EUCAST EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Teoretisk workshop i resistensbestämning med lappdiffusion

Erika Matuschek
Jenny Åhman
EUCAST Development Laboratory (EDL)

Infektionsveckan och Mikrobiologiskt vårmöte, Karlstad, 2018

EUCASTs utvecklingslaboratorium

- Ansvariga för EUCASTs lappdiffusionsmetod
- Ta fram brytpunkter för nya antibiotika
- Ta fram metoder och brytpunkter för ”nya organismer”
- Kvalitetskontroll
- Support och felsökning

Agenda

- EUCASTs lappdiffusionsmetod
- Avläsning och tolkning av resultat
- Kvalitetskontroll och felsökning

EUCASTs lappdiffusionsmetod

Resistensbestämning

- Kliniskt (för patienten)
  - För att förutse utgången av antibiotikabehandling
- För kontroll och övervakning
  - Övervakning av resistensutveckling
  - Upptäcka förekomst av bakterier med resistensmekanismer

Resistensbestämning

- Är ett relativt mått
- Ändras med ändrade omständigheter
  - Mängd bakterier
  - Medium
  - pH
  - Tid som bakterierna får växa
- Måste standardiseras
  - Omständigheterna måste vara så konstanta som möjligt

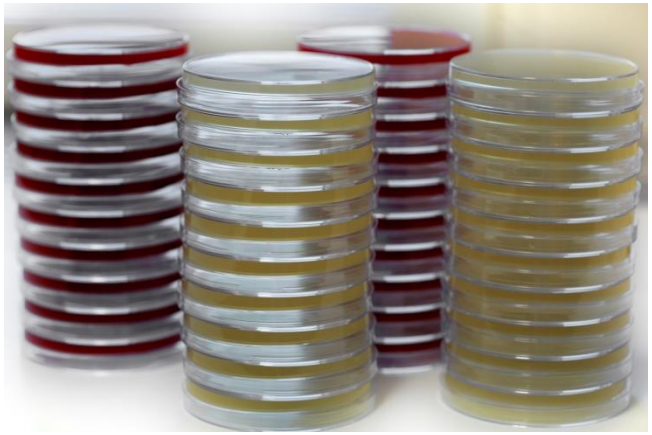
EUCASTs lappdiffusionsmetod

- Tillgänglig sedan december 2009
- Uppdateras årligen
  - Nya/förbättrade rekommendationer
  - Nya antibiotika
  - Nya organismer
  - Reviderade brytpunkter
- Brytpunktstabell i svensk översättning finns på www.nordicast.org

Två media

Mueller Hinton-agar (MH)

- Enterobacteriaceae (Enterobacterales)
- *Pseudomonas* spp.
- Acinetobacter spp.
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Staphylococcus* spp.
- *Enterococcus* spp.
- *Aeromonas* spp.



Mueller Hinton-agar med 5% hästblod och 20 mg/l β-NAD (MH-F)

- *Haemophilus influenzae*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus* spp.
- *Moraxella catarrhalis*
- *Pasteurella multocida*
- *Listeria monocytogenes*
- *Campylobacter jejuni & coli*
- *Corynebacterium* spp.
- *Aerococcus urinae & sanguinicola*
- *Kingella kingae*

Enterobacterales

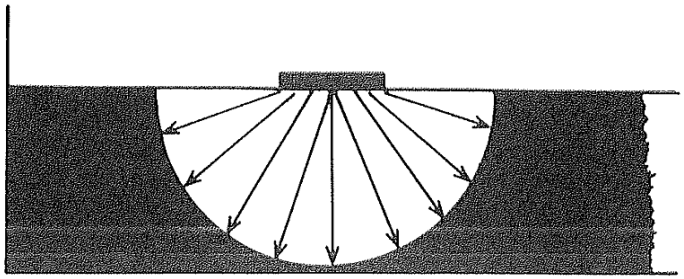
- Enterobacterales innehåller flera familjer, varav Enterobacteriaceae är en.

Familj	Genus	
Enterobacteriaceae	Escherichia Citrobacter Enterobacter Klebsiella	Kluyvera Raoultella Salmonella Shigella
Morganellaceae	Morganella Proteus	Providencia
Erwiniaceae	Erwinia	Pantoea
Hafniaceae	Hafnia	
Yersiniaceae	Yersinia	Serratia
Övriga (oklassificerade)	Plesiomonas	

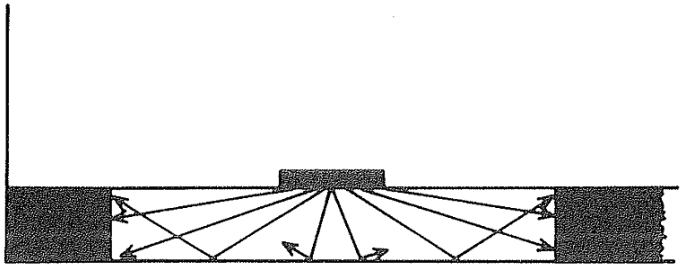
- Brytpunkterna gäller för samma bakterier som tidigare, dvs samtliga Enterobacterales

Agardjup

- 4.0 ± 0.5 mm
- Jämnt agardjup!
- Diffusionen av antibiotika från lappen påverkas av agardjupet.



Korrekt agardjup



För tunn agar = för stora zoner!

Metoden är kalibrerad till ett agardjup på 4 mm!

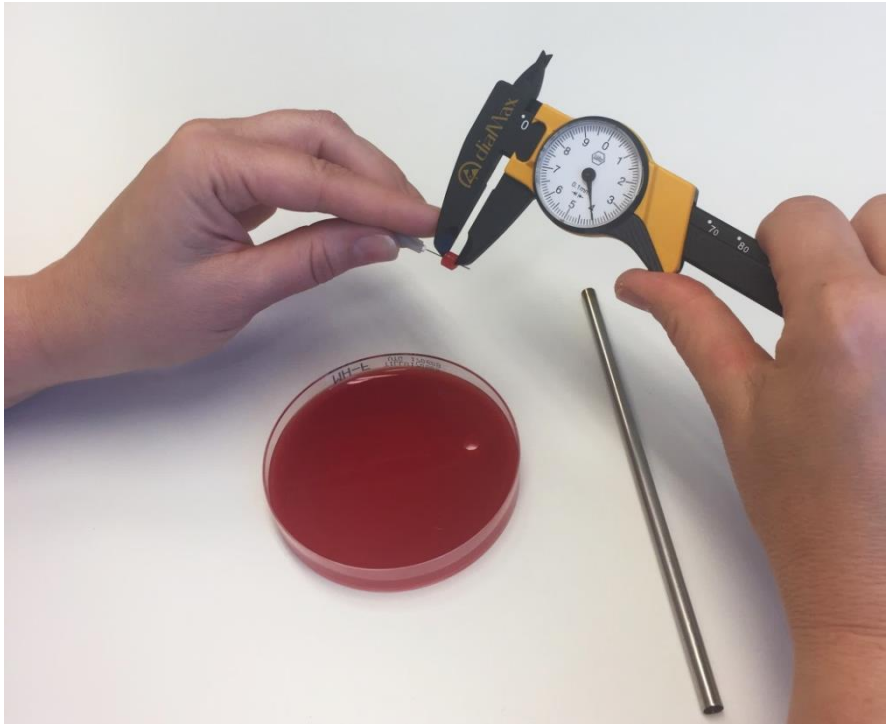
Agardjup

- Mät agardjup för varje ny batch
  - Egentillverkade och kommersiella plattor

Vid egen substrattillverkning:

- Petriskålarnas dimensioner kan skilja mellan tillverkare.
- Beräkna volymen per platta baserat på Petriskålarnas faktiska dimensioner.
- Justera volymen om agardjupet är inom godkänt intervall men alltid över eller under 4 mm.

Mätning av agardjup



Mät aldrig agardjupet på utsidan av Petriskålen!

Förvaring av agarplattor

- Förvara i kyl och använd innan utgångsdatum
- Före inokulering:
  - Rumstemperatur
  - Inga vattendroppar på agarytan eller kondens i locket!

- Fuktiga plattor kan ge otydliga zonkanter och/eller dimma i zonen

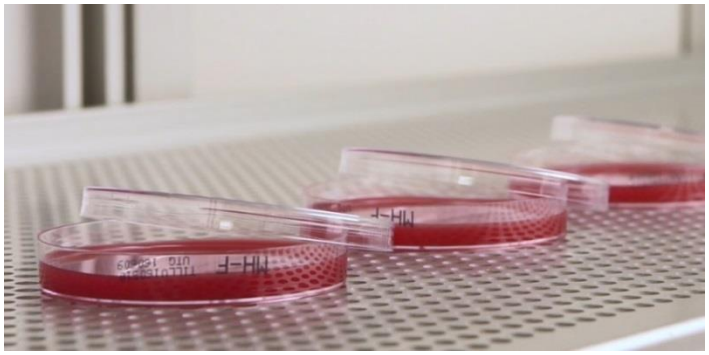
Torkning och förvaring av MH-F

Om droppar kan ses på insidan av locket är plattan för fuktig!

Torkning och förvaring av agarplattor

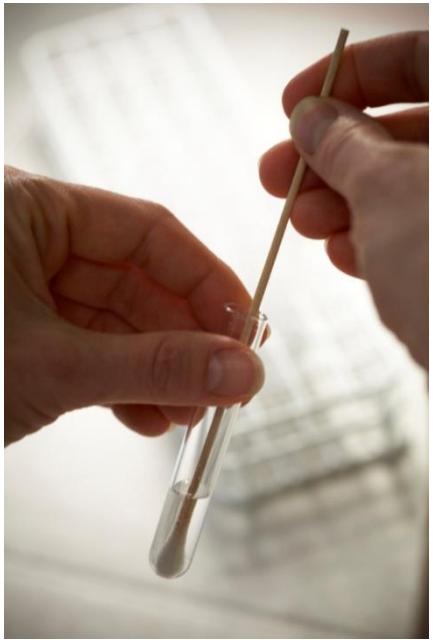
- **Egen substrattillverkning:**
  - Torka nytillverkade plattor i rumstemperatur över natt innan de förvaras i kyl.
- **Plattor i plastpåsar eller förslutna behållare:**
  - Packa upp de plattor som ska användas de närmsta dagarna och förvara i ventilerade behållare i kylen.

- Vid behov, torka plattorna
  - Rumstemperatur över natt, eller
  - 35°C i 15 min utan lock.



Inokulat

- Plocka kolonier från ett icke-selektivt medium och slamma i 0,85% NaCl.

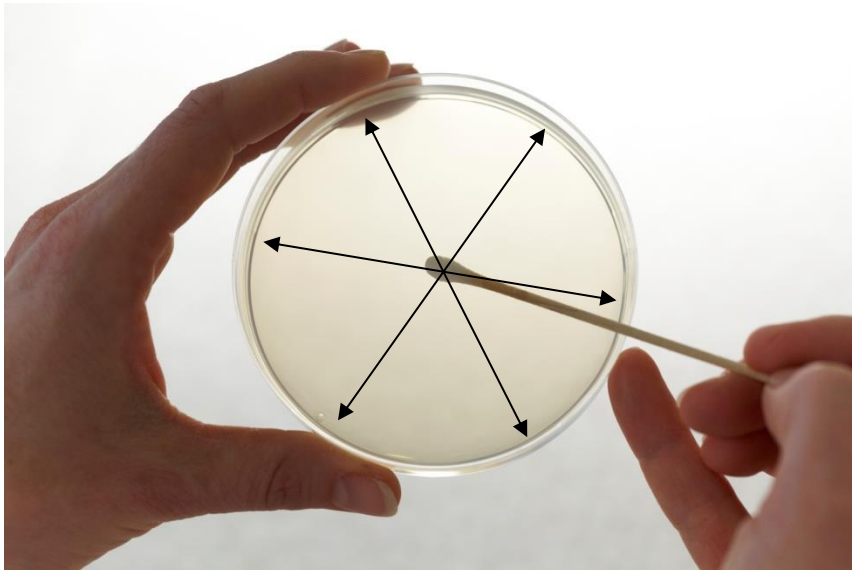


- Konfluerande inokulat
  - McFarland 0.5 (0.4-0.6)
- Undantag: Pneumokocker
  - McFarland 0.5 från blodplatta
  - McFarland 1.0 från chokladplatta
- Mät gärna McFarland med en densitometer.

Plocka isolerade kolonier från en övernatts-kultur på icke selektivt medium

Plocka om möjligt flera morfologiskt lika kolonier för att undvika att välja en atypisk variant.

Inokulering av plattor



Sprid ut inokulatet helst inom 15 minuter från slamning och alltid inom 60 minuter.

Inokulering av plattor

- Stryk plattorna så att växten blir jämn och konfluerande utan att den blir för tjock.

  - Gramnegativa organismer
    Tryck bort överflödig vätska genom att pressa bomullspinnen mot insidan av röret innan inokulatet sprids ut.

  - Grampositiva organismer
    Tryck inte bort vätska från bomullspinnen och sprid ut inokulatet långsamt.

- Kontrollera att zonerna för referensstammarna hamnar inom QC-gränserna.

Applicering av antibiotikalappar

- Applicera lappar inom 15 minuter från att plattan inokulerats.
- Lapparna ska ligga plant på ytan av mediet.
- Fördela lapparna så att zonerna inte överlappar varandra.

Förvaring av antibiotikalappar

- Förvara lager av lappar enligt tillverkarens rekommendationer.
- Förvara lappar i bruk mörkt vid 4-8°C i förslutna behållare med torkmedel.
- Låt behållarna nå rumstemperatur innan de öppnas.
- Använd inte antibiotikalappar som har passerat utgångsdatum.

Inkubering

Tid: **16-20 h**
Temperatur: **35±1ºC**
Miljö: **MH i luft**
MH-F i 5% CO_2

- Undantag:
  - Enterokocker och glykopeptider:
    - Inkubering 24 h
  - Corynebakterier, Aerokocker, *Kingella kingae*:
    - Inkubering kan förlängas till totalt 40-44 h (vid otillräcklig växt efter 16-20 h)
  - *Campylobacter jejuni/coli*:
    - 41°C mikroaerofil miljö
    - Inkubering 24 h, kan ev. förlängdas till totalt 40-48 h.

15-15-15 minutersregeln

Observera:

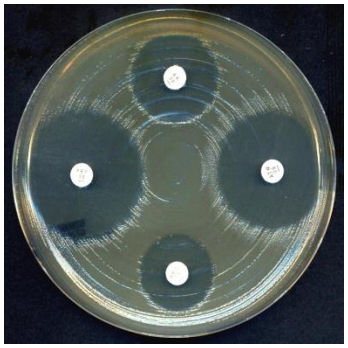
- Använd helst inokulatet inom **15 minuter** från slamning och alltid inom 60 minuter.
- Applicera antibiotikalappar inom **15 minuter** från att plattorna inokulerats.
- Påbörja inkubering inom **15 minuter** från att antibiotikalapparna applicerats.

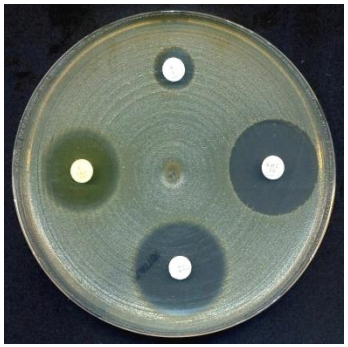
Undersökning av plattor efter inkubering

- Växten ska vara konfluerande.
- Det är viktigt att växten är jämn för att få fina zonkanter.
- Om enskilda kolonier syns är inokulatet för tunt och resistensbestämningen måste göras om.

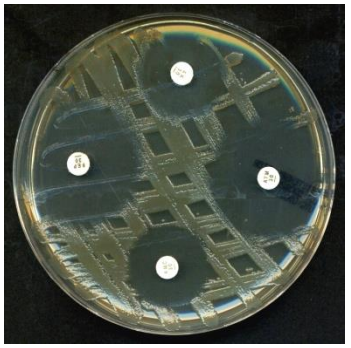
Inokulat

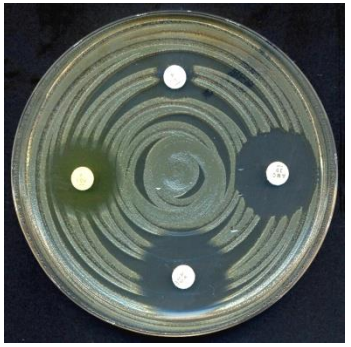
Växten ska vara jämn för att få fina zonkanter





…så här!





…men inte så här!

Avläsning och tolkning av resultat

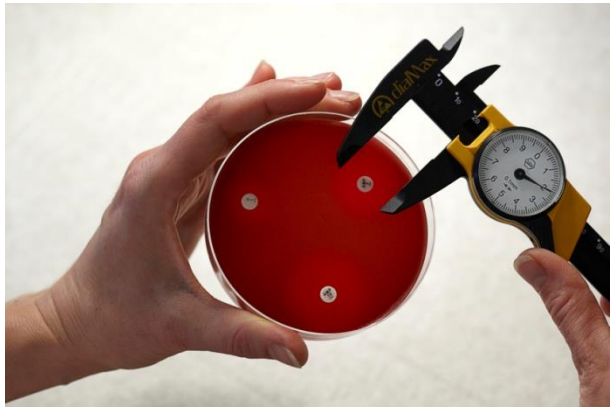
Generella avläsningsinstruktioner

- Håll plattan på ca 30 cm avstånd och i ca 45 graders vinkel från underlaget.
- Ta hänsyn till all växt som syns med blotta ögat och läs zonerna där växten slutar.
  - Använd inte förstoringsglas och håll inte plattan upp mot ljuset om det inte särskilt rekommenderas.
  - Läs bactericida och bakteriostatiska antibiotika på samma sätt.
- Mät zondiametern med skjutmått eller linjal och avrunda till närmaste millimeter.

Avläsning

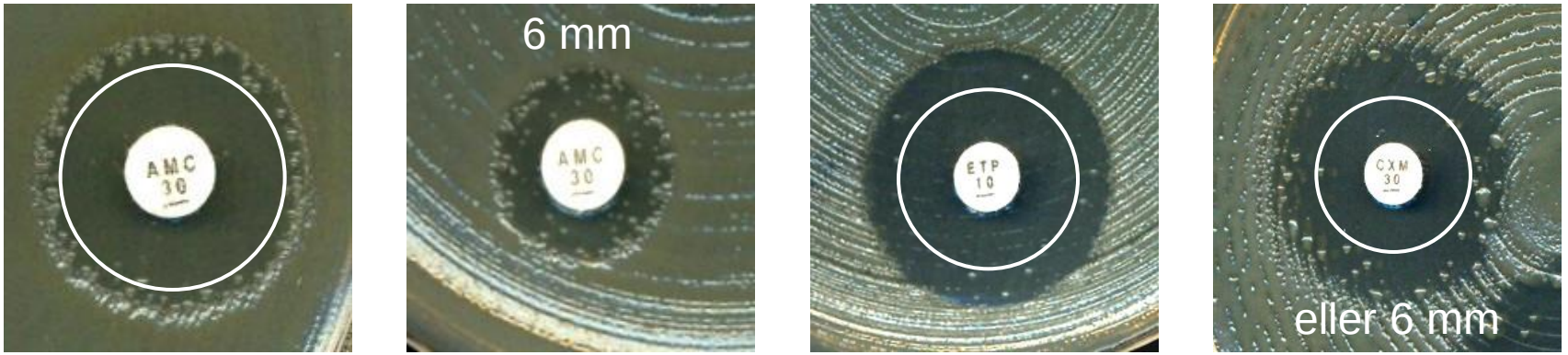
- MH
  - Mät zoner från baksidan mot en mörk bakgrund med belysning mot plattan

- MH-F
  - Mät zoner från ovansidan utan lock med belysning mot plattan



Inväxt i zon

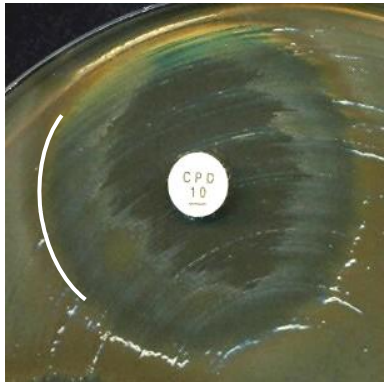
- Om det inte är en kontamination, ta hänsyn till enskilda kolonier i zon vid avläsning.

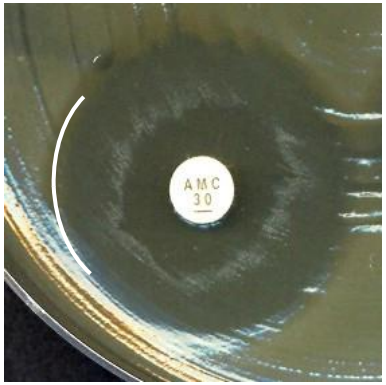


Avläsning vid inväxt i zon

Svärmning

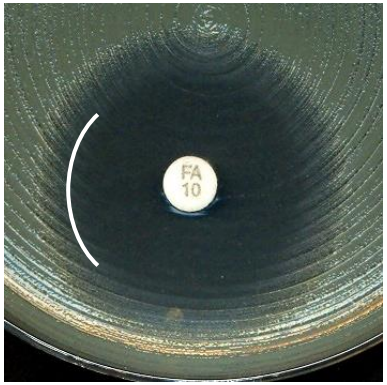
- Läs där växten slutar och bortse från svärmning som kan uppstå för *Proteus*-arter.





Otydliga zonkanter

- Håll plattan mot en mörk bakgrund på ca 30 cm avstånd och skapa en bild av var zongränsen går. Ta hänsyn till det som ser ut som växt vid första anblicken, utan att hålla upp plattan mot ljuset eller använda förstoringsglas.



Avläsning av otydliga zonkanter för stafylokocker

Växt eller hemolys?

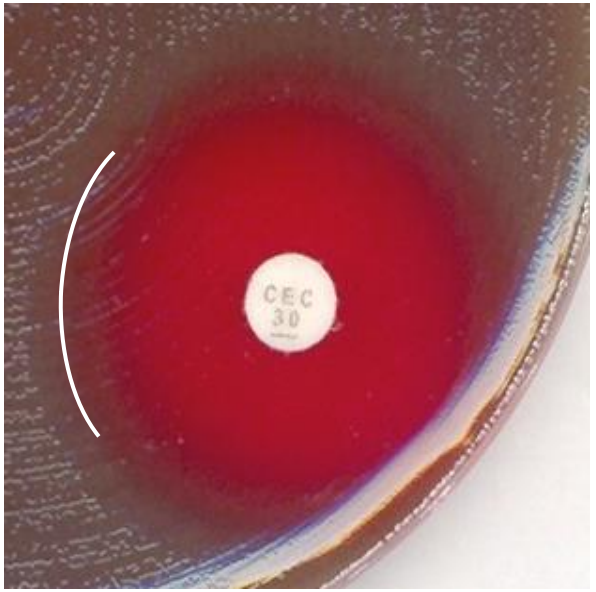
- Läs zonen där växten slutar och inte där hemolysen slutar.

- Ibland kan det vara svårt att skilja hemolys från växt.
  - β-Hemolysiner diffunderar ut i agarn. β-hemolys är därför ofta fri från växt.
  - α-Hemolysiner diffunderar inte ut i agarn. Det är ofta växt i områden med α-hemolys.

β-hemolys och α-hemolys

- Vicka på plattan för att se skillnad på växt och hemolys.

β-hemolys är ofta fri från växt.



Det är ofta växt i hela området med α-hemolys.

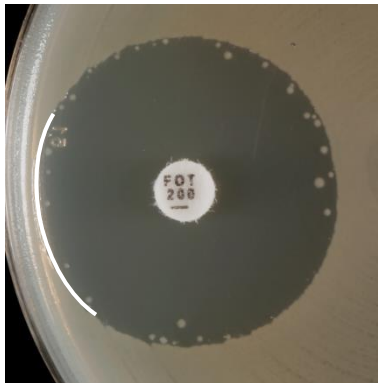
Särskilda avläsningsinstruktioner

- *E. coli* och fosfomycin
- *Stenotrophomonas maltophilia* och trimetoprim-sulfametoxazol
- *Aeromonas* spp. och trimetoprim-sulfametoxazol
- Enterokocker och vankomycin
- *S. aureus* och bensylpenicillin

Bilder för dessa fem exempel finns i brytpunktstabellen.

E. coli och fosfomycin

- Bortse från isolerade kolonier i zonen och läs den yttre zonkanten.



Trimetoprim och trimetoprim-sulfametoxazol

- Följ instruktionerna för avläsning och mät den inre zonen då dubbla zoner förekommer.
- Bortse från en tunn hinna av växt in till lappen i en i övrigt tydlig zon.

E. coli

KNS

Moraxella

Haemophilus

Stenotrophomonas maltophilia och trimetoprim-sulfametoxazol

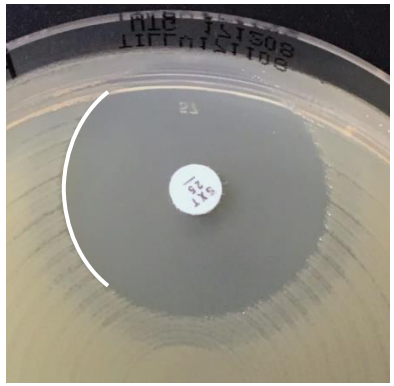
- Bortse från inväxt i zonen, som kan ses för *Stenotrophomonas maltophilia* och trimetoprim-sulfametoxazol. Inväxten kan variera i utseende från tunn dimma till tydlig växt.

Om en yttre zon kan urskiljas, mät den yttre zonen.
= Känslig om zonen är ≥16 mm

Tjock växt in till lappen
= Resistent

Aeromonas spp. och trimetoprim-sulfametoxazol

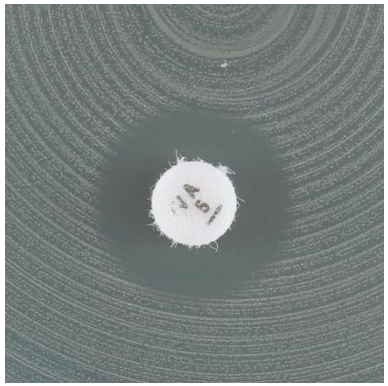
- Läs den tydliga zonkanten och bortse från dimma eller växt i zonen.
- Vid tydlig inre zonkant, läs den inre zonen.



Enterokocker och vankomycin

- Håll upp plattan mot ljuset och undersök zonen.
  - Otydlig zonkant och kolonier i zonen indikerar vankomycinresistens. Om zonen är ≥12 mm och zonkanten är otydlig, rapportera R eller utför konfirmatoriska tester.

E. faecalis
Ej VRE



E. faecium
VRE

Tolkning och SIR-kategorisering

- Uppmätta zondiametrar (avrundade till närmsta millimeter) tolkas till S, I och R enligt publicerade brytpunktstabeller

- **S**usceptible (Känslig)
  - Hög sannolikhet för lyckad behandling

- **I**ntermediate (Intermediär)
  - Högre effekt kan nås om man kan öka doseringen eller om antibiotikumet koncentreras (t ex i urin)
  - Har tidigare använts även som buffertzon vid osäkra resultat
    - Definition under revision!

- **R**esistant (Resistent)
  - Hög sannolikhet att behandlingen misslyckas

Brytpunktstabeller

Enterobacteriaceae (new taxonomy: Enterobacterales*)

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 8.1, valid from 2018-05-15

MIC determination (broth microdilution according to ISO standard 20776-1 except for mecillinam and fosfomycin where agar dilution is used)
Medium: Mueller-Hinton broth
Inoculum: $5x10^5$ 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.
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.
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.

*** Recent taxonomic studies have narrowed the definition of the family Enterobacteriaceae. Some previous members of this family are now included in other families within the Order Enterobacterales. Breakpoints in this table apply to all members of the Enterobacterales.**

Penicillins[1]	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Benzylpenicillin	-	-		-	-
Ampicillin	8[1]	8	10	14[A,B]	14[B]
Ampicillin-sulbactam	8[1,2]	8[2]	10-10	14[A,B]	14[B]
Amoxicillin	8[1]	8	-	Note[C]	Note[C]
Amoxicillin-clavulanic acid	8[1,3]	8[3]	20-10	19[A,B]	19[B]
Amoxicillin-clavulanic acid (uncomplicated UTI only)	32[1,3]	32[3]	20-10	16[A,B]	16[B]
Piperacillin	8	16	30	20	17
Piperacillin-tazobactam	8[4]	16[4]	30-6	20	17
Ticarcillin	8	16	75	23	20
Ticarcillin-clavulanic acid	8[3]	16[3]	75-10	23	20
Temocillin	Note[5]	Note[5]		Note[5]	Note[5]
Phenoxymethylpenicillin	-	-		-	-
Oxacillin	-	-		-	-
Cloxacillin	-	-		-	-
Dicloxacillin	-	-		-	-
Flucloxacillin	-	-		-	-
Mecillinam (uncomplicated UTI only) *E. coli, Klebsiella* spp. and *P. mirabilis*	8[6]	8[6]	10	15[D]	15[D]

Notes
Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints.
Lettered notes relate to the disk diffusion method.

1/A. Wild type Enterobacteriaceae are categorised as susceptible to aminopenicillins.
Some countries prefer to categorise wild type isolates of *E. coli* and *P. mirabilis* as intermediate. When this is the case, use the MIC breakpoint S ≤ 0.5 mg/L and the corresponding zone diameter breakpoint S ≥ 50 mm.
2. For susceptibility testing purposes, the concentration of sulbactam is fixed at 4 mg/L.
3. For susceptibility testing purposes, the concentration of clavulanic acid is fixed at 2 mg/L.
4. For susceptibility testing purposes, the concentration of tazobactam is fixed at 4 mg/L.
5. Breakpoints still under consideration.
6. Agar dilution is the reference method for mecillinam MIC determination.

B. Ignore growth that may appear as a thin inner zone on some batches of Mueller-Hinton agars.
C. Susceptibility inferred from ampicillin.
D. Ignore isolated colonies within the inhibition zone for *E. coli*.

www.eucast.org
www.nordicast.org

Brytpunktstabeller

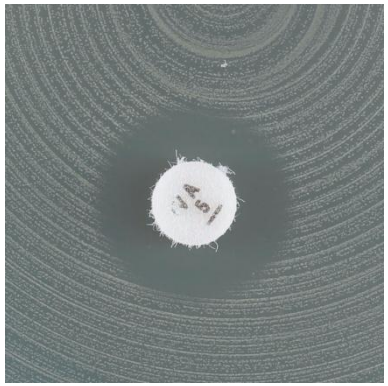
Penicillins[1]	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Benzylpenicillin	-	-		-	-
Ampicillin	8[1]	8	10	14[A,B]	14[B]
Ampicillin-sulbactam	8[1,2]	8[2]	10-10	14[A,B]	14[B]
Amoxicillin	8[1]	8	-	Note[C]	Note[C]
Amoxicillin-clavulanic acid	8[1,3]	8[3]	20-10	19[A,B]	19[B]
Amoxicillin-clavulanic acid (uncomplicated UTI only)	32[1,3]	32[3]	20-10	16[A,B]	16[B]
Piperacillin	8	16	30	20	17
Piperacillin-tazobactam	8[4]	16[4]	30-6	20	17
Ticarcillin	8	16	75	23	23
Ticarcillin-clavulanic acid	8[3]	16[3]	75-10	23	23
Mecillinam (uncomplicated UTI only) *E. coli, Klebsiella* spp. and *P. mirabilis*	8	8	10	15[D]	15[D]

= den intermediära kategorin måste räknas ut!

Enterokocker och vankomycin

- Håll upp plattan mot ljuset och undersök zonen.
  - Otydlig zonkant och kolonier i zonen indikerar vankomycinresistens. Om zonen är ≥12 mm och zonkanten är otydlig, rapportera R eller utför konfirmatoriska tester.

E. faecalis
Ej VRE



E. faecium
VRE

Viktiga screeningalgoritmer

- Enterobacteriaceae (Enterobacterales)
  - ESBL: Cefotaxim och/eller ceftazidim R → ESBL?
  - Meropenem 10 µg <28 mm → Karbapenemas-produktion?

- Stafylokocker
  - Cefoxitin S → ej MRSA (*mecA/mecC* negativ)
  - Cefoxitin R → MRSA (*mecA/mecC* positiv)

Viktiga screeningalgoritmer

- β-laktamresistens hos *H. influenzae*
  - Benzylpenicillin 1 unit
    - S → Alla β-laktamer med brytpunkter svaras S
    - R → Aktuellt antibiotikum testas (MIC eller lappdiffusion)
      - β-laktamas
      - Kromosomal resistens (förändringar i PBP3)

- β-laktamresistens hos *S. pneumoniae*
  - Oxacillin 1 µg
    - Detekterar all β-laktamresistens hos *S. pneumoniae*
      - Screenpositiva isolat är resistenta mot ett eller flera β-laktamantibiotika
      - Screenpositiva isolat är alltid resistenta mot PCV (fenoximetylpenicillin)

Kvalitetskontroll

Rutinmässig kvalitetskontroll

- Kontroll av material och utrustning
  - Agarplattor
  - Antibiotikalappar
  - Inkubatorer
  - mm
- Kontroll av utförandet
  - Inokulat
  - Strykning av plattor
  - Avläsning
  - mm

Rutinmässig intern kvalitets-kontroll bör utföras dagligen, eller åtminstone fyra dagar per vecka.

Rekommenderade referensstammar Rutinmässig kvalitetskontroll

Organism	Nummer	Karaktäristik
E. coli	ATCC 25922	Känslig, vildtyp
P. aeruginosa	ATCC 27853	Känslig, vildtyp
S. aureus	ATCC 29213	β-laktamas
E. faecalis	ATCC 29212	Känslig, vildtyp
S. pneumoniae	ATCC 49619	Nedsatt känslighet för bensylpenicillin
H. influenzae	ATCC 49766	Känslig, vildtyp
Campylobacter jejuni	ATCC 33560	Känslig, vildtyp
För kontroll av inhibitorkomponenten i kombinationslappar (amoxicillin-klavulansyra och piperacillin-tazobaktam)		
E. coli	ATCC 35218	TEM-1 β-laktamas
K. pneumoniae	ATCC 700603	SHV-18 ESBL
S. aureus	ATCC 29213	β-laktamas

Kvalitetskontroll av β-laktam-β-laktamasinhibitorer

- **Aktiva komponenten** kontrolleras med en känslig stam
- **Inhibitorkomponenten** kontrolleras med en β-laktamasproducerande stam
- Båda testerna ska ingå i den rutinmässiga kvalitetskontrollen
- Gäller både för lappdiffusion och MIC-bestämning!

EUCAST QC-tabeller v. 8.0, 2018

Recommended strains for routine quality control

Recommendations for prinicipal QC[1]		Recommendations for agents not covered by principal QC[1]	
Organism	**QC strain**	**Agent**	**QC strain**
Enterobacteriaceae (Enterobacterales[2])	*E. coli* ATCC 25922	Colistin (MIC)	Add *E. coli* NCTC 13846
Pseudomonas spp.	*P. aeruginosa* ATCC 27853	Piperacillin (zone diameter)	*E. coli* ATCC 25922
		Ticarcillin (zone diameter)	*E. coli* ATCC 25922
		Colistin (MIC)	Add *E. coli* NCTC 13846
Stenotrophomonas maltophilia	*E. coli* ATCC 25922		
Acinetobacter spp.	*P. aeruginosa* ATCC 27853	Trimethoprim-sulfamethoxazole (MIC and zone diameter)	*E. coli* ATCC 25922
		Colistin (MIC)	Add *E. coli* NCTC 13846
Staphylococcus spp.	*S. aureus* ATCC 29213	Roxithromycin (MIC)	*H. influenzae* ATCC 49766
Enterococcus spp.	*E. faecalis* ATCC 29212	Ampicillin-sulbactam (MIC)	See table 2
		Amoxicillin (MIC)	*E. coli* ATCC 25922
		Amoxicillin-clavulanic acid (MIC)	See table 2

Control of β-lactam inhibitor combinations[1]		
Organism	**QC strain for active component**	**QC strain for inhibitor component**
Enterobacteriaceae (Enterobacterales[2])	*E. coli* ATCC 25922	See page 16
Pseudomonas spp.	*P. aeruginosa* ATCC 27853	See page 16

Kvalitetskontrollgränser

Range = tillåtet intervall
Dag-till-dag-variation
Viss variation i material

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	
		Target	Range
Amikacin	30	23	19-26
Amoxicillin-clavulanic acid	20-10	21	18-24
Ampicillin	10	19	15-22

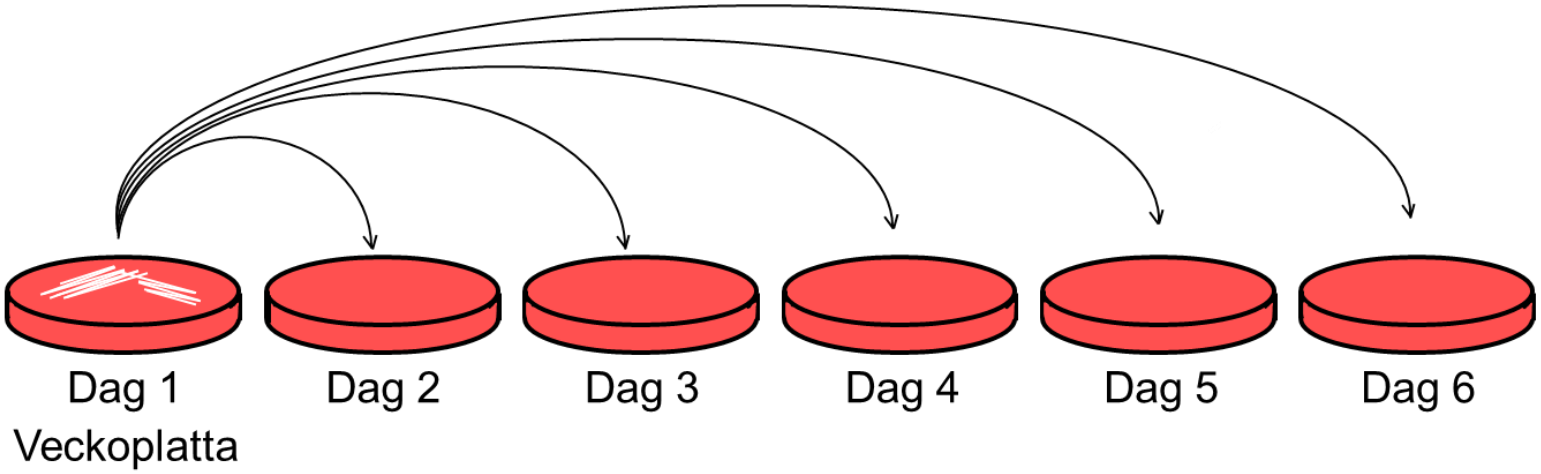
Target = målvärde
Medelvärdet från upprepade mätningar (≥10) bör vara på target ± 1 mm

Hantering av kvalitetskontrollstammar

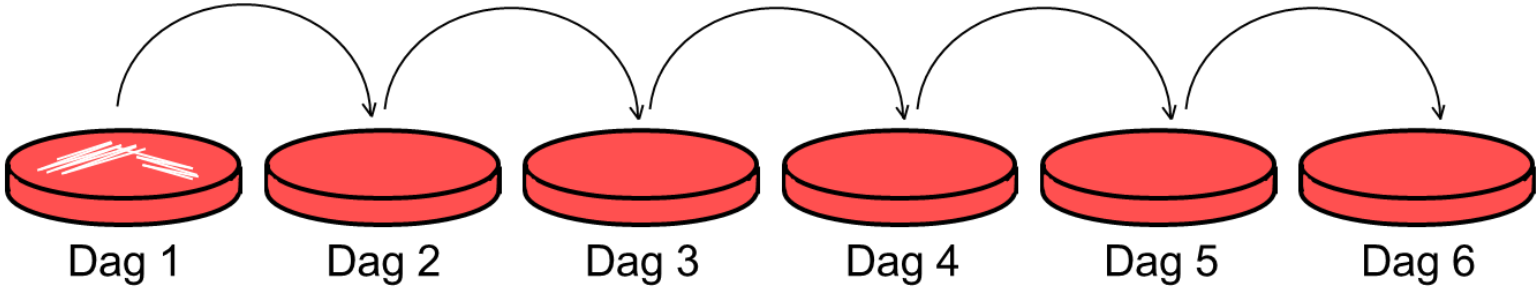
- Förvaras vid -70°C på keramiska kulor i små portioner.
- Spara minst två vialer av varje kontrollstam:
  1. Pågående bruk
  2. Arkivering
- Plocka alltid flera kolonier vid omstrykning av en referensstam för att undvika en ev. muterad koloni.
- Om man misstänker mutation eller kontamination, odla från arkivröret eller köp in en ny QC-stam.

Hantering av referensstammar

Icke krävande referensstammar:



Krävande referensstammar *(H. influenzae, S. pneumoniae)*

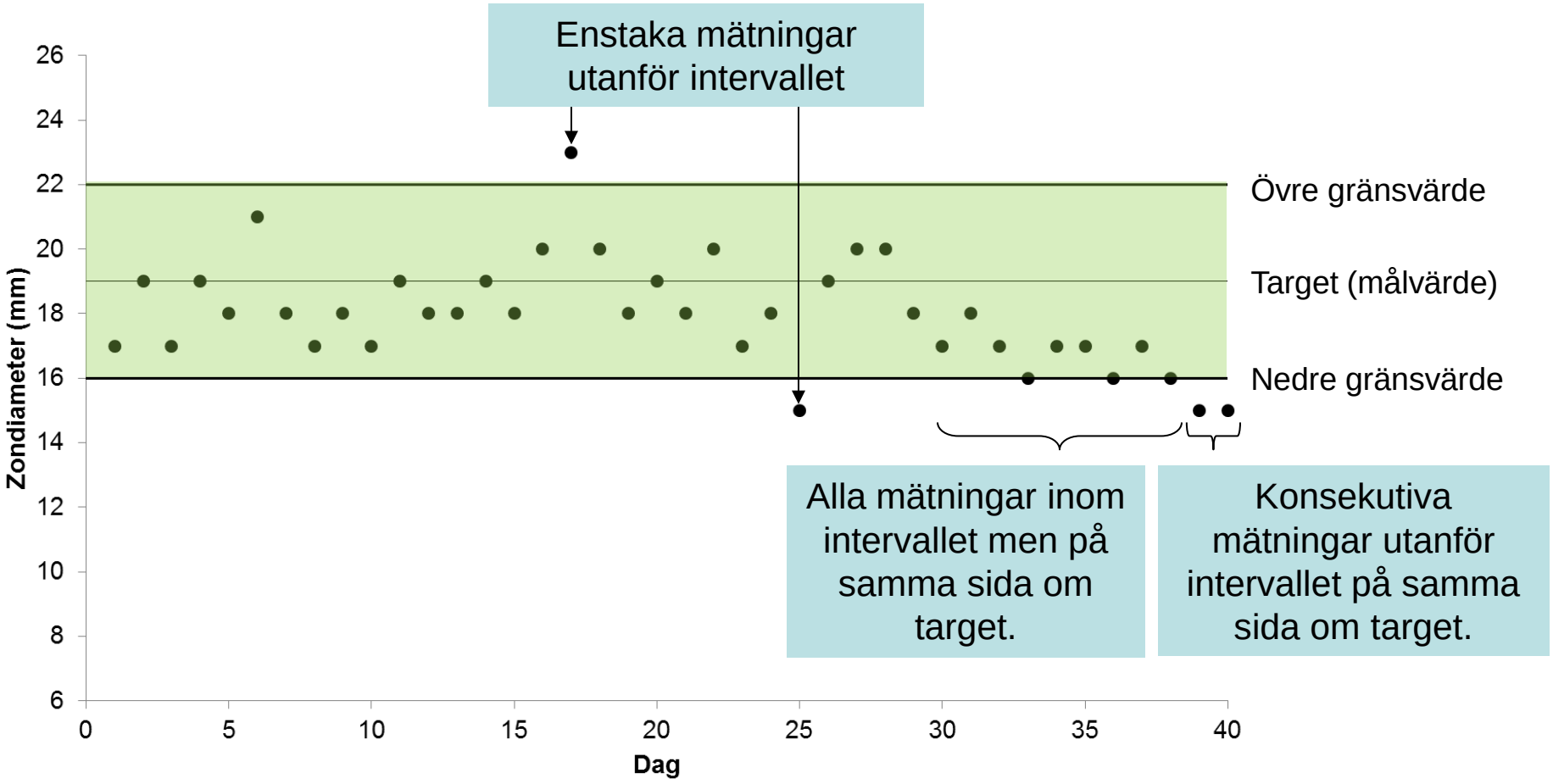


Rutinmässig kvalitetskontroll

- Börja varje dag med att läsa och bedöma kvalitetskontrollen innan de kliniska isolaten läses!

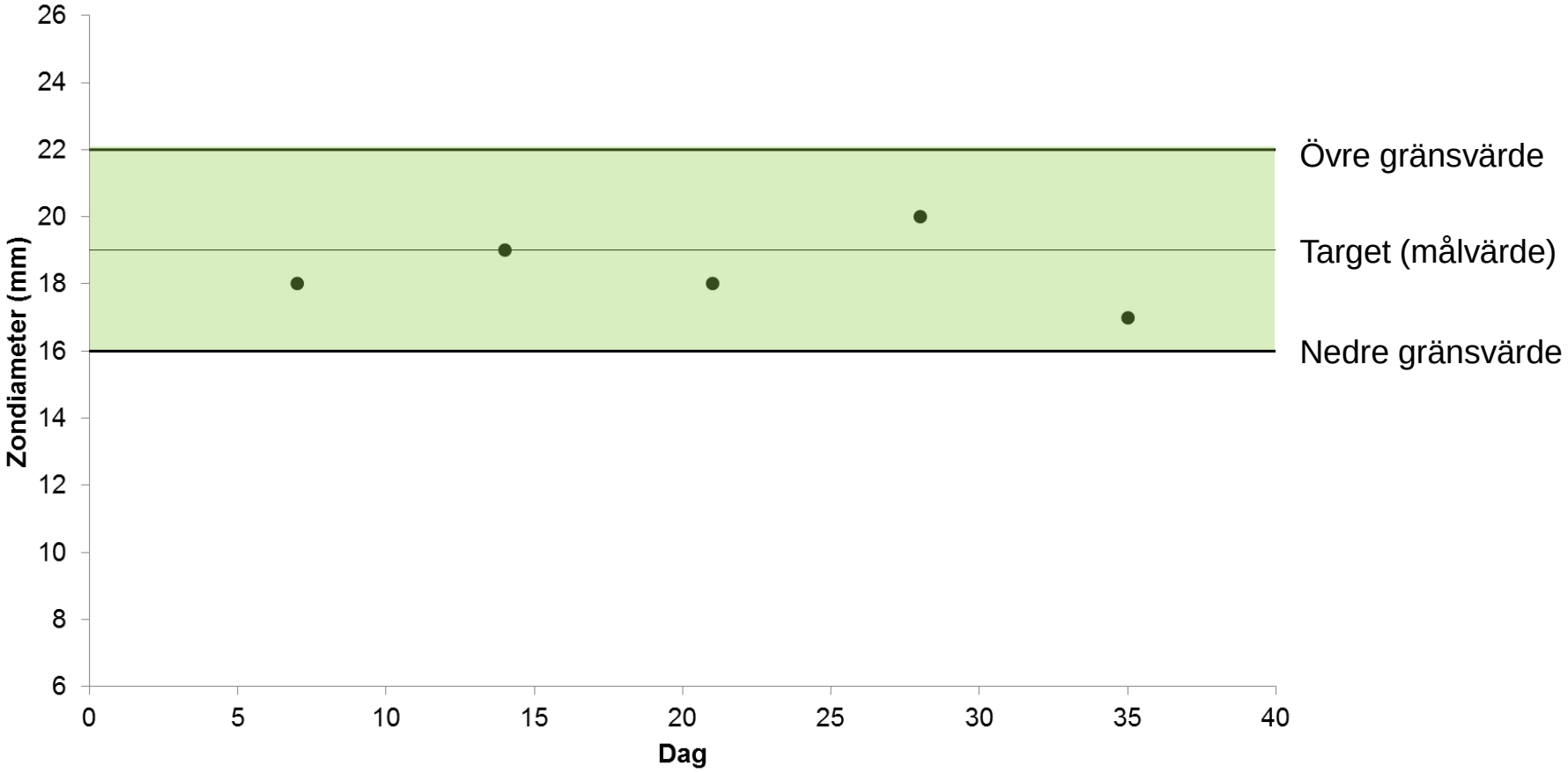
- Bedöm resultaten av de senaste 20 konsekutiva mätningarna.
  - Var uppmärksam på trender och på zoner som upprepade gånger hamnar över eller under målvärdet.
  - Felsök om 2 eller fler av 20 mätningar ligger utanför intervallet.

Övervakning av QC-resultat



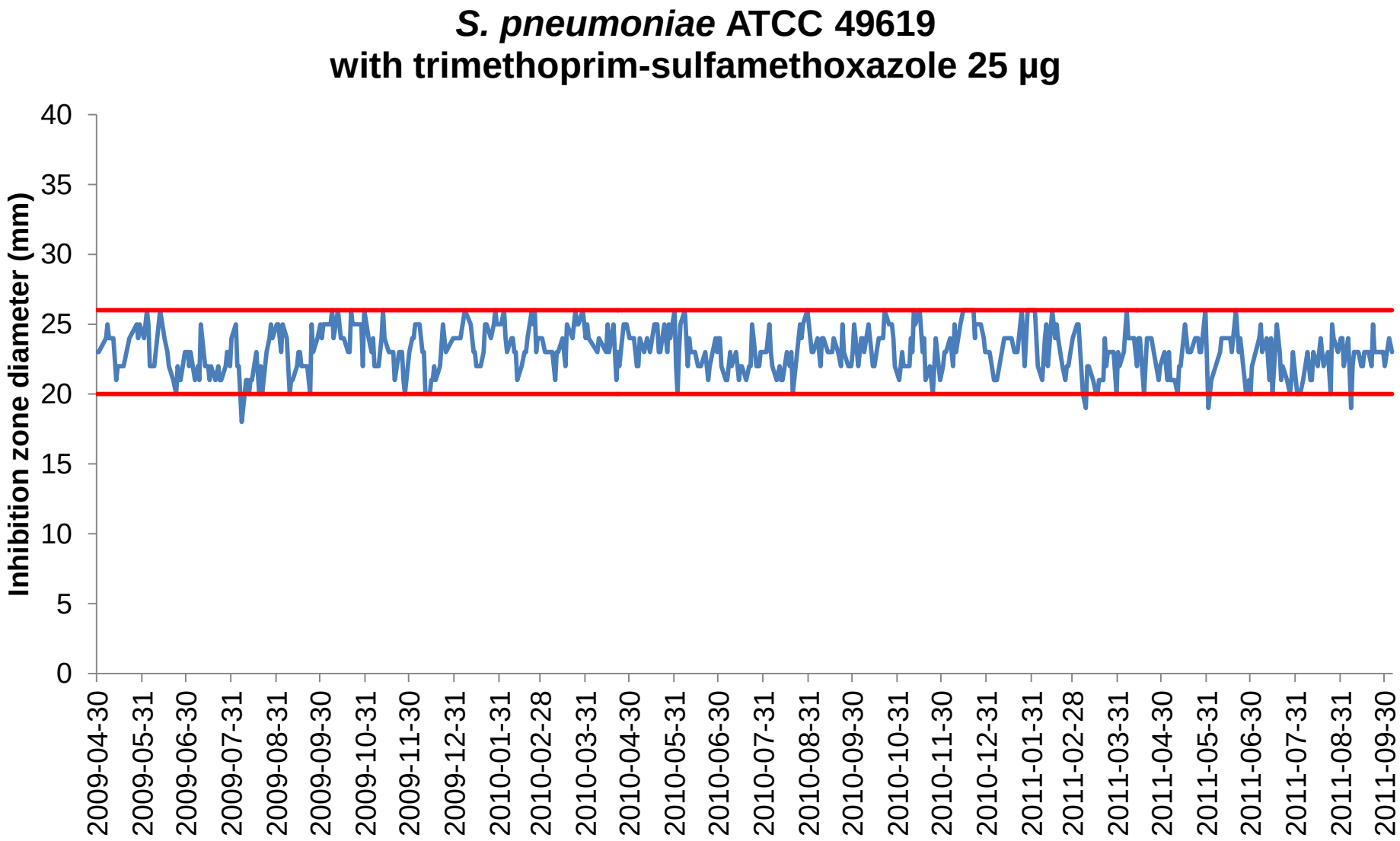
Medelvärdet bör vara på target ±1 mm!

Övervakning av QC-resultat

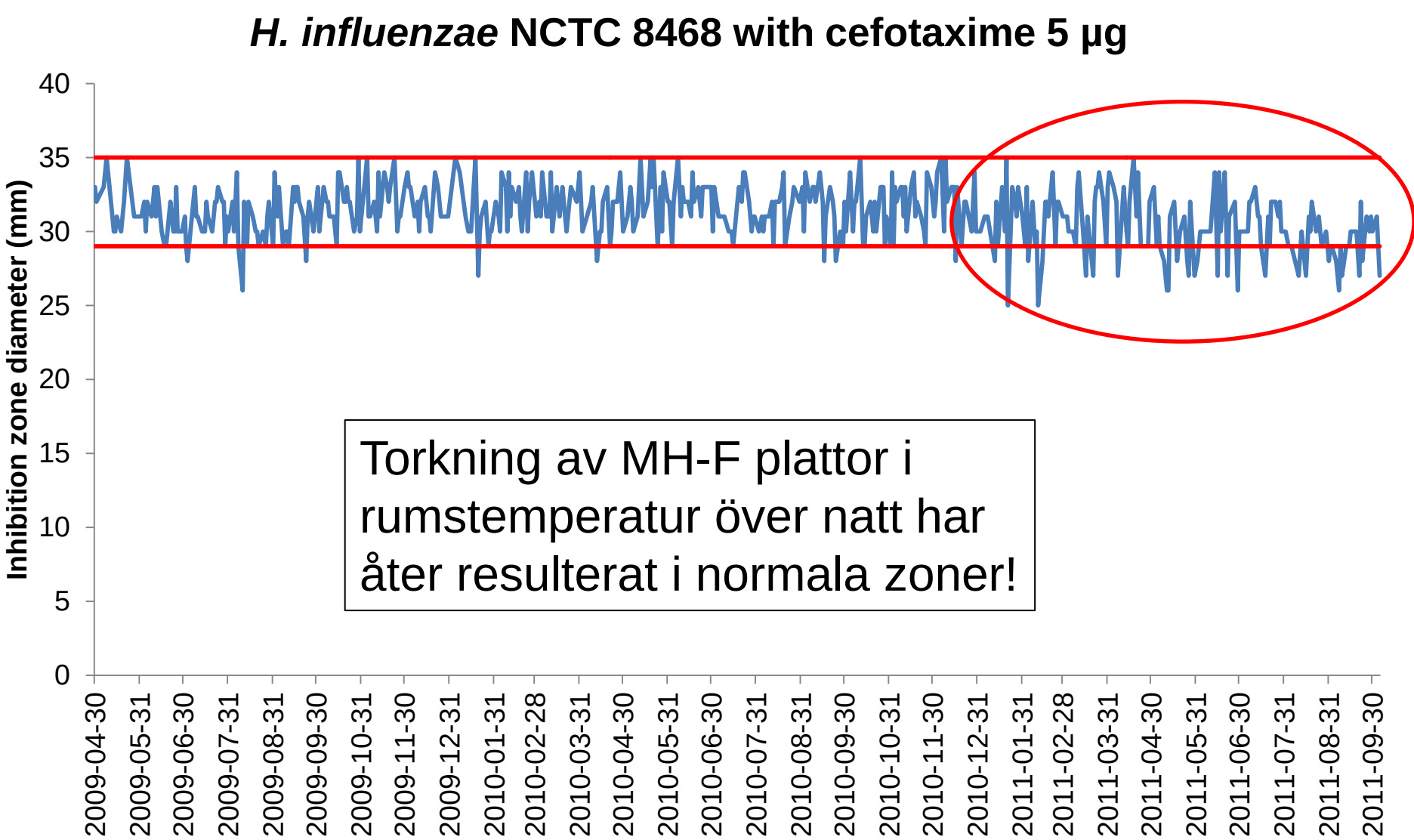


Daglig jämfört med veckovis kvalitetskontroll!

Rutinmässig kvalitetskontroll med agar från 3 tillverkare och 10-15 BMA



Rutinmässig kvalitetskontroll med agar från 3 tillverkare och 10-15 BMA



Jämförelse med referensdistributioner

- För att upptäcka
  - Systematiska avvikelser
  - Problem med lappar eller media
  - Problem med specifika art-antibiotika-kombinationer
- Kan göras för:
  - Kvalitetskontrollstammar
  - Kliniska isolat

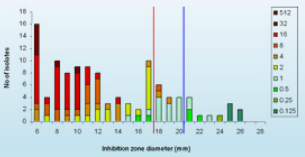
Referensdistributioner

EUCAST EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

MIC and zone distributions and ECOFFs

- Organization
- EUCAST News
- Clinical breakpoints
- Expert rules and intrinsic resistance
- Resistance mechanisms
- Guidance documents
- Consultations
- MIC and zone distributions and ECOFFs
- AST of bacteria
- AST of mycobacteria
- AST of fungi

E.coli with cefotaxime 5 ug
112 non-consecutive isolates
chose because of resistance



MIC and zone diameter distributions and ECOFFs

Link to MIC and zone diameter distributions and ECOFFs

The website gives MIC distributions (and since 2010 inhibition zone diameter distributions generated with the new EUCAST disk diffusion method) for a wide range of organisms and antimicrobial agents, including antifungals.

The distributions are based on collated data from a total of more than 30 000 MIC distributions containing more than several million MICs from worldwide sources. The distributions include MICs from national and international studies such as resistance

www.eucast.org

Referensdistributionerna ger inte information om förekomsten av resistens!

Antimicrobial wild type distributions of microorganisms

Search

Method: MIC Disk diffusion

Antimicrobial: Antimicrobial... Species: Escherichia coli Disk content: Disk content...

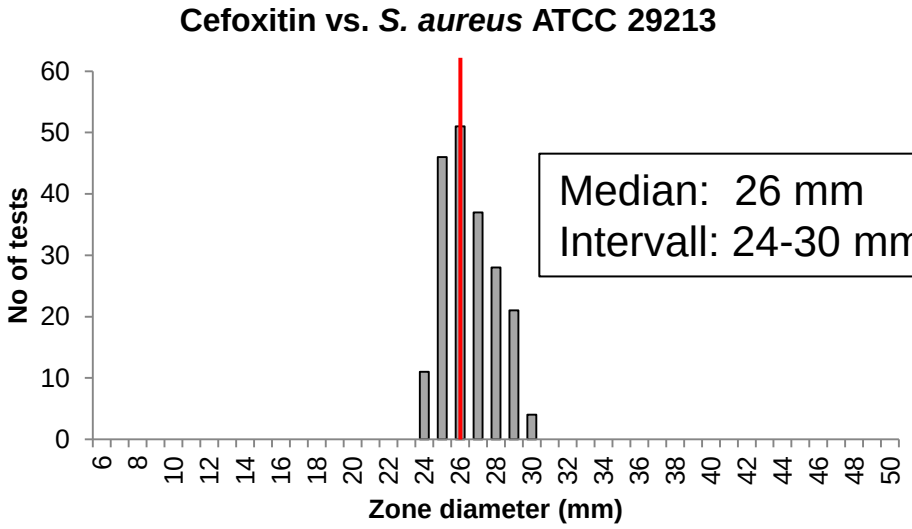
Species: **Escherichia coli** (Method: **Disk diffusion**)

Distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance

	Disk content	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Amikacin	30	34	0	0	0	1	3	0	3	6	5	11	25	74	194	333	431	448	399	205	68	17	8	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amoxicillin-clavulanic acid (fixed)	30	20	3	3	3	16	9	9	26	31	26	35	48	62	111	142	183	193	151	74	27	9	11	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ampicillin	10	13191	6	20	30	60	102	191	311	761	1426	2533	3796	5070	5667	5420	3518	2058	1069	489	248	155	49	54	24	14	4	6	0	4	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ampicillin-sulbactam (fixed)	20	76	1	5	8	14	12	15	16	29	30	29	22	38	50	76	115	94	64	35	7	4	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aztreonam	30	3	1	0	0	4	3	1	3	2	1	3	1	1	2	0	2	1	2	1	2	1	1	13	18	48	40	48	40	21	11	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefadroxil	30	1671	2	22	31	51	81	163	235	659	1743	4043	7722	9709	8398	4883	1886	720	258	100	29	22	11	16	12	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefalexin	30	386	3	5	6	19	27	42	59	119	153	280	554	928	1133	1159	762	492	222	115	52	25	9	12	4	4	3	3	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefepime	30	1	0	1	0	2	2	1	2	3	1	3	3	1	1	2	0	1	2	1	1	1	1	4	8	16	23	51	56	45	29	8	7	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefixime	5	43	14	4	1	0	2	2	3	6	1	2	4	5	5	20	47	76	101	76	40	24	17	11	5	4	1	0	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefotaxime	5	2184	2	25	35	29	31	35	20	22	26	24	30	19	17	53	63	175	465	1180	2874	5638	8638	8803	6935	4223	1732	866	348	228	126	53	31	20	9	11	1	8	0	3	0	3	0	1	0	0
Cefoxitin	30	75	0	5	10	13	10	9	13	23	22	15	25	26	71	88	118	172	268	283	234	202	119	45	7	2	3	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceftaroline	5	58	1	2	1	8	6	3	4	7	7	6	17	15	28	21	29	27	38	45	82	120	228	140	61	33	12	6	8	4	2	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceftazidime	10	548	13	84	132	174	166	175	185	142	147	146	113	123	107	164	174	752	1895	3964	7416	9496	8649	5354	2751	1251	505	248	102	54	30	17	12	10	0	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Ceftazidime-avibactam	14	30	3	3	5	6	10	7	13	19	47	47	50	45	22	18	16	25	59	65	80	104	87	76	69	27	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceftibuten	30	35	0	3	5	7	5	10	14	25	27	33	29	31	40	47	24	36	62	151	286	567	1023	1364	1808	2199	1591	1071	676	337	180	90	41	26	15	3	3	8	0	0	0	2	0	0	0	1

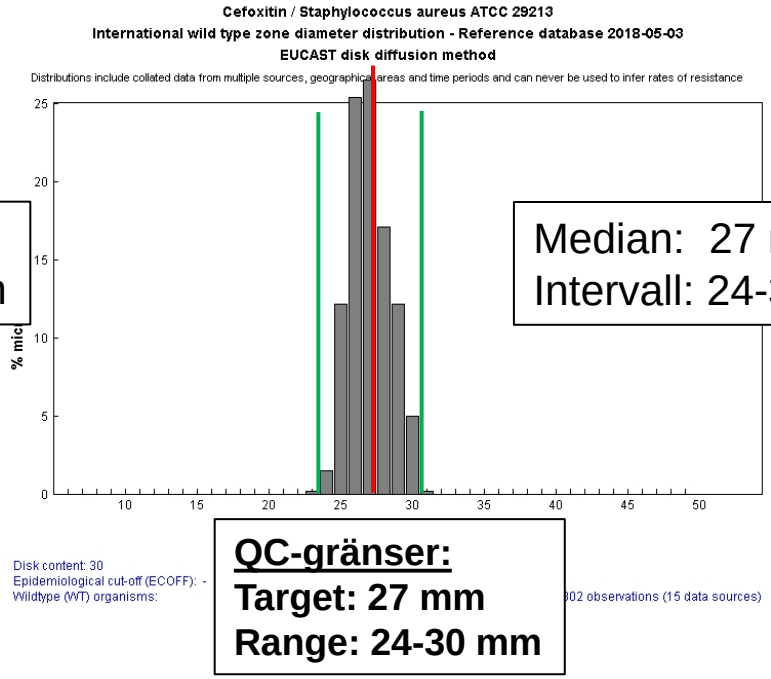
Jämförelse med referensdistributioner för kvalitetskontrollstammar

Rutindistribution



Median: 26 mm
Intervall: 24-30 mm

Referensdistribution



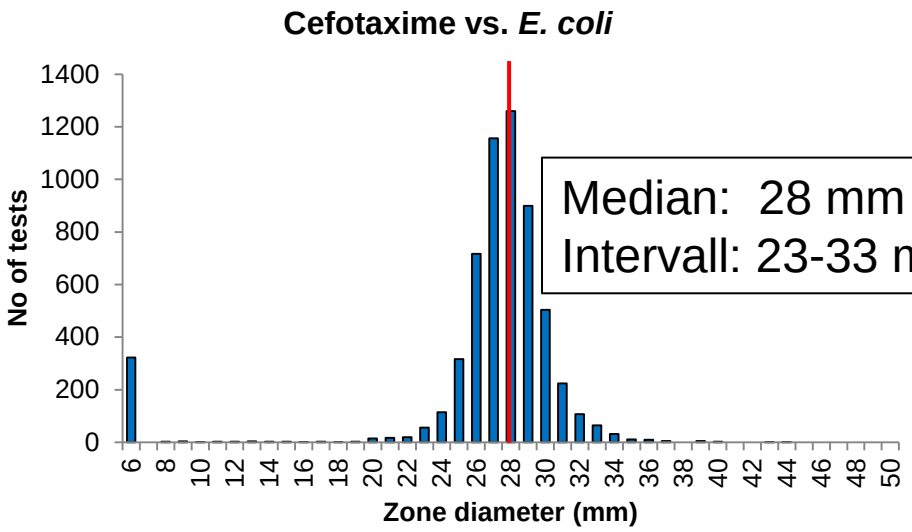
Median: 27 mm
Intervall: 24-30 mm

QC-gränser:
Target: 27 mm
Range: 24-30 mm

Jämför medianen för de båda distributionerna!

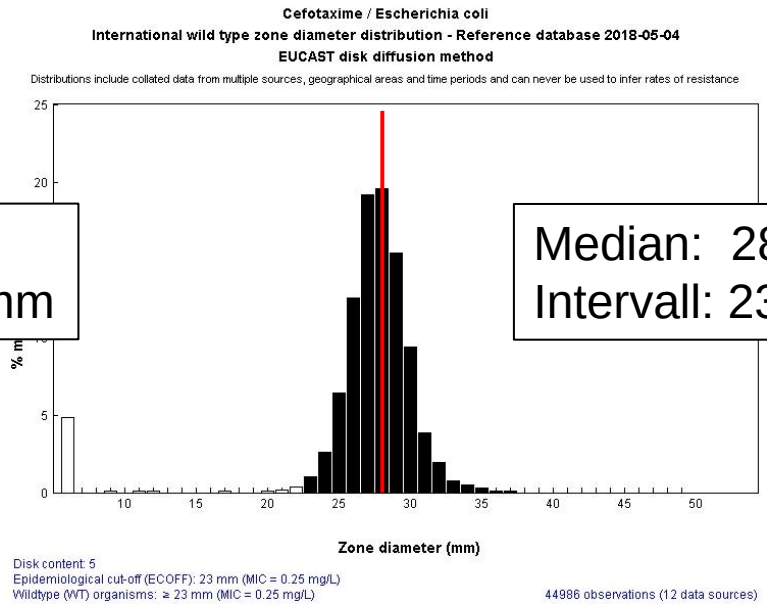
Jämförelse med referensdistributioner för kliniska isolat

Rutindistribution



Median: 28 mm
Intervall: 23-33 mm

Referensdistribution

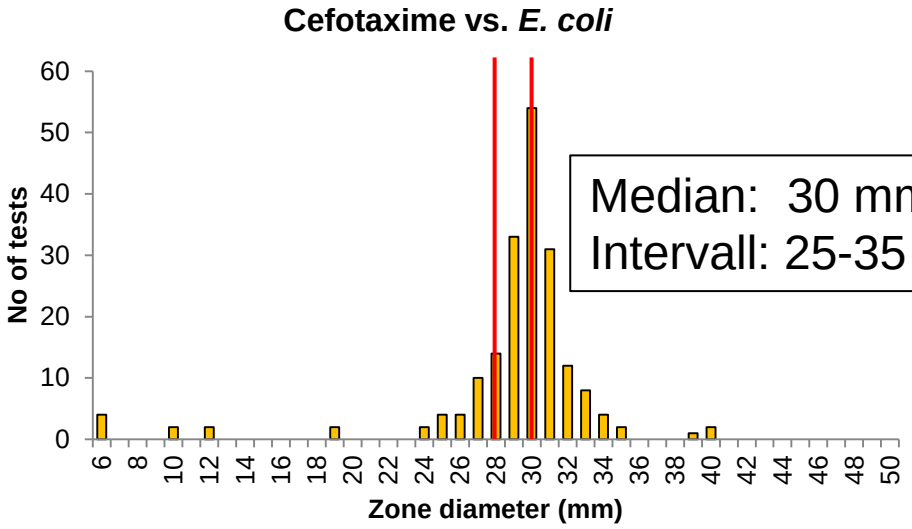


Median: 28 mm
Intervall: 23-33 mm

Jämför medianen för vildtyps-isolat!

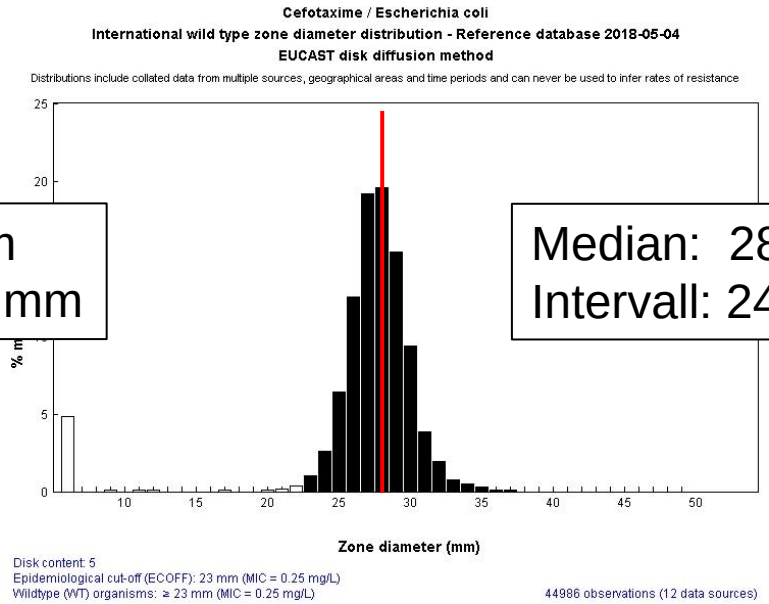
Jämförelse med referensdistributioner för kliniska isolat

Rutindistribution



Median: 30 mm
Intervall: 25-35 mm

Referensdistribution



Median: 28 mm
Intervall: 24-33 mm

Medianen för vildtyps-isolat bör vara inom referensdistibutionens median ± 1 mm.

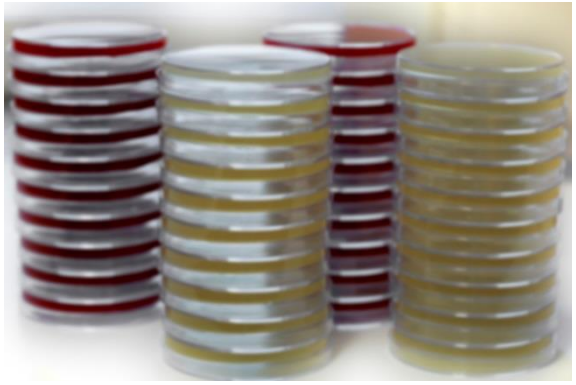
Material från olika leverantörer

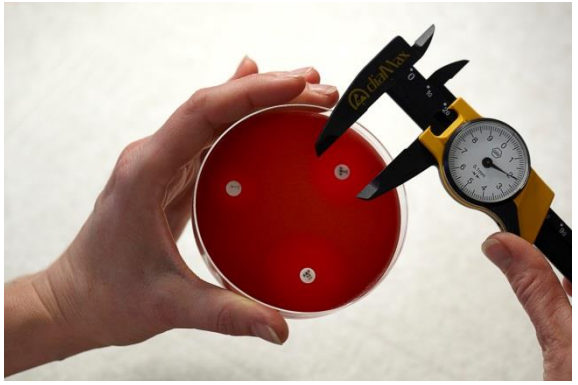
- Man ska kunna kombinera lappar och agar från olika leverantörer och få tillförlitliga och reproducerbara resultat.
  - Lappar och agar säljs inte som kit!
- Gör kvalitetskontroll för att se att resultaten är inom godkänt intervall och nära målvärdet.
- EUCAST använder data för lappar och agar från olika leverantörer för:
  - QC-kriterier
  - Zonbrytpunkter
  - Referensdistributioner (EUCAST hemsida)

Felsökning

Potentiella felkällor

1. Antibiotikalappar
2. Media
3. Ej följt metodbeskrivningen
4. Avläsning
5. Kvalitetskontrollstam

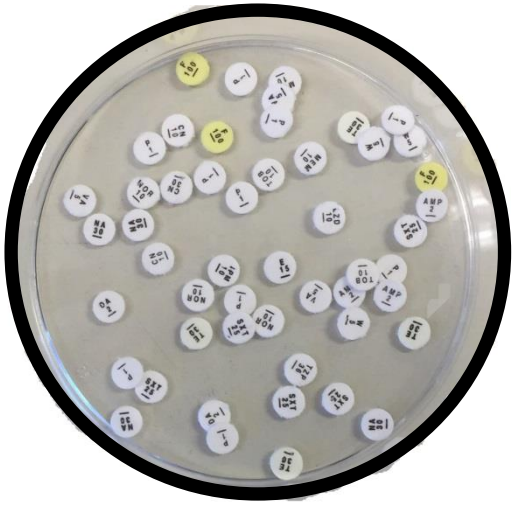




Potentiella felkällor (I)

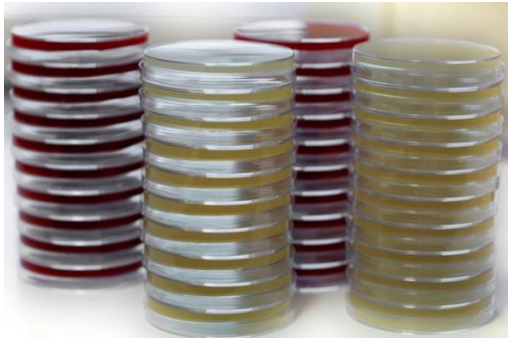
- Antibiotikalappar
  - Minskat antibiotikainnehåll i lappen
    - Nedbrytning under lagring och hantering
    - Utgångsdatum passerat
  - Fel antibiotikalapp
  - Fel lappstyrka

- Byt till nytt rör eller ny lot!



Potentiella felkällor (II)

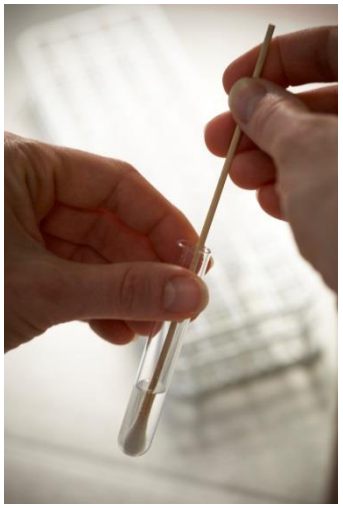
- Media
  - Divalenta katjoner, tymidin, pH etc
  - Tillsatser: Hästblod och β-NAD
  - Agardjup (4 mm ± 0.5 mm)
  - Tillverkning och förvaring
    - Hållbarhet?
    - Fuktiga plattor?



- Gör batchkontroll vid inköp av agar
- Kontrollera agardjup för varje ny batch
- Se över tillverkning och förvaring

Potentiella felkällor (III)

- Ej följt metodbeskrivningen
  - 15-15-15-minutersregeln
  - Felaktigt inokulat
  - Inkuberingstemperatur/-miljö
  - Inkuberingstid (16-20h)



- Se över rutiner för resistensbestämning
- Utbilda (ny och gammal) personal

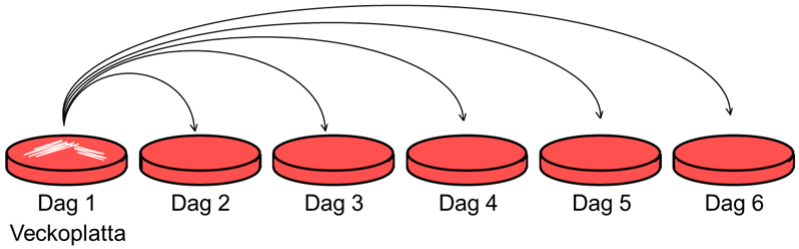
Potentiella felkällor (IV)

- För många lappar på plattan
  - Interaktion mellan antibiotika och överlappande zoner
- Avläsning
  - Belysning och bakgrund
  - Otydliga zonkanter
  - Växt/hemolys

- Se över placering av lappar i dispensrar
- Genomför regelbundna avläsningsövningar för all personal
- Kontakta EUCAST-laboratoriet för support

Potentiella felkällor (V)

- Kvalitetskontrollstam
  - Fel stam
  - Ej färsk
  - Kontamination
  - Mutation



- Ta upp ny QC-stam från stamförråd

Uppdateringar och support

- Följ regelbundet uppdateringar i metodologi, QC-tabeller och brytpunktstabeller

www.eucast.org
www.nordicast.org

Frågor och/eller problem?

Kontakta oss!

erika.matuschek@eucast.org

jenny.ahman@eucast.org

EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases