C, 18±2h

**Reading:** Unless otherwise stated, read MICs at the lowest concentration of the agent that completely inhibits visible growth. See "EUCAST Reading Guide for broth microdilution" for further information.

**Quality control:** *Escherichia coli* ATCC 25922. For agents not covered by this strain and for control of the inhibitor component of beta-lactam inhibitor combinations, see EUCAST QC Tables.

**Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)**

**Medium:** Mueller-Hinton agar

**Inoculum:** McFarland 0.5

**Incubation:** Air, 35±1°C, 18±2h

**Reading:** Unless otherwise stated, read zone edges as the point showing no growth viewed from the back of the plate against a dark background illuminated with reflected light. See "EUCAST Reading Guide for disk diffusion" for further information.

**Quality control:** *Escherichia coli* ATCC 25922. For agents not covered by this strain and for control of the inhibitor component of beta-lactam inhibitor-combination disks, see EUCAST QC Tables.

\* Nya taxonomiska studier har begränsat definitionen av familjen *Enterobacteriaceae*. Några tidigare medlemmar av familjen har nu inkluderats i andra familjer inom ordningen *Enterobacterales*. Brytpunkter i denna gäller alla medlemmar av *Enterobacterales*.

Cephalosporins	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Kommentarer
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
								Brytpunkterna gäller oavsett påvisade resistensmekanismer, inklusive ESBL, för 3:e och 4: generationens cefalosporiner. Isolat som blir R för antingen cefotaxim/ceftriaxon eller ceftazidim (cefalosporiner med utvidgat spektrum) bör av vårdhygieniska skäl alltid undersökas avseende överförbara cefalosporinaser. Se <b>flödesschema för ESBL-testing</b> .
<b>Cefaclor</b>	-	-			-	-		
<b>Cefadroxil (uncomplicated UTI only)</b> <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> ), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	16	16		30	12	12		Cefadroxil kan användas för screening av resistens mot cefalosporiner med utvidgat spektrum (ESBL).
<b>Cefalexin (uncomplicated UTI only)</b> <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> ), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	16	16		30	14	14		Cefalexin kan användas för screening av resistens mot cefalosporiner med utvidgat spektrum (ESBL).
<b>Cefazolin (infections originating from the urinary tract),</b> <i>E. coli</i> , and <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> )	0.001	4		30	50	20		Vildtypen kategoriseras som "I – Känslig vid ökad exponering", se <b>tabell "Dosering"</b> . Isolat som är S för cefadroxil och/eller cefalexin kan rapporteras "I- känslig vid ökad exponering" utan föregående testning.
<b>Cefepime</b>	1	4		30	27	24		
<b>Cefiderocol</b>	2	2		30	23	23	21-23	MIC-bestämning med buljongspädningsmetoden måste utföras i järnjusterad Mueller-Hintonbuljong och särskilda avläsningsinstruktioner ska användas. För detaljer se <b>EUCAST guidance document</b> .
<b>Cefixime (uncomplicated UTI only)</b> <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> ), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	1	1		5	17	17		
<b>Cefotaxime (indications other than meningitis)</b>	1	2		5	20	17		
<b>Cefotaxime (meningitis)</b>	1	1		5	20	20		

<b>Cefoxitin (screen only)</b>	NA	NA		30	19	19		Screenbrytpunkt vid ESBL <sub>M</sub> (AmpC)-frågeställning. <b>Se flödesschema för ESBL<sub>M</sub>-testning.</b>
<b>Cefpodoxime (uncomplicated UTI only)</b> <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> ), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	1	1		10	21	21		Cefpodoxim kan användas för screening av resistens mot cefalosporiner med utvidgat spektrum.
<b>Ceftaroline</b>	0.5	0.5		5	23	23	22-23	
<b>Ceftazidime</b>	1	4		10	22	19		
<b>Ceftazidime-avibactam</b>	8	8		10-4	13	13		MIC-bestämning utförs med fast koncentration av avibaktam (4 mg/L).
<b>Ceftibuten (infections originating from the urinary tract)</b> <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> ), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	1	1		30	23	23		
<b>Ceftobiprole</b>	0.25	0.25		5	23	23		
<b>Ceftolozane-tazobactam</b>	2	2		30-10	22	22	19-21	För dosering vid olika indikationer, se <b>tabell "Dosering"</b> MIC-bestämning utförs med fast koncentration av tazobaktam (4 mg/L).
<b>Ceftriaxone (indications other than meningitis)</b>	1	2		30	25	22		
<b>Ceftriaxone (meningitis)</b>	1	1		30	25	25		
<b>Cefuroxime i.v.</b> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> ), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	0.001	8		30	50	19		Vildtypen kategoriseras som "I – Känslig vid ökad exponering", se <b>tabell "Dosering"</b> . <b>SE: Brytpunkten gäller endast vid urinvägsfokus.</b>
<b>Cefuroxime p.o. (uncomplicated UTI only)</b> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> ), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	8	8		30	19	19		

Monobactams	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Kommentarer
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
<b>Aztreonam</b>	1	4		30	26	21		Brytpunkterna gäller oavsett påvisade resistensmekanismer, inklusive ESBL.

## Vedlegg 3: Prosedyre – Synergitestning CAZ-AVI + ATM fra K-res

### Metoder synergitestning ceftazidim-avibaktam + aztreonam

#### 1. Disk eluerings metode (Khan A. et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2021):

- 2 ml MH-buljong tilsettes sterile rør, til sammen 4 rør pr isolat.
  - Rør 1: MH + aztreonam (ATM) disk
  - Rør 2: MH + ceftazidime-avibactam (CZA) disk
  - Rør 3: MH + aztreonam (ATM) disk + ceftazidime-avibactam (CZA) disk
  - Rør 4: MH
- Inkuber rørene i romtemperatur i 30 min.
- Lag en 0,5 McFarland oppslemming av hver teststamme og tilsett 12 µl til de 3 rørene med MH buljong tilsatt antibiotika, samt vekstkontrollen.
- Inkuber 16-20 timer v/ 35 °C.
- Avlesning (+: synlig vekst; -: ingen vekst):
  - Avlesningstabell

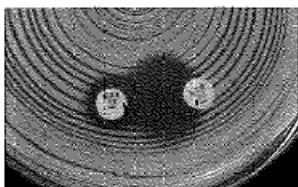
	Vekstkontroll	ATM	CZA	CZA+ATM
<b>Synergi:</b>	+	+	+	-
<b>Ingen synergi</b>	+	+	+	+

- Isolater uten vekst i ATM eller CZA tolkes som 'Ingen synergi'.



#### 2. Disk diffusjonsmetode:

- Lag en 0,5 McFarland oppslemming av hver teststamme og swab en MH-skål på samme måte som EUCAST disk-diffusjonsmetoden.
- Legg ceftazidime-avibactam (CZA) og aztreonam (ATM) disk med god avstand på den ene halvdel av MH-skåla. På den andre halvdel plasseres CZA og ATM disk med 15 mm avstand mellom sonekanten på diskene.
- Inkuber 16-20 timer v/ 35 °C.
- Avlesning: oppklaring/'invers D sone' fenomen mellom diskene indikerer synergi.



## Vedlegg 4: Validerings- og verifiseringsmetodikk fra Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi i Molde og Ålesund

### Generelt

Igangsetting og gjennomføring utføres i henhold til:

{{EQSDocument 21246}}

### Minuminskrav

Årsak til metodevalidering	Valg av parametere
<b>Nye analyser/metoder- CE/IVDR</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ny analyse</li><li>• Ny metode</li><li>• Ny leverandør</li><li>• Nytt instrument</li><li>• <b>Modifisering av eksisterende metode</b></li></ul>	<b>Verifisering</b> <b>Riktighet</b> <b>Presisjon</b> Sporbarhet skal etableres Evt. andre parametere der dokumentert verifisering fra leverandøren mangler.
<b>Lukkede systemer med svært kostbare reagenser; f.eks genexpert, filmarray ol.. – nye instrumnet/analyser</b>	<b>Enkel verifisering</b> <b>Avhengig av test: Analyser minimum 5 prøver, utvalg av prøver vurderes i hvert tilfelle.</b> <b>Ved ny generasjon av test må det vurderes om det er nødvendig med ny verifisering. Dersom måsekvens er endret må det alltid utføres ny verifisering.</b>
<b>Egenutviklet metode</b>	<b>Validering</b> <b>Riktighet</b> <b>Presisjon</b> <b>Spesifisitet/interferenser</b> <b>Deteksjonsgrense</b> <b>Måleområde</b> <b>Holdbarhet</b>

	<p>Sporbarhet skal etableres</p> <p>Evt. andre parametere der dokumentert verifisering fra leverandøren mangler.</p>
<b>Flytting av analyseinstrumenter</b>	<p>Vurder i hvert tilfelle (type instrument) om flytting kan påvirke analyseresultat.</p> <p>Dersom flytting innebærer en transport av instrument må <b>Riktighet og Presisjon</b> verifiseres.</p>
<b>Innkjøp av inkubator/ kjøleskap/ fryser</b>	<p><b>Enkle verifisering</b></p> <p>Sammenlign display/termometer i bruk mot Fluke - kalibreringstermometer.</p> <p>Logg variasjon i temperatur i løpet av et døgn.</p>

## Kvalitetskrav

Før utprøvingen starter skal det settes kvalitetskrav. Definer hvilke krav som skal stilles til resultatene av valideringen for at metoden skal tas i bruk.

For riktighet og spesifisitet skal testen være like god eller bedre enn allerede etablert test, eller ha sammenlignbar ytelse som andre tester på markedet. Kravene kan også settes på bakgrunn av **klinisk nytteverdi**, retningslinjer fra strategirapporter, artikler, andre publikasjoner og enighet i fagmiljøet. I de tilfeller man bytter test på grunn av ønske om bedre kvalitet, må man definere hvor mye bedre testen skal yte for at den tas i bruk

Krav til presisjon er i hovedregel CV% under 15.

## Riktighet

Metodens riktighet valideres ved:

- Sammenligninger med eksisterende metoder ved eget eller andre laboratorier eller med prøver fra ekstern kvalitetsvurdering (EQAS, Equalis, QCMD osv..). Det er gunstig å ha med både pasientprøver og materiale fra SLP.
- Man benytte pasientprøver fra ulike deler av målområdet. Om ulike deler av målområdet definerer pasientene i kliniske kategorier, så må man ta med likt antall prøver fra alle kategoriene.

## Korrelasjon

Minst 20 positive prøver, eller 20 prøver fra hver aktuelle kategori testen kan kategorisere pasientene i.	Prøvene settes opp med etablert metode og med ny metode.	<b>Statistisk verktøy:</b>  <b>Sammenligning av korrelasjon mellom POS/NEG svar gjøres enklest ved utregning av kappaverdi.</b>  <b>Bruk SPSS – crosstabs.</b>  <b>Sammenligning av tallverdier gjøres ved paired sample T-test.</b>
Minst 20 negative prøver	Prøvene settes opp med etablert metode og med ny metode.	
For analyser hvor eksisterende metode har spesifisitetsproblemer: 20 prøver hvor man mistenker falsk positivt resultat ved eksisterende metode	Prøvene settes opp med etablert metode og med ny metode.	

## Spesifisitet og Interferens

For CE/IVD godkjente produkter:

Det kan være svært omfattende å gjøre forsøk som gir et meningsfullt bilde av spesifisitet og effekt av interferenter. For de fleste tester vil man derfor måtte innhente data fra leverandør eller publiserte 3.parts dokumentasjon(artikler). Men for seologiske analyser hvor det er kjente spesifisitetsproblemer bør man ha med et utvalg på minimum 20 prøver hvor man har indikasjon for at eksisterende test har vært falsk positiv.

For egenutviklede analyser:

Spesifisitet testes med et panel av andre mikrober enn den aktuelle (Genteknologi/bakteriologi). Nært beslektede mikrober til den som påvises i testen bør være med.

## Holdbarhet

Holdbarhet er ikke direkte relatert til måleprosessen, men kan være aktuelt å teste dersom det er vanskelig å forholde seg til det leverandøren oppgir. Holdbarhet må etableres i alle tilfeller der leverandør ikke oppgir dette.

Minimum 5 prøver oppbevares i romtemperatur og i kjøleskap i 1 uke og testes etter 1,3,5 og 7 dager.

### Presisjon

Der det er mulig skal repeterbarhet og reproduserbarhet vurderes i hennhold til positivt/negativt resultat og variasjon i målte tallverdier (OD/IU/SCOFF/CT osv).

Repeterbarhet – variasjon innen samme oppsett

Vi skal ha minst mulig variasjoner; samme oppsett, samme reagenslot, samme operatør.

Utførelse:		Beregninger
Kontrollmateriale i 2 nivåer (hvis 2 nivåer er tilgjengelig)	Hvert målområde analyseres i 10 replikanter i samme oppsett	Mean, SD og varians, CV %.

Reproduserbarhet - dag til dag variasjon

Få med flest mulige variasjoner; flere analyse serier, flere operatører osv.

Utførelse:		
Kontrollmateriale i 2 nivåer (hvis mulig)	Hvert nivå/prøve analyseres en gang pr.dag i 2 paralleller i minst 4 dager.	Mean, SD og varians, CV %.
Eller et panel av negative og positive prøver med ulike konsentrasjoner	Gjøres analysen på flere instrument, analyseres materialene på begge.	

## Carry over

Dokumenterte data innhentes hos leverandøren. Carry over er spesielt viktig å undersøke for analyser der konsentrasjonsområdet er stort, eller dersom analysen har arbeidsprosesser hvor det er kjent fare for kontaminering.

Undersøkes ved å sette annenhver positiv og negativ prøve i samme oppsett. Minimum 20 sterk positive prøver og 20 negative prøver. Gjentas i 5 oppsett.

Arbeidsrutiner for å utelukke Carry Over etableres.

## Måleområde og måleusikkerhet

Målområdet skal være oppgitt av leverandør.

For genteknologiske analyser etableres deteksjonsgrense, dette er beskrevet i «Etablering av in-house analyser»

**Testens måleusikkerhet overvåkes i henhold til prosedyre EQS 37426**

## Sporbarhet



Alle nye analyser/metoder som skal etableres meldes på aktuelle eksterne kvalitetskontrollprogram (SLP).

Dokumentasjon rundt endringskontroller/Valideringer/verifiseringer oppbevares i EQS.

## **Referanser**

ISO 15189

## Vedlegg 5: Stammemateriale ESBL<sub>CARBA</sub> fra K-res

Dette vedlegget inneholder en tabell som viser informasjonen over ESBL<sub>CARBA</sub>-stammematerialet sendt fra Nasjonalt kompetansesenter for påvisning av antibiotikaresistens (K-res).

STAMME	RID	WGS-ESBL-CARBA	MLST WGS	Maldi-TOF Id	Fryse-nr	MIC Ceftazidime-avibaktam	MIC Aztreonam	MIC Meropenem	Andre beta-laktamaser	Synergi disk diffusjon ATM/CZA	Synergi disk eluering
1	51511323	NDM-1	ST323	K. pneumoniae	75 G7	>32	>32	8	SHV-1, CTX-M-15, OXA-1, TEM-1	Positiv	Positiv
2	51512919	NDM-5	ST147	K. pneumoniae	76 C6	>32	>32	>16	SHV-11, CTX-M-15, OXA-1, OXA-9	Positiv	Positiv
3	51513064	NDM-5	ST361	E. coli	76 D7	>32	>32	16	CTX-M-15, OXA-1	Positiv	Positiv
4	51515931	NDM-7	ST167	E. coli	77 G5	>32	>32	>16	CMY-145	Negativ	Negativ
5	51516667	NDM-1+OXA-48	ST147	K. pneumoniae	77 D8	>32	>32	>16	SHV-11, OXA-1, CTX-M-15, TEM-1, OXA-9	Positiv	Positiv
6	51518684	NDM-1	ST395	K. pneumoniae	79 D7	>32	>32	8	SHV-11, OXA-1, CTX-M-15, TEM-1	Positiv	Positiv
7	51519190	NDM-5	ST410	E. coli	79 I9	>32	>32	8	TEM-169, CTX-M-15, OXA-1	Positiv	Positiv
8	51519390	NDM-1	ST307	K. pneumoniae	80 A2	>32	>32	16	SHV-28, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1	Positiv	Inkonklusiv (ingen vekst CZA alene)
9	51519391	NDM-1	ST661	K. pneumoniae	80 B2	>32	16	1	SHV-27, CMY-16	Positiv	Inkonklusiv (ingen vekst ATM og CZA alene)
10	51520851	NDM-5	ST38	E. coli	80 I7	>32	32	16	CMY-42	Negativ	Inkonklusiv (ingen vekst ATM alene)
11	51523909	NDM-5+OXA-181	Novel	E. coli	81 G9	>32	>32	16	OXA-1, CTX-M-15	Positiv	Inkonklusiv (ingen vekst ATM alene)
12	51524182	NDM-5	ST405	E. coli	82 F1	>32	>32	>16	CMY-42	Negativ	Inkonklusiv (ingen vekst ATM alene)
13	51526293	KPC-2+VIM-1	ST39	K. pneumoniae	82 I8	>32	>32	>16	SHV-11, TEM-1	Positiv	Positiv
14	51526885	NDM-5	ST940	E. coli	83 E3	>32	>32	16	CMY-42, TEM-1	Negativ	Positiv
15	51527239	NDM-9	ST307	K. pneumoniae	83 G5	>32	>32	4	SHV-28, OXA-1, CTX-M-15	Positiv	Positiv
16	51528994	NDM-5	ST405	E. coli	84 E3	>32	>32	8	CMY-42, CTX-M-15, TEM-1	Negativ	Negativ
17	51529417	NDM-1	ST361	E. coli	84 C4	>16	>32	>16	CTX-M-15	Positiv	Positiv
18	51530517	NDM-5+KPC-3	ST361	E. coli	84 B7	>32	>32	8	CMY-145, SHV-11, TEM-1, CTX-M-15	Negativ	Positiv
19	51534046	NDM-4	ST15	K. pneumoniae	85 B7	>32	>32	8	SHV-28, LAP-2, CTX-M-14, OXA-variant, CTX-M-15	Positiv	Positiv
20	51520242_1	KPC-2+VIM-1	ST147	K. pneumoniae	80 B6/ 80 E6	>32	>32	8	SHV-11, LAP-2, TEM-1, OXA-variant, CMY-13	Positiv	Positiv

## Vedlegg 6: Stammemateriale negative kontroller

Dette vedlegget inneholder en tabell som viser negative kontrollstammer som ble brukt i oppgaven. Stammene ble hentet fra AMM i Ålesund, fra egen stammebank.

Stamme	Instrumentnummer	MALDI-TOF ID	Prøvemateriale	Beskrivelse
21	100030 222195	C. freundii	Urin	Neg på ESBL
22	100030 180115	E.coli	Urin	Neg på ESBL
23	100030 205971	K.pneumoniae	Urin	Neg på ESBL
24	100030 219535	E.coli	Urin	Neg på ESBL
25	100030 228554	E.coli	Urin	Neg på ESBL
26	100030 231367	E.coli	Urin	Neg på ESBL
27	100030 218499	E.coli	Urin	Neg på ESBL
28	100030 224932	E.coli	Urin	Neg på ESBL
29	100030 207884	E.coli	Urin	Neg på ESBL
30	100030 207809	E.coli	Urin	Neg på ESBL

## Vedlegg 7: Stammemateriale ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub>

Dette vedlegget inneholder en tabell som viser stammer med ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub> som ble brukt i oppgaven. Stammene ble hentet fra AMM i Ålesund fra egen stammebank.

Stamme	Instrumentnummer	MALDI-TOF ID	Prøvemateriale	Beskrivelse
31	1000 12396370	E.coli	Blodkultur	ESBL <sub>A</sub>
32	1000 18090263	E.coli	Urin	ESBL <sub>A</sub>
33	1000 23971163	E.coli	Urin	ESBL <sub>A</sub>
34	1000 23954881	E.coli	Urin	ESBL <sub>A</sub>
35	1000 23934088	E.coli	Urin	ESBL <sub>A</sub>
36	1000 24569245	E. cloacae	Sårsekret	ESBL <sub>M</sub>
37	1000 25223788	C. freundii	Blodkultur	ESBL <sub>A</sub> og M
38	ATCC 700603	K. pneumoniae	Referansestamme	ESBL <sub>A</sub>
39	Ent.Cloacae Stammebank	E. cloacae	Stammebank brukt til Vitek MS validering	ESBL <sub>A</sub>
40	2583/21	E.coli	Urin	ESBL <sub>A</sub>

## Vedlegg 8: Andre materialer

Dette vedlegget inneholder en tabell som viser resten av materialer som ble brukt ved det praktiske arbeidet, samt produsenten av disse.

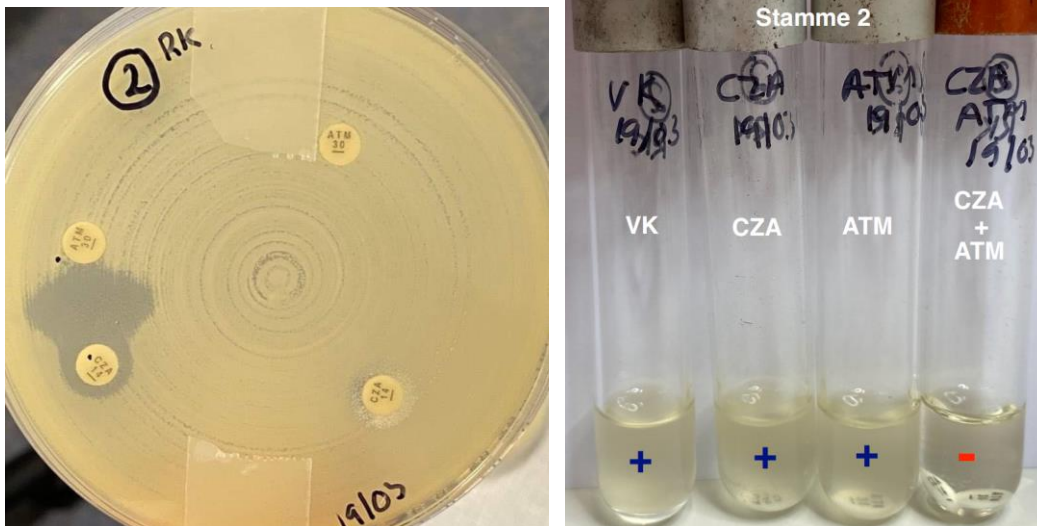
<b>Materiale</b>	<b>Produsenten</b>
Hansker (Dermagrip, Nitrile examination gloves, ultra long, M)	WRP Asia Pacific Sdn Bhd
Smittefrakk (Isolation Gown special)	OneMed Group Oy
Engangs jakker (Barrier Warm-Up jacket)	Mölnlycke Health Care AB
Munnbind (Procedural fluid-resistant Face mask with earloops)	Medline International France SAS
Lifeclean	Lifeclean international AB
Etanol	Nalgene GHS
Avtrekkskapet (CleanLAF-o-matic VFRS 1506 E)	DanLaf
Plastpipetter (Transferpipetter 3,5 ml)	Sarstedt AG & Co
Sterile pipetter (Sterile Pasteur Pipettes)	LP Italiana SPA
12 mikroliter pipetter (Autoclavable Nichipet Model 5000DG)	Nichiryo
Pipettespisser (100 µl Filtertips)	Eppendorf
Øser (Inoculation Loop, 10 µl, blue)	Sarstedt AG & Co
Vattpinner (Cotton tipped Applicator, single tip, non-sterile)	OneMed Group Oy
Plastrør (5 ml, 75x12 mm tubes)	Sarstedt AG & Co
0.9 % NaCl	Medisinsk mikrobiologi Ålesund
Luftskåler	Heger
Rotator (Sensor turn pro)	Liofilmchem
Mc-farland måler (Densi Chek plus)	BioMerieux
Sterile glassrør	•
Sterile metalltopper (CAP-O-TEST)	Lüdi Swiss
Sterile Dispenser (Varispenser)	Eppendorf
Nåler (Microlance™ 3)	BD
Enkel Antibiotika dispenser holder	BD

## Vedlegg 9: Bilde av resultater

Dette vedlegget inneholder noen representative bilder av resultater ved dette forsøket.

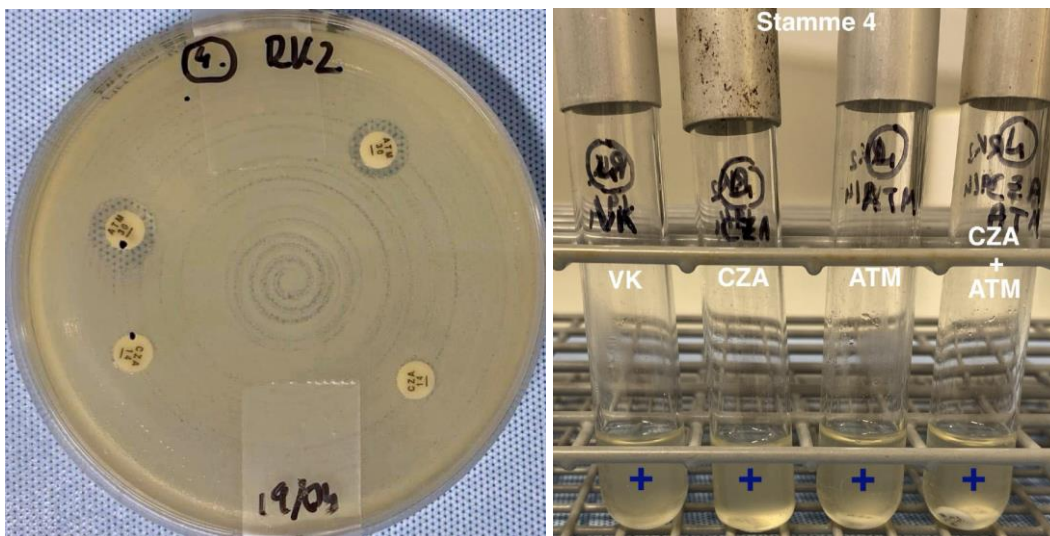
### Stamme 2

Stamme 2 er en ESBL<sub>CARBA</sub> stamme som ble vurdert som positiv for synergi ved både disk diffusjonsmetoden og disk elueringsmetoden.



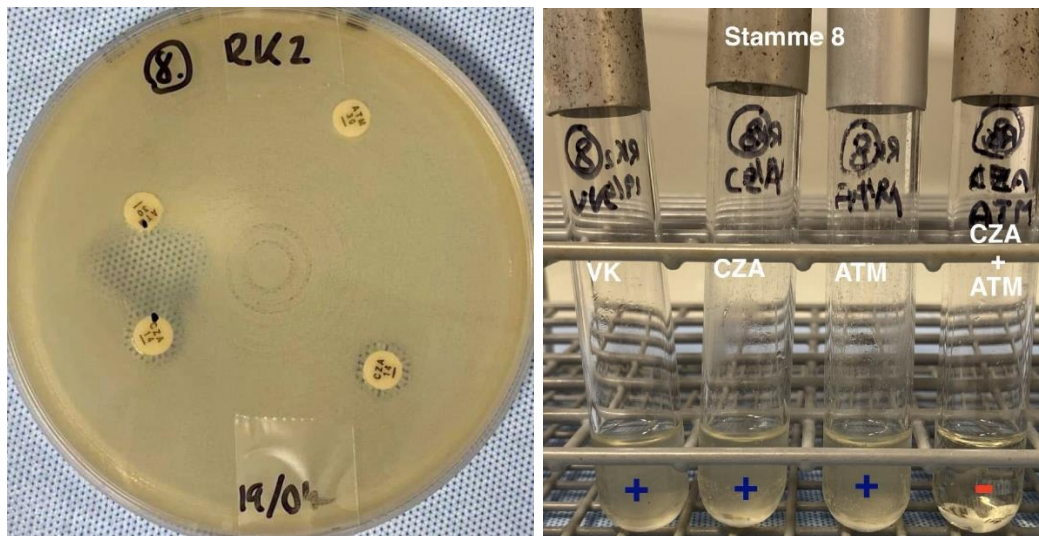
### Stamme 4

Stamme 4 er en ESBL<sub>CARBA</sub> stamme som ble vurdert som positiv for synergi ved disk diffusjonsmetoden, og negativ for synergi ved disk elueringsmetoden.



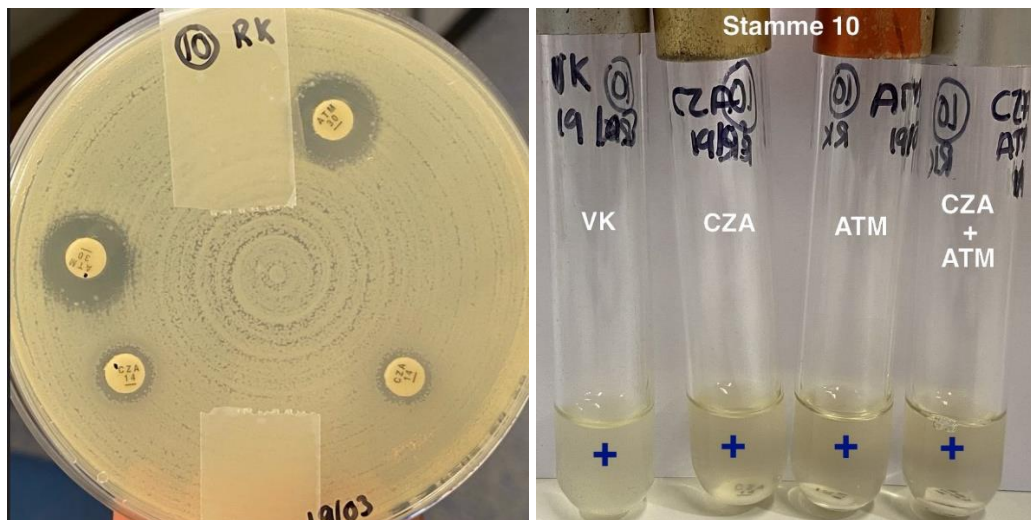
### Stamme 8

Stamme 8 er en ESBL<sub>CARBA</sub> stamme som ble vurdert som positiv for synergi ved både disk diffusjonsmetoden og disk elueringsmetoden.



### Stamme 10

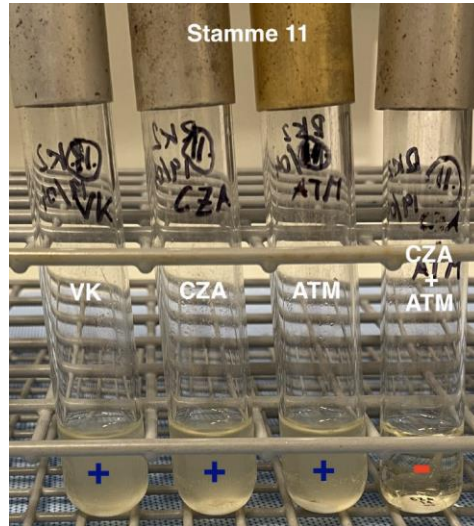
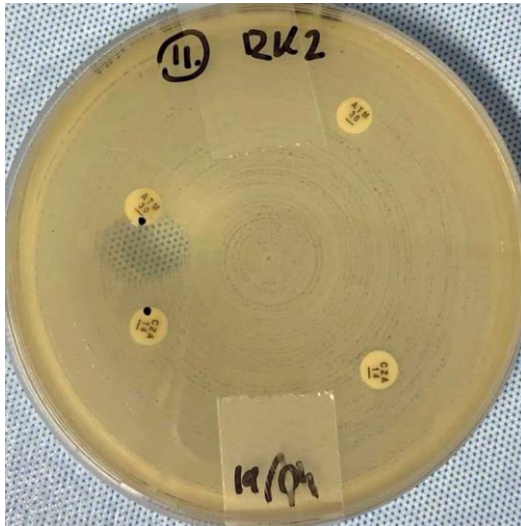
Stamme 10 er en ESBL<sub>CARBA</sub> stamme som ble vurdert som negativ for synergi ved både disk diffusjonsmetoden og disk elueringsmetoden.





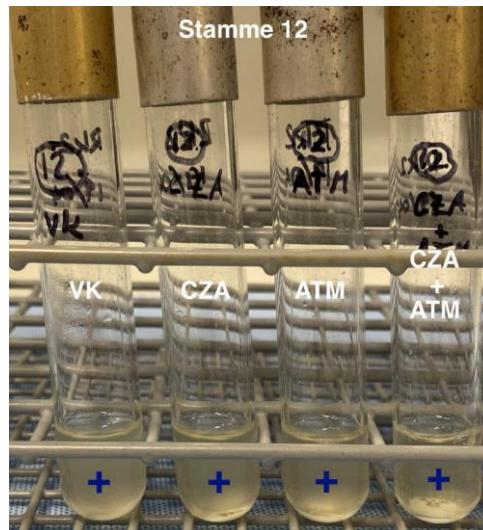
### Stamme 11

Stamme 11 er en ESBL<sub>CARBA</sub> stamme som ble vurdert som positiv for synergi ved både disk diffusjonsmetoden og disk elueringsmetoden.



### Stamme 12

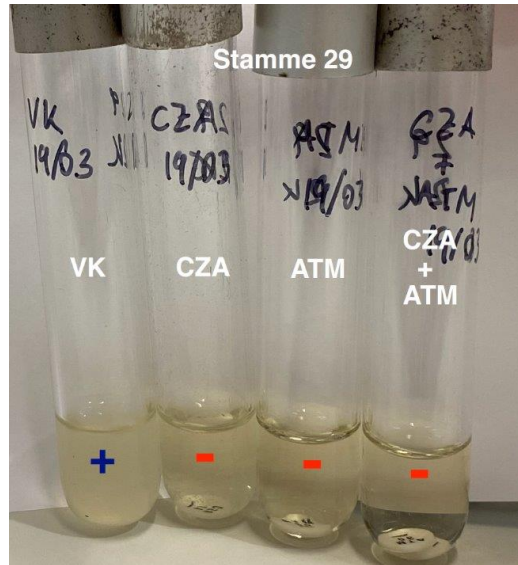
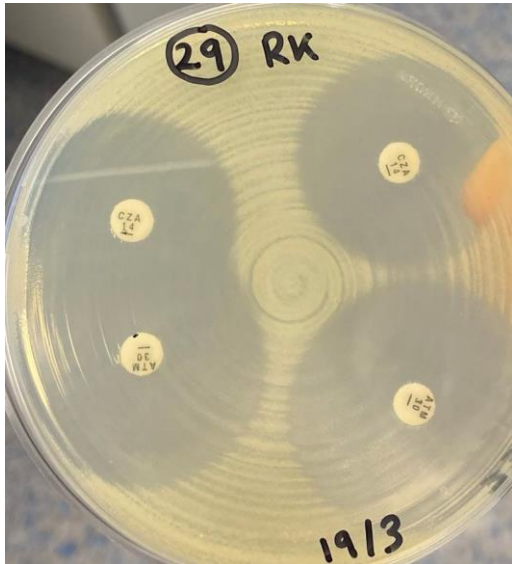
Stamme 12 er en ESBL<sub>CARBA</sub> stamme som ble vurdert som negativ for synergi ved både disk diffusjonsmetoden og disk elueringsmetoden.





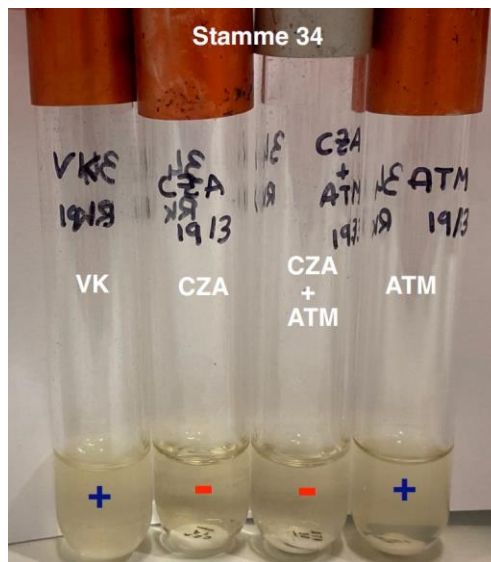
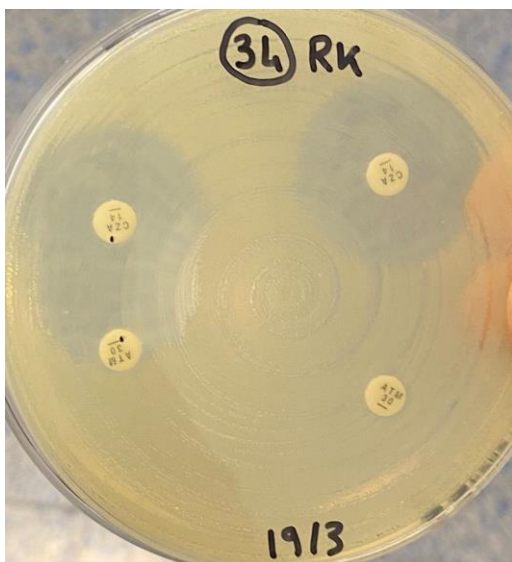
### Stamme 29

Stamme 29 er en negativ kontroll stamme som ble vurdert som inkonklusiv for synergi ved både disk diffusjonsmetoden og disk elueringsmetoden.. Stammen er sensitiv for både CZA og ATM.



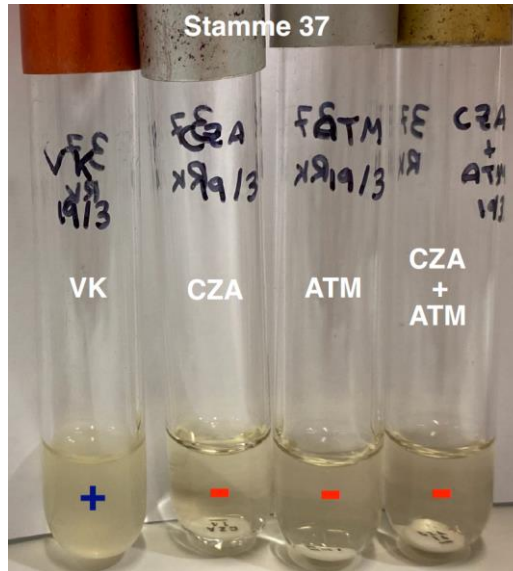
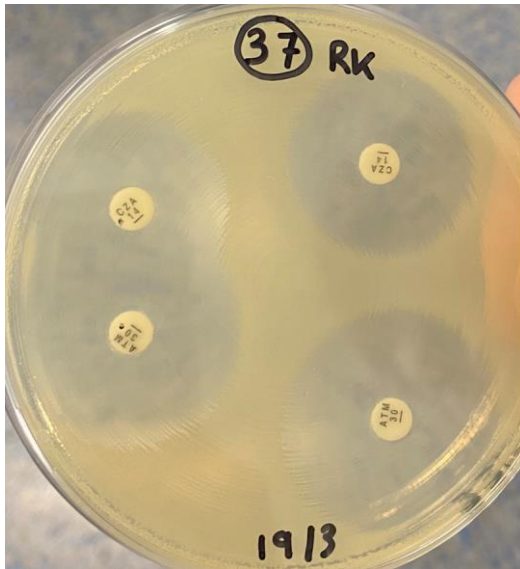
### Stamme 34

Stamme 34 er en ESBL<sub>A</sub> stamme som ble vurdert som inkonklusiv for synergi ved både disk diffusjonsmetoden og disk elueringsmetoden.. Stammen er sensitiv for CZA.



### Stamme 37

Stamme 37 er en ESBL<sub>A</sub> og ESBL<sub>M</sub> stamme som ble vurdert som inkonklusiv for synergi ved både disk diffusjonsmetoden og disk elueringsmetoden.. Stammen er sensitiv for både CZA og ATM.







## Vedlegg 11: Risikoanalyse

Enhet/Institutt:	NTNU Institutt for biologiske fag Ålesund, Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved Ålesund Sykehus	Dato opprettet:	10/2/2024
Ansvarlig linjeleder (navn):	Bente Alm	Sist revidert:	15/3/2024
Ansvarlig for aktiviteten som risikovurderes (navn):	Siv Juul Abelseth, Marianne Unhjem Wiik, Einar Nilsen		
Deltakere (navn):	Sara Filippini, Alex Ravn Winther, Kokob Araya , Maryama Yusuf		

Beskrivelse av den aktuelle aktiviteten, området mv.:

Risikoanalysen omfatter studentarbeidsoppgave synergitestning av CAZ-AVI og ATM ved bruk av de to metodene: disk elueringsmetode og disk diffusjonsmetode. Utprøving utføres på 20 isolater av resistent stammer av type ESBL-CARBA.

Aktivitet/ arbeidsoppgave	Mulig uønsket hendelse	Eksisterende risikoreduserende tiltak	Vurdering av sannsynlighet (S)	Vurdering av konsekvens (K)				Risiko verdi (SxK)	Forslag til forebyggende og/eller korrigerende tiltak	Restrisiko etter tiltak (SxK)
			(1-5)	Menne ske (1- 5)	Øk/mate riell (1-5)	Ytre miljø (1-5)	Omdøm me (1-5)			
Direkte arbeid med antibiotika resistente bakterier	Smitte av antibiotika resistente bakterier innen og utenfor laboratorie/ omgivelser	Arbeid inn i avtrekksskap Beskyttelses utstyr (frakk, hansker) Følge smittevern regler Håndhygiene Følge av sykehusets protokoller for arbeid med antibiotika resistente bakterier Riktig behandling av biologisk avfall	3	3	2	4	4	9,5	Gjennomføre HMS-opplæring med studentene Veiledning ved praktiskarbeid Veiledning ved praktiskarbeid Teipe agarskålene før resistens avlesning på benk Belysning av avtrekksskap med UV-lys i etterkant av arbeid	3,25

