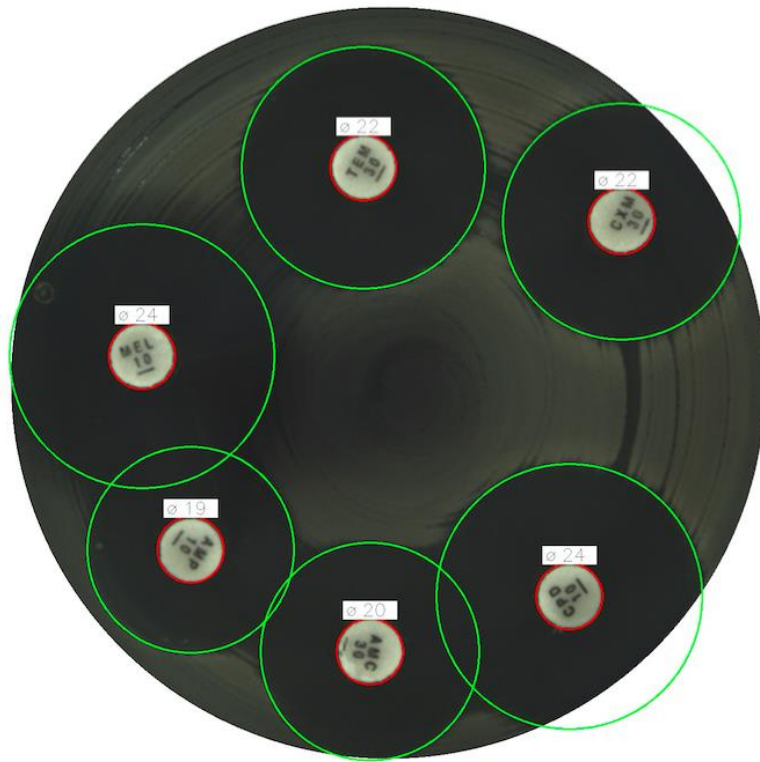


VALIDERING AF IRIS-100 VED DISKDIFFUSIONSMETODEN



Udarbejdet af Kristin Elden Varpe (60081327) & Malene Mai Nørbak (60081344)

Udarbejdet i perioden 19. mar. 2018 – 04. jun. 2018

Vejledere: Kaj Nielsen & Khaled Ghathian

Klinisk Mikrobiologisk afdeling, Hvidovre Hospital

Københavns Professionshøjskole - Biof15

Antal anslag u. mellemrum: 52.428

Forord

Dette projekt er udarbejdet af Kristin Elden Varpe og Malene Mai Nørbak i perioden 19. marts 2018 til 4. juni 2018. Projektet er det afsluttende bachelorprojekt på Bioanalytikeruddannelsen, Københavns Professionshøjskole.

Bachelorprojekt er skrevet på Klinisk Mikrobiologisk afdeling, Hvidovre Hospital, i samarbejde med PRO Devices, Danmark.

Projektets formål er metodesammenligning af semi-automatisk aflæsning med manuel aflæsning af hæmningszoner ved følsomhedsbestemmelse af isolater fra bloddyrkninger.

Vi ønsker at takke vores vejledere Kaj Nielsen, fra Københavns Professionshøjskole og Khaled Ghathian, fra Klinisk Mikrobiologisk afdeling, Hvidovre Hospital, for hjælp og vejledning gennem projektet. Yderligere vil vi gerne takke Klinisk Mikrobiologisk afdeling på Hvidovre Hospital, for lån af diverse materialer der var nødvendige for at udføre projektets forsøg. Sidst men ikke mindst vil vi gerne takke PRO Devices for at stille IRIS-100 til rådighed til forsøget.

Denne rapport henvender sig til sundhedsfagligt uddannede med interesse for klinisk mikrobiologi.

03.06.2018

Kristin Elden Varpe



03.06.2018

Malene Mai Nørbak



Resumé

Introduktion: Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, på Hvidovre Hospital benytter sig af manuel aflæsning af hæmningszoner ved diskdiffusion af isolater fra bloddyrkninger. Manuel aflæsning er en metode, hvor der kan opstå interpersonelle variationer. Til dette projekt valideres derfor den semi-automatiske aflæser, IRIS-100, for at undersøge om IRIS-100 kan være med til at standardisere aflæsningen af hæmningszoner ved diskdiffusionsmetoden. Formålet med dette projekt er således at sammenligne semi-automatisk aflæsning ved IRIS-100 med manuel aflæsning (Golden Standard) af hæmningszoner ved diskdiffusionsmetoden.

Metode: 70 isolater fra bloddyrkninger blev medtaget til projektets forsøg. Der blev udført primær resistensbestemmelse samt sekundær resistensbestemmelse for alle 70 isolater. Hæmningszonerne blev målt på IRIS-100 og ved manuel aflæsning og efterfølgende SIR-fortolket. Afvigelser mellem de to metoder blev noteret som very major error, major error eller minor error.

Resultater: Resultaterne blev inddelt efter grampositive og gramnegative bakterier. Sammenlagt var der for de grampositive bakterier en gennemsnitlig overensstemmelse mellem de to metoder på 91% med en total afvigelse på 9%. Afvigelserne blev hovedsageligt set for *Staphylococcus aureus* for antibiotikadiskene erythromycin, clindamycin, linezolid og moxifloxacin. Ingen very major errors blev observeret for de grampositive bakterier.

Sammenlagt var der for de gramnegative bakterier en gennemsnitlig overensstemmelse mellem de to metoder på 97% med en total afvigelse på 3%. Her blev der set flest afvigelser for *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumoniae* for antibiotikadiskene ampicillin, ciprofloxacin, amoxicillin-clavulansyre og cefuroxim, hvor to very major errors blev observeret for ciprofloxacin.

Konklusion: Projektets resultater viste en stor overensstemmelse mellem de to metoder og det kan konkluderes, at IRIS-100 kan være med til at standardisere aflæsning af hæmningszoner ved diskdiffusionsmetoden.

Indholdsfortegnelse

1. INTRODUKTION	5
1.1. PROBLEMFOMULERING	6
1.2. TEORI	7
1.2.1. Følsomhedsbestemmelse.....	7
1.2.2. Hæmningszonefortolkning	8
1.2.3. IRIS-100.....	8
1.3. METODEVALG	10
1.3.1. Prøvemateriale	10
1.3.2. Kvalitetssikring.....	10
1.3.3. Dataopsætning	11
2. MATERIALER OG METODE	12
2.1. MATERIALELISTE.....	12
2.2. FORSØGSDESIGN FOR KONTROLLER	14
2.2.1. Metode kontroller.....	14
2.3. FORSØGSDESIGN FOR BLODDYRKNINGSISOLATER	15
2.3.1. Metode bloddyrkningsisolater.....	15
2.4. DATABEARBEJDNING	18
2.4.1. Udregning af VME, MAE, MIE.....	19
3. RESULTATER	20
3.1. KONTROLLER.....	21
3.2. GRAMPOSITIVE ISOLATER	22
3.3. GRAMNEGATIVE ISOLATER.....	25
4. DISKUSSION	30
4.1. KONTROLLER.....	30
4.2. GRAMPOSITIVE BAKTERIER	32
4.2.1. Primær resistensbestemmelse ved IRIS-100 vs. Golden Standard.....	32
4.2.2. Sekundær resistensbestemmelse ved IRIS-100 vs. Golden Standard	33
4.2.3. Primær manuel resistensbestemmelse vs. Golden Standard	33
4.2.4. Samlet diskussion for de grampositive bakterier	34
4.3. GRAMNEGATIVE BAKTERIER.....	36
4.3.1. Primær resistensbestemmelse ved IRIS-100 vs. Golden Standard.....	36
4.3.2. Sekundær resistensbestemmelse ved IRIS-100 vs. Golden Standard	36
4.3.3. Primær manuel resistensbestemmelse vs. Golden Standard	37
4.3.4. Samlet diskussion for de gramnegative bakterier.....	38
4.4. BETYDNING AF VERY MAJOR ERROR, MAJOR ERROR OG MINOR ERROR	39
4.5. VURDERING AF IRIS-100	41
4.6. KONKLUSION.....	43
4.7. PERSPEKTIVERING	43
5. LITTERATURLISTE	44
BILAG 1	46

1. Introduktion

Antibiotikabehandling er essentielt til behandling af bakterielle infektioner, herunder sepsis, hvilket kan være en livstruende tilstand for patienten. Sepsis kræver derfor tidlig og hurtig antibiotikabehandling og behandling med den korrekte og optimale mængde af antibiotika (1). Samtidig kan tidlig antibiotikabehandling reducere udgifter og forhindre resistensudvikling for bakterierne. Antibiotika er derfor essentielt for patientbehandlingen (1; 2).

Valg af den korrekte og optimale mængde af antibiotika kan bestemmes ved følsomhedsbestemmelse. Her bestemmes mikroorganismers følsomhed overfor et givent antibiotikum og det vides herved hvilket antibiotika, der kan bruges til behandling af patienten (3). Bestemmelse af mikroorganismers følsomhed overfor et givent antibiotikum kan gøres fra isolater udsået fra bloddyrkninger, hvor Klinisk Mikrobiologisk afdeling på Hvidovre Hospital (KMA) benytter sig af en manuel diskdiffusionsmetode til denne påvisning (4).

Ved diskdiffusion udsås isolater på Müller-Hinton agarplader, hvor der påsættes antibiotika. Her vil antibiotika diffundere ud i agarpladen, hvorved der vil blive dannet en hæmningszone. Størrelsen på hæmningszonen er et udtryk for mikroorganismers følsomhed over for et givent antibiotikum (4; 5).

Til aflæsning af hæmningszoner benytter KMA sig af manuel aflæsning i henhold til European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing's (EUCAST) retningslinjer (6). Her aflæses størrelsen af hæmningszoner ved hjælp af en lineal og noteres som følsom (S), intermediær (I) eller resistent (R) ifølge EUCAST breakpoint (7).

Denne aflæsningsmetode kan være subjektiv idet hæmningszoner måles manuelt og af flere forskellige bioanalytikere. Dette kan give forskellige resultater for den samme prøve, alt efter hvem der måler hæmningszoner, da hæmningszoner kan opfattes og aflæses forskelligt. Sommetider kan det være svært at aflæse zonegrænserne, da hæmningszoner ikke altid har en skarp afgrænset kant og at nogle mikroorganismer kan danne hæmolyse. Derved kan manuel aflæsning føre til varierende resultater, på grund af interpersonel bedømmelse af hæmningszonestørrelsen.

KMA har i samarbejde med PRO Devices derfor ønsket, at teste den semi-automatiske hæmningszoneaflæser, IRIS-100, til måling af hæmningszoner og sammenligne denne metode med manuel aflæsning af hæmningszoner ved diskdiffusionsmetoden. Det er derfor interessant at undersøge om denne semi-automatiske metode kan benyttes til vurdering af hæmningszoner samt være med til at standardisere aflæsningen af dette. Da IRIS-100 er under udvikling, er aflæseren der bruges til dette forsøgsprojekt en prototype.

IRIS-100 benytter sig af fotogenkendelse til automatisk aflæsning af hæmningszonestørrelser (8). Hæmningszonernes størrelse sikres ved hjælp af billeddokumentation og resultaterne registreres på en tilkoblet computer (8). Her vurderes og justeres hæmningszonerne inden resultatet gemmes (8). Denne semi-automatiske metode kan være med til at give en mere standardiseret aflæsning og dermed minimere usikkerheden på fortolkning af resultatet, end ved manuel bedømmelse.

Til forsøget benyttes isolater fra bloddyrkninger, hvor der i laboratoriet på KMA udføres primær resistensbestemmelse til bestemmelse af bakteriernes følsomhed (9). Yderligere foretages der en sekundær resistensbestemmelse, da KMA bruger denne som Golden Standard. Golden Standard er sekundær resistensbestemmelse i henhold til EUCAST retningslinjer (6).

Formålet med dette projekt er således at sammenligne semi-automatisk aflæsning ved IRIS-100 med manuel aflæsning af hæmningszoner ved diskdiffusion.

1.1. Problemformulering

Hvilket klinisk potentiale har anvendelsen af semi-automatisk aflæsning, ved IRIS-100 sammenlignet med anvendelsen af manuel aflæsning (Golden Standard) af hæmningszoner ved diskdiffusion, til fortolkning af SIR for bloddyrkningsisolater?

1.2. Teori

1.2.1. Følsomhedsbestemmelse

Til dette projekt blev der til følsomhedsbestemmelsen brugt Kirby-Bauer diskdiffusion, hvorved følgende afsnit tager udgangspunkt i denne metode.

In vitro følsomhedsbestemmelse bruges til at bestemme mikroorganismers følsomhed eller resistens overfor et givent antibiotikum, således at det er muligt at vælge den korrekte antibiotikabehandling til patienten (3).

Mikroorganismer udsås og inkuberes på Müller-Hinton agarplader med/uden blod (MH/MH-F), hvor der påsættes udvalgte antibiotikadisks. Antibiotikadiskene vælges efter bakteriens form og lejring, set ved hjælp af grammikroskopi (3).

Diffusion af antibiotika ud i agarpladen samt vækst af mikroorganismen vil danne en hæmningszone. Størrelsen af denne hæmningszone er et udtryk for hvor stor en antibiotikakonzentration, der er nødvendig for at hæmme/dræbe væksten af mikroorganismen. Herved afspejler størrelsen på hæmningszonen mikroorganismens følsomhed overfor et givent antibiotikum (3).

Diffusionshastigheden af antibiotika afhænger af sammensætningen af ioner, peptoner og pH-buffer, der er til stede i agarpladen og molekylvægten af antibiotikaet. Her vil store molekyler diffundere langsommere ud i agarpladen end små molekyler (3). Yderligere påvirkes mikroorganismens vækst af inkubationsforhold samt ydre miljø, såsom rumtemperatur. Derved har hvert antibiotika et unikt breakpoint, der viser mikroorganismens følsomhed (3).

Til at standardisere antibiotikas diffundering i agarpladen samt opnå et korrekt inokulum anvendes retningslinjer beskrevet af blandt andet EUCAST og Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (6; 10). Til dette projekt anvendes EUCAST retningslinjer, da disse er de europæiske retningslinjer til følsomhedsbestemmelse (6).

1.2.2. Hæmningszonefortolkning

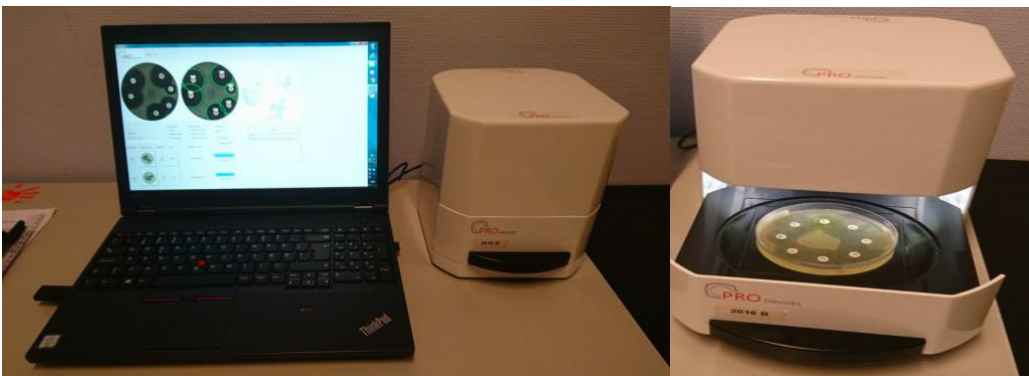
Aflæsning af hæmningszoner foregår manuelt ved at måle diameteren af mikroorganismens hæmningszone. Kanten på hæmningszoner kan variere fra at være skarp, have dannet dobbeltzone, strandbred, sværme, hæmolysere eller til at have dannet en fantomzone (11). Alle disse forhold har indflydelse på hvordan hæmningszonen skal aflæses (11).

Til at tolke mikroorganismers følsomhed overfor et givent antibiotikum benyttes SIR-fortolkning (11). Her fortolkes S som sensitiv, I som intermediær og R som resistent.

1.2.3. IRIS-100

IRIS-100 er en semi-automatisk hæmningszoneaflæser designet af PRO Devices til at aflæse størrelsen på hæmningszoner ved følsomhedsbestemmelse. Aflæseren benytter sig af fotogenkendelse til at detektere hvilke antibiotikadisks, der er til stede på agarpladen samt måling af hæmningszoner (8).

IRIS-100 er tilkoblet en computer med et tilhørende softwareprogram, se figur 1. I dette program kan der vælges seks forskellige algoritmer, der repræsenterer seks bakteriearter; *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* og *Staphylococcus aureus*. De forskellige algoritmer anvendes til de forskellige bakterier, da lysstyrken på billedet ændres ved de forskellige bakterier (8).



Figur 1 (eget foto). Billedet til venstre viser opsætning af IRIS-100 tilkoblet computer med tilhørende softwareprogram. Billedet til højre viser indsætning af resistensplade i IRIS-100.

IRIS-100 tager et billede af resistenspladen og måler automatisk størrelsen på hæmningszonerne samt kommer med et bud på hvilke antibiotikadisks, der er på pladen. Disse billeder bliver vist i softwareprogrammet. Her er det muligt at justere hæmningszonerne manuelt ved at klikke ind på billedet af pladen i programmet, se figur 2 (8).



Figur 2 (eget foto). Billedet til venstre viser valg af antibiotikadisk. Billedet til højre viser hvordan hæmningszoner justeres.

Efter at hæmningszonerne er målt og antibiotika valgt, gemmes billederne med de målte hæmningszoner i programmet. Her er det muligt at se billeder af resistensplader med og uden de målte hæmningszoner.

1.3. Metodevalg

1.3.1. Prøvemateriale

Prøvematerialet, der benyttes til dette projekt, er isolater fra bloddyrkningsprøver fra laboratoriet på KMA. Disse isolater vælges i forhold til at analysere på de bakterier fra blod, der modtages på afdeling. Isolaterne fra laboratoriet, der benyttes til projektet, er tilfældigt valgt. Grunden til at isolaterne er tilfældigt valgt, er for at afspejle den normale arbejdsgang på KMA, hvor KMA heller ikke udvælger, hvilke isolater der skal analyseres.

Er der isolater med for lidt/for meget prøvemateriale eller med blandingskulturer, aflæses hæmningszonerne også. Dette igen for at afspejle arbejdsgangen i laboratoriet, da prøver med blandingskulturer vil blive aflæst på KMA.

Der ønskes resultater fra ca. 70 isolater og der forventes at blive aflæst 5-10 isolater pr. dag fra laboratoriet i løbet af en periode på 3 uger. Der medtages kun fakultativ anaerobe og strikt aerobe bakterier. Gær og anaerobe bakterier medtages ikke, da IRIS-100 ikke er udviklet til disse mikroorganismer på nuværende tidspunkt.

De primære resistensplader er overtaget fra bloddyrkningssektionen i laboratoriet, hvor disse plader er udsået af forskellige bioanalytikere. Pladerne aflæses både manuelt og på IRIS-100 for det samme isolatnummer, af rapportens forfattere (to bioanalytikerstuderende). Dette gøres for at give den størst mulige overensstemmelse i aflæsningen. Derudover udføres sekundær resistensbestemmelse for hver primær isolat der aflæses, da denne metode bruges som Golden Standard på KMA.

1.3.2. Kvalitetssikring

Til kvalitetssikring af resistensbestemmelse benyttes udvalgte kendte ATCC-kontrolstammer, som aflæses og vurderes i henhold til EUCAST's retningslinjer (6). Disse ATCC-kontrolstammer benyttes for at kontrollere at analyserne er udført korrekt. Grundet de forskellige isolater der modtages fra laboratoriet, benyttes både grampositive og gramnegative ATCC-kontrolstammer. Disse ATCC-kontrolstammer er; *Escherichia coli* ATCC 25922 og *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, der inkuberes i almindelig atmosfærisk luft og *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 i 5% CO₂-inkubation. Disse ATCC-kontrolstammer er udvalgt, da de repræsenterer både gramnegative og

grampositive bakterier, der inkuberes i almindelig atmosfærisk luft og 5% CO₂. Hermed testes inkubationsforholdene, der har betydning for bakterievækst og agardiffusion.

En yderligere kvalitetssikring er at overholde 15-15-15 reglen i forbindelse med den sekundære resistensbestemmelse, i henhold til EUCAST retningslinjer (6).

Dette betyder, at der maksimalt må gå 15 minutter fra bakteriesuspensionen laves til den udsås på pladen. Herefter må der maksimalt gå 15 minutter fra suspensionen udsås til, at der påsættes antibiotika på agarpladen. Tilslut må der maksimalt gå 15 minutter fra der påsættes antibiotika på pladen til den inkuberes (6).

Til kvalitetssikring af IRIS-100 vælges den korrekte algoritme, alt efter bakterieart, som vist i Tabel 1 side 11.

Tabel 1. Viser IRIS-100 algoritme, for seks bakteriearter.

IRIS-100 algoritme	Bakterieart
SP Red	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
HI Red	<i>Haemophilus influenzae</i>
PA Green	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EC Yellow	<i>Escherichia coli</i>
EF Yellow	<i>Enterococcus faecalis</i>
SA Yellow	<i>Staphylococcus aureus</i>

Grunden til at der vælges en bestemt algoritme til hver art er, at lysstyrken varierer alt efter algoritmerne og ved valg af den korrekte algoritme fås det bedste billedkvalitet.

1.3.3. Dataopsætning

Resultatet af hæmningszonerne overføres til et digital regneark (Excel), således at det er muligt at lave databearbejdelse. Regnearket er opdelt efter gramnegative og grampositive bakterier og efter primær og sekundær resistensbestemmelse. Størrelsen på hæmningszonerne noteres i millimeter og der fortolkes om zonerne er sensitive (S), intermediære (I) eller resistente (R) overfor den givne antibiotikadisk. Der hvor hæmningszonerne fra den manuelle aflæsning og IRIS-100 afviger fra hinanden, mærkes resultaterne med rød farve for very major error (R fortolkes som S), gul farve for major error (S fortolkes som R) og grøn farve for minor error (S eller R fortolkes som I, eller omvendt).

2. Materialer og Metode

2.1. Materialeliste

Apparat:

- IRIS-100, PRO Devices
- Computer til IRIS-100
- Densimat, Biomérieux
- Almindelig atmosfærisk inkubator 37°C, Memmert IN750
- 5% CO₂ – inkubator, Thermo Electron Corporation, Hera cell 240
- Retro 80C

Utensilier:

- Sterile vatpind
- Affaldskasser til smittefarligt affald
- Øjepodenål 1µL og 10µL
- Reagensglas 5mL
- Lineal

Materialer og reagenser:

- Agarplader med 5% hesteblood, Lot nr. 6770858, SSI
- Laktoseplade, Lot nr. 180313-01, Herlev Hospital
- Müller-Hinton agarplader uden blod (MH), lot nr. 180313-04
- Müller-Hinton agarplader med blod (MH-F), lot nr. 180315-12
- Sterilt 0,9% NaCl, VITLAB genius

ATCC-kontrolstammer:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Antibiotikadiscs, Oxoid:

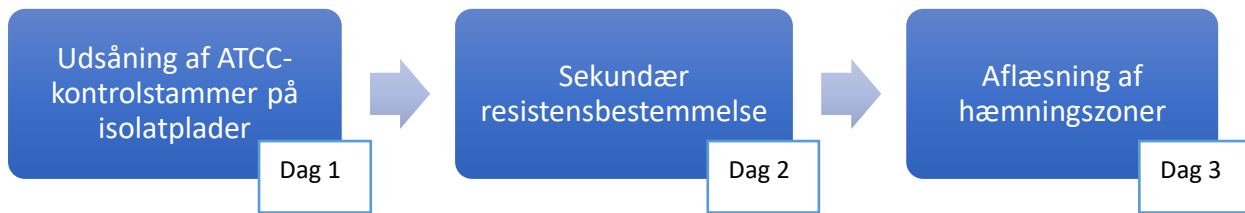
Antibiotikadispenser for grampositive bakterier

Antibiotikanavn	Disknavn
Oxacillin	OX1
Penicillin	P1
Cefoxitin	FOX30
Erythromycin	E15
Clindamycin	DA2
Ampicillin	AMP2
Rifampicin	RD5
Linezolid	LZD10
Moxifloxacin	MXF5
Gentamicin	CN30
Vancomycin	VA5

Antibiotikadispenser for gramnegative bakterier

Antibiotikanavn	Disknavn
Piperacillin+tazobactam	TZP36
Ceftazidim	CAZ10
Ciprofloxacin	CIP5
Meropenem	MEM10
Gentamicin	CN10
Trimethoprim+sulfamethizol	SXT25
Mecillinam	MEL10
Ampicillin	AMP10
Amoxicillin+clavulansyre	AMC30
Cefpodoxim	CDP10
Cefuroxim	CXM30
Temocillin	TEM30

2.2. Forsøgsdesign for kontroller



Figur 3. Viser flowdiagram for metoden til kontrolstammer.

2.2.1. Metode kontroller

Dag 1

De tre valgte ATCC-kontrolstammer blev taget fra KMA's frysedepot og var svarende til de kontrolstammer, som EUCAST anbefaler (12).

ATCC-kontrolstammerne *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pneumoniae* blev udsået manuelt med tretrinsspredning på en 5% blodplade. ATCC-kontrolstammen *Escherichia coli* blev udsået manuelt med tretrinsspredning på en laktoseplade. Pladerne blev inkuberet i almindelig atmosfærisk luft i 16-24 timer ved 37°C (4; 6).

Dag 2

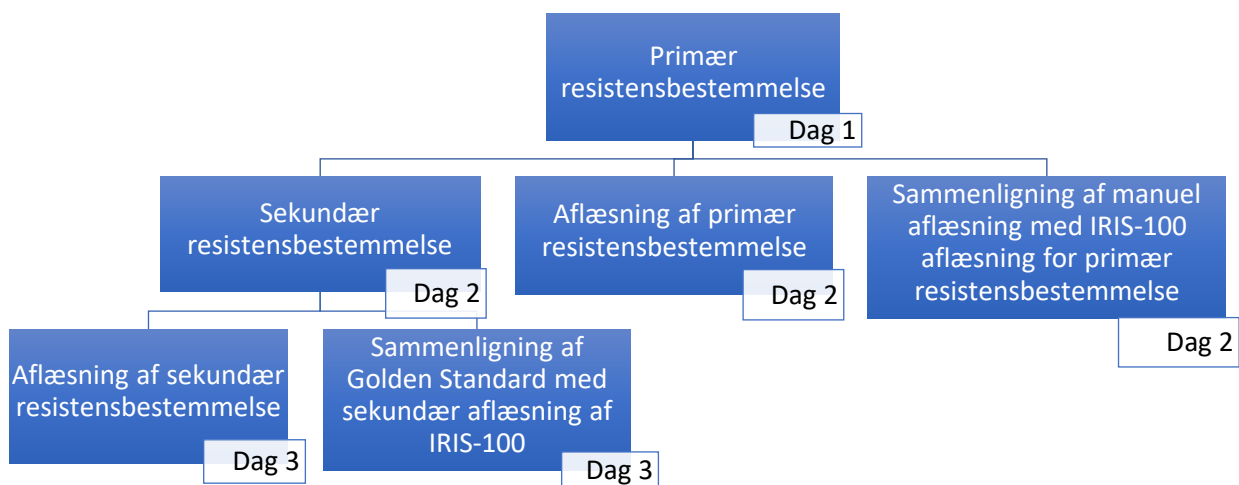
Der blev udført sekundær resistensbestemmelse i henhold til EUCAST (6). Sekundær resistensbestemmelse blev udført ved at tage materiale fra isolpladen fra den første dag, som blev opslæmmet i 2 ml 0,9% saltvand. Denne bakteriesuspension blev målt på et densimat og skulle have en McFarland-værdi mellem 0,4 - 0,6 (6).

For *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pneumoniae* blev der udsået 10µl af bakteriesuspension på en 5% blodplade ved hjælp af tretrinsspredning. For *Escherichia coli* blev der udsået 10µl af bakteriesuspension på en laktoseplade. Herefter blev en vatpind dyppet i bakteriesuspensionen, som blev totalspredt ved hjælp af pladeudsprederen (Retro 80C) på to MHA-plader, for *Staphylococcus aureus* og *Escherichia coli* og to MH-F plader for *Streptococcus pneumoniae*. Der blev herefter påsat henholdsvis grampositive og gramnegative antibiotikadisks på alle pladerne. Pladerne for *Staphylococcus aureus* og *Escherichia coli* blev inkuberet i almindelig atmosfærisk luft i 16-24 timer. *Streptococcus pneumoniae* blev inkuberet i 5% CO₂ (4; 6).

Dag 3

Hæmningszonerne blev aflæst manuelt ved brug af en lineal og på IRIS-100, hvorefter zonestørrelserne blev noteret. Størrelserne på hæmningszonerne blev vurderet efter range og target i henhold til EUCAST (7).

2.3. Forsøgsdesign for bloddyrkningsisolater



Figur 4. Viser flowdiagram for metoden til bloddyrkningsisolaterne.

2.3.1. Metode bloddyrkningsisolater

Dag 1

Identifikation og resistensbestemmelse denne dag blev udført i laboratoriet af bioanalytikere fra KMA.

Bloddyrkningsisolater blev modtaget på afdelingen, hvor de positive bloddyrkningsisolater blev identificeret ved hjælp af gramfarvning og MALDI-TOF. Ved gramfarvning og mikroskopi blev bakteriens morfologi og lejringsform bestemt, samt om bakterien var grampositiv eller gramnegativ. På MALDI-TOF blev bakteriearten bestemt (9).

Gramnegative kokker og små stave samt grampositive kokker og stave blev udsået med 1µL øjepodenål direkte fra kolben med tretrinsspredning på isolplader. En vatpind blev herefter dyppet direkte i bloddyrkningskolben og udsået på resistensplader med totalspredning (4; 9). Ved gramnegative store stave blev der taget 10µL blod med øjepodenål fra bloddyrkningskolben, som blev fortyndet i 2mL 0,9% saltvand. Herefter blev der taget 1µL af bakteriesuspensionen, som blev udsået med tretrinsspredning på isolplader. En vatpind blev herefter dyppet i suspensionen og udsået med totalspredning på resistensplader (4; 9). Efterfølgende blev der påsat antibiotika alt efter bakterien. Pladerne blev inkuberet i 16-24 timer ved 37°C i enten almindelig atmosfærisk luft eller 5% CO₂ (4; 6).

Tabel 2, side 16 viser hvilke isol- og resistensplader de forskellige bakterietyper udsås på (9).

Tabel 2. Viser plader til resistensbestemmelse (4).

	5% blodplade	Laktoseplade	Chokoladeplade	Resistensplade
Grampositive kokker i hobe	+	-	-	MH
Grampositive kokker i diplo og kæde	+	-	-	MH-F (i CO ₂)
Gramnegative kokker i diplo	+	-	+	MH-F (i CO ₂)
Gramnegative store stave	+	+	-	MH
Gramnegative små stave	+	+	+	MH-F (i CO ₂)
Grampositive stave	+	-	-	MH-F (i CO ₂)

Tabel 2. "+" er plader der medtages. "-" er plader der ikke medtages

Dag 2

Fra dag 2 og frem blev alt laboratoriearbejde udført af rapportens forfattere (to bioanalytikerstuderende).

Alle isolater blev tildelt et nyt nummer for at anonymisere patientdata - eks. SA1PB1+SE+0404_1. SA står for hvilken algoritme, der er benyttet i IRIS-100, 1 står for isolatnummer, P står for primær resistensbestemmelse, SE står for hvilken bakterie (*Staphylococcus epidermidis*) og 0404 står for isolaternes dato.

Den primære resistensbestemmelse blev aflæst manuelt og på IRIS-100. Ved den manuelle aflæsning, blev hæmningszonerne målt med en lineal og noteret i et regneark i enheden millimeter og efterfølgende SIR fortolket.

Ved IRIS-100 aflæsning blev resistenspladen sat ind i IRIS-100-aflæseren. I programmet, på den tilkoblede computer, blev der valgt den korrekte algoritme, alt efter arten.

Herefter blev der trykket start i programmet og IRIS-100 tog et billede af pladen, hvorefter hæmningszonerne blev vist på computeren. Det første billedet der blev taget blev forkastet grundet softwareopsætningen i IRIS-100. Der blev taget et nyt billede, hvor det var muligt at justere hæmningszonerne i programmet eller godkende forslaget fra IRIS-100. Herefter blev det tjekket om antibiotikadiskene, IRIS-100 havde foreslået, stemte overens med dem der var på pladen.

Til slut blev pladen navngivet og initialer tilføjet, hvorefter billedet med de målte hæmningszoner blev gemt i programmet. Resultatet af hæmningszonerne blev overført til et regneark og noteret i millimeter og SIR fortolket.

Sekundær resistensbestemmelse blev udført i henhold til EUCAST's retningslinjer (6). Her blev der taget materiale fra blodpladen fra den primære resistensbestemmelse, som blev opløst i 2 ml 0,9% saltvand. Bakteriesuspension blev målt med en McFarland-værdi mellem 0,4 - 0,6 (4; 6).

10 µL af bakteriesuspensionen blev udsået manuelt med tretrinsspredning, på en 5% blodplade for grampositive bakterier og en laktoseplade for gramnegative bakterier. Herefter blev en vatpind dyppet i bakteriesuspensionen og der blev udsået med totalspredning, ved hjælp af pladeudsprederen (Retro 80C), på to MH-plader for samtlige bakterier, med undtagelse af

Streptococcus sp. som blev udsået på to MH-F-plader. Herefter blev der påsat antibiotika og pladerne blev inkuberet ved 37°C i 16-24 timer i enten almindelig atmosfærisk luft eller 5% CO₂ (4; 6).

Dag 3

Den sekundære resistensbestemmelse blev aflæst manuelt og på IRIS-100 på samme måde som ved dag 2. Den manuelle sekundære resistensbestemmelse, i henhold til EUCAST's retningslinjer, benyttes som Golden Standard på KMA, Hvidovre Hospital (6).

2.4. Databearbejdning

Til at belyse afvigelser mellem IRIS-100 og Golden Standard anvendtes en beregningsmetode som beregner very major error (VME), major error (MAE) og minor error (MIE). Denne beregningsmetode beskrives blandt andet i følgende artikler; Breteler et al. (13) og Stokkou et al. (14). Udover at belyse afvigelser blev SIR-overensstemmelser mellem de to metoder også beregnet.

Afvigelser blev vurderet som very major error, hvis sensitiv ved IRIS-100 men resistent ved Golden Standard. Major error, hvis resistent ved IRIS-100 men sensitiv ved Golden Standard. Minor error, hvis intermediær ved IRIS-100 men sensitiv/resistent ved Golden Standard og omvendt (13). Fortolkningen af sensitive (S), intermediære (I) og resistente (R) isolater blev gjort i henhold til EUCAST breakpoints (7).

Ifølge EUCAST breakpoints er der visse antibiotika, som ikke skal SIR-fortolkes (7). Eksempelvis skal oxacillin ikke SIR-fortolkes for samtlige grampositive bakterier. Disse data er derfor ikke medtaget i databehandlingen.

2.4.1. Udregning af VME, MAE, MIE

Beregningsformlerne for VME, MAE og MIE er som følgende:

Til beregning af VME divideres det totale antal VME med det totale antal af resistente aflæsninger ved Golden Standard.

Formel: Totale antal af VME / totale antal af resistente aflæsninger ved Golden Standard

Til beregning af MAE divideres det totale antal af MAE med det totale antal af sensitive aflæsninger ved Golden Standard.

Formel: Totale antal af MAE / totale antal af sensitive aflæsninger ved Golden Standard

Til beregning af MIE divideres det totale antal af MIE med det totale antal aflæsninger ved Golden Standard.

Formel: Totale antal af MIE / totale antal aflæsninger ved Golden Standard

Der hvor der er overensstemmelse mellem IRIS-100 og Golden Standards SIR-fortolkning angives dette som "Total SIR overensstemmelse".

Formel: Totale antal af SIR-overensstemmelser mellem de to metoder / totale antal aflæsninger

Til beregning af total overensstemmelse i procent

Formel: Total antal overensstemmelser / total antal aflæsninger *100

Til beregning af totale afvigelser i procent

Formel: Total antal afvigelser / total antal aflæsninger *100

3. Resultater

Følgende afsnit viser de behandlede resultater for projektet samt resultater for kontrolstammerne. Til projekt blev der testet 70 isolater fra bloddyrkninger med 35 grampositive bakterier og 35 gramnegative bakterier. For de grampositive bakterier var der 25 *Staphylococcus sp.*, otte *Streptococcus sp.* og to *Enterococcus sp.* For de gramnegative bakterier var der 20 *Escherichia coli*, otte *Klebsiella sp.*, fire *Enterobacter sp.* samt tre øvrige arter. Yderligere blev der medtaget tre ATCC-kontrolstammer. Resultaterne er opdelt efter grampositive og gramnegative bakterier.

Følgende data er ikke medtaget i resultatbehandlingen.

Da IRIS-100 ikke har genkendt mecillinam for isolat nummer 2S,5S og 6S for den sekundære resistensbestemmelse for gramnegative bakterier, er disse data fra de manuelle aflæsninger ikke medtaget i databehandlingen. Dette gælder også for ampicillin og cefuroxim for isolat nummer 18P for den primære resistensbestemmelse for gramnegative bakterier, hvor data fra de manuelle aflæsninger ligeledes ikke er medtaget i databehandlingen.

Isolat nummer 3P for den primære resistensbestemmelse for gramnegative bakterier, har gjort at data for det pågældende IRIS-100 isolat ikke er medregnet. Dette grundet en fejl i den manuelle aflæsning.

En fejl i påsætning af antibiotika, hvorved at antibiotikummet ikke har kunnet diffundere korrekt ud i agarpladen, har gjort at resultaterne for SPK3 for erythromycin er ikke medtaget.

3.1. Kontroller

Tabel 3. Viser resultaterne for de tre kontroller: *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC49619) og for *Escherichia coli* ATCC 25922 ved brug af EUCAST breakpoints (12).

<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Streptococcus pneumoniae</i>					<i>Escherichia coli</i>						
Antibiotika	n	Middelværdi		EUCAST		n	Middelværdi		EUCAST		Antibiotika	n	Middelværdi		EUCAST	
		M	IM	Target	Range		M	IM	Target	Range			M	IM	Target	Range
Oxacillin	10	21	20	22	19-25	10	16	14	11	8-14	Piperacillin+tacobactam	10	26	25	24	21-27
Penicillin	10	15	13	-	-	10	21	19	-	-	Ceftazidim	10	28	26	26	23-29
Cefoxitin	10	27	26	27	24-30	10	26	24	-	-	Ciprofloxacin	10	36	33	33	29-37
Erythromycin	10	26	24	26	23-29	9	27	27	29	26-32	Meropenem	10	35	33	31-31	28-35
Clindamycin	10	26	25	26	23-29	10	24	24	25	22-28	Gentamicin	10	25	24	22-23	19-26
Ampicillin	9	16	15	18	15-21	9	28	28	28	25-31	Trimethoprim+sulfamethizol	10	27	26	26	23-29
Rifampicin	9	32	31	33	30-36	10	29	28	29	26-32	Mecillinam	10	28	28	27	24-30
Linezolid	9	24	23	24	21-27	10	27	26	26	23-29	Ampicillin	10	20	20	18-19	15-22
Moxifloxacin	9	29	27	28	25-31	10	27	26	27	24-30	Amoxicillin+clavulansyre	10	22	21	21	18-24
Gentamicin	9	26	24	22	19-25	10	16	16	-	-	Cefpodoxim	10	28	26	25-26	23-28
Vancomycin	9	14	13	-	-	10	20	19	20	17-23	Cefuroxim	10	25	23	23	20-26
											Temocillin	10	23	22	-	-

n = antal aflæsninger; M = manuel aflæsning målt i mm; IM = IRIS-100 aflæsning målt i mm; Target/range bestemt af EUCAST med enheden mm (12).

Tabel 3 viser middelværdien for hæmningszonerne målt i mm for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* og *Escherichia coli*.

Yderligere viser tabellen target og range som kontrollerne skal ligge inden for, i henhold til EUCAST breakpoints. For nogle antibiotika skal kontrollerne ikke ligge inden for et bestemt target og range i henhold til EUCAST (12). Dette gælder for penicillin og vancomycin for *Staphylococcus aureus*, penicillin, cefoxitin og gentamicin for *Streptococcus pneumoniae* og temocillin for *Escherichia coli*. Dette er markeret med "-".

3.2. Grampositive isolater

Tabel 4. Viser resultaterne for primær resistensbestemmelse for IRIS-100 (IM) sammenlignet med Golden Standard (GS) for grampositive bakterier, ved brug af EUCAST breakpoints (7).

Antibiotika	Total aflæsning	GS			IM vs. GS				Total SIR overensstemmelse		VME		MAE		MIE				Total SIR afvigelse							
	n	S	I	R	S→S	%	I→I	%	R→R	%	n	%	S→R	%	R→S	%	S→I	%	I→S	%	R→I	%	I→R	%	n	%
Penicillin	34	9	0	25	9	26,47	0	25	73,53	34	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Cefoxitin	28	25	0	3	20	71,43	0	3	10,71	23	82,14	0	4	16,00	0	1	3,57	0	0	0	0	0	0	5	19,57	
Erythromycin	35	24	0	11	17	48,57	0	11	31,43	28	80,00	0	2	8,33	0	5	14,29	0	0	0	0	0	0	7	22,62	
Clindamycin	35	27	0	8	19	54,29	0	8	22,86	27	77,14	0	3	11,11	0	5	14,29	0	0	0	0	0	0	8	25,40	
Ampicillin	10	9	0	1	9	90,00	0	1	10,00	10	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Rifampicin	33	33	0	0	29	87,88	0	0	0	29	87,88	0	1	3,03	0	3	9,09	0	0	0	0	0	0	4	12,12	
Linezolid	35	34	0	1	24	68,57	0	0	0	24	68,57	0	8	23,53	0	2	5,71	0	1	2,86	0	1	2,86	11	32,10	
Moxifloxacin	34	32	0	2	24	70,59	0	2	5,88	26	76,47	0	7	21,88	0	1	2,94	0	0	0	0	0	0	8	24,82	
Gentamicin	2	1	0	1	1	50,00	0	1	50,00	2	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Vancomycin	25	25	0	0	21	84,00	0	0	0	21	84,00	0	0	0	0	4	16,00	0	0	0	0	0	0	4	16,00	
Total	271	219	0	52	173		0	51		224	82,66	0	25		0	21		0	0		0	0		47	17,34	

n = antal isolater; S = sensitiv; I = Intermediær; R = resistent; GS = Golden Standard; IM = IRIS-100; VME = very major error; MAE = major error; MIE = minor error.

I Tabel 4 ses resultaterne for primær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard for de grampositive bakterier. Her ses de pågældende antibiotika, der er brugt til de grampositive bakterier samt SIR-vurderingen for Golden Standard. SIR-overensstemmelser mellem de to metoder er målt i antal og procent. Yderligere ses hvor mange VME, MAE og MIE afvigelser der er for de gældende antibiotika samt den totale SIR-afvigelse. Rækker markeret med mørkeblå, er der hvor der ses flest afvigelser. Ud af disse afvigelser ses flest for *Staphylococcus aureus*. Sidste række i Tabel 4 viser det totale antal af aflæsninger, overensstemmelser og afvigelser.

Tabel 5. Viser resultaterne for **sekundær** resistensbestemmelse for IRIS-100 (IM) sammenlignet med Golden Standard (GS) for grampositive bakterier, ved brug af EUCAST breakpoints (7).

Antibiotika	Total aflæsning	GS			IM vs. GS				Total SIR overensstemmelse		VME		MAE		MIE				Total SIR afvigelse							
	n	S	I	R	S→S	%	I→I	%	R→R	%	n	%	S→R	%	R→S	%	S→I	%	I→S	%	R→I	%	I→R	%	n	%
Penicillin	34	10	0	24	10	29,41	0	24	70,59	34	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Cefoxitin	28	25	0	3	25	89,29	0	3	10,71	28	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Erythromycin	35	24	0	11	23	65,71	0	11	31,43	34	97,14	0	0	0	1	2,86	0	0	1	2,86	0	0	0	1	2,86	
Clindamycin	34	26	0	8	24	70,59	0	8	23,53	32	94,12	0	0	0	2	5,88	0	0	2	5,88	0	0	0	2	5,88	
Ampicillin	10	9	0	1	9	90,00	0	1	10,00	10	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Rifampicin	34	33	0	1	33	97,06	0	1	2,94	34	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Linezolid	35	34	0	1	34	97,14	0	1	2,86	35	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Moxifloxacin	34	32	0	2	32	94,12	0	2	5,88	34	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Gentamicin	2	1	0	1	1	50,00	0	1	50,00	2	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Vancomycin	25	25	0	0	25	100,0	0	0	0	25	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
										Total overensstemmelse															Total afvigelse	
Total	271	219	0	52	216		0	52		268	98,89	0	0	0	3		0	0	3		0	0	3	1,11		

n = antal isolater; S = sensitiv; I = Intermediær; R = resistent; GS = Golden Standard; IM = IRIS-100; VME = very major error; MAE = major error; MIE = minor error.

I Tabel 5 ses resultaterne for sekundær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard for de grampositive bakterier. Her ses de pågældende antibiotika, der er brugt til de grampositive bakterier samt SIR-vurderingen for Golden Standard. SIR-overensstemmelser mellem de to metoder er målt i antal og procent. Yderligere ses hvor mange VME, MAE og MIE afvigelser der er for de gældende antibiotika samt den totale SIR-afvigelse. Rækker markeret med mørkeblå, er der hvor der ses flest afvigelser. Ud af de tre afvigelser ses to afvigelser for *Staphylococcus aureus* og en for *Enterococcus faecalis*. Sidste række i Tabel 5 viser det totale antal af aflæsninger, overensstemmelser og afvigelser.

Tabel 6. Viser resultaterne for **primær manuel** resistensbestemmelse (PM) sammenlignet med Golden Standard (GS) for grampositive bakterier, ved brug af EUCAST breakpoint (7).

Antibiotika	Total aflæsning	Manuel aflæsning			PM vs. GS				Total SIR overensstemmelse		VME		MAE		MIE				Total SIR afvigelse							
	n	S	I	R	S→S	%	I→I	%	R→R	%	n	%	S→R	%	R→S	%	S→I	%	I→S	%	R→I	%	I→R	%	n	%
Penicillin	34	9	0	25	9	26,47	0		25	73,53	34	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Cefoxitin	28	25	0	3	22	78,57	0		3	10,71	25	89,29	0	2	8,00	0	1	3,57	0	0	0	0	0	3	11,57	
Erythromycin	35	24	0	11	19	54,29	0		11	31,43	30	85,71	0	1	4,17	0	4	11,43	0	0	0	0	0	5	15,60	
Clindamycin	35	27	0	8	25	71,43	0		8	22,86	33	94,29	0	0	0,00	0	2	5,71	0	0	0	0	0	2	5,71	
Ampicillin	10	9	0	1	9	90,00	0		1	10,00	10	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Rifampicin	34	33	0	1	32	94,12	0		1	2,94	33	97,06	0	0	0	0	1	2,94	0	0	0	0	0	1	2,94	
Linezolid	34	33	0	0	28	82,35	0		0	0	28	82,35	0	3	9,09	0	2	5,88	0	0	0	0	0	5	14,97	
Moxifloxacin	34	32	0	2	25	73,53	0		2	5,88	27	79,41	0	4	12,50	0	3	8,82	0	0	0	0	0	7	21,32	
Gentamicin	2	1	0	1	1	50,00	0		1	50,00	2	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	
Vancomycin	25	25	0	0	24	96,00	0		0	0	24	96,00	0	0	0	0	1	4,00	0	0	0	0	0	1	4,00	
											Total overensstemmelse														Total afvigelse	
Total	271	218	0	52	194	0	52	246	90,77	0	10	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	8,86	

n = antal isolater; S = sensitiv; I = Intermediær; R = resistent; GS = Golden Standard; PM = Primær manuel aflæsning; VME = very major error; MAE = major error; MIE = minor error.

I Tabel 6 ses resultaterne for primær manuel resistensbestemmelse sammenlignet med Golden Standard for de grampositive bakterier. Her ses de pågældende antibiotika, der er brugt til de grampositive bakterier samt SIR-vurderingen for Golden Standard. SIR-overensstemmelser mellem de to metoder er målt i antal og procent. Yderligere ses hvor mange VME, MAE og MIE afvigelser der er for de gældende antibiotika samt den totale SIR-afvigelse. Rækker markeret med mørkeblå, er der hvor der ses flest afvigelser. Ud af disse afvigelser ses flest for *Staphylococcus aureus*. Sidste række i Tabel 6 viser det totale antal af aflæsninger, overensstemmelser og afvigelser.

3.3. Gramnegative isolater

Tabel 7. Viser resultaterne for **primær** resistensbestemmelse IRIS-100 (IM) sammenlignet med Golden Standard (GS) for gramnegative bakterier, ved brug af EUCAST breakpoints (7).

Antibiotika	Total aflæsning	GS			IM vs. GS				Total SIR overensstemmelse		VME		MAE		MIE				Total SIR afvigelse							
	n	S	I	R	S→S	%	I→I	%	R→R	%	n	%	S→R	%	R→S	%	S→I	%	I→S	%	R→I	%	I→R	%	n	%
Piperacillin-tazobactam	35	33	1	1	33	94,29	0		1	2,86	34	97,14	0	0		1	2,86	0	0	0	0	0	0	0	1	2,86
Ceftazidime	35	32	1	2	32	91,43	1	2,86	2	5,71	35	100,00	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Ciprofloxacin	35	29	0	6	29	82,86	0		5	14,29	34	97,14	0	1	3,45	0		0	0	0	0	0	0	1	3,45	
Meropenem	35	35	0	0	35	100,0	0		0		35	100,00	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Gentamicin	34	31	1	2	31	91,18	1	2,94	2	5,88	34	100,00	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Trimethoprim-sulfamethoxazole	35	25	0	10	25	71,43	0		10	28,57	35	100,00	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Mecillinam	34	27	1	6	27	79,41	0		6	17,65	33	97,06	0	0		1	2,94	0	0	0	0	0	0	1	2,94	
Ampicillin	34	15	1	18	14	41,18	0		18	52,94	32	94,12	0	1	6,67	0		0	0	1	2,94	0	0	2	9,61	
Amoxicillin-clavulansyre	35	26	1	8	26	74,29	0		8	22,86	34	97,14	0	0		0		0	0	1	2,86	0	0	1	2,86	
Cefpodoxime	34	29	1	4	29	85,29	1	2,94	4	11,76	34	100,00	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Cefuroxime	34	30	0	4	29	85,29	0		4	11,76	33	97,06	0	0		0		1	2,94	0	0	0	0	1	2,94	
Temocillin	33	32	0	1	32	96,97	0		1	3,03	33	100,00	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
											Total overensstemmelse														Total afvigelse	
Total	413	344	7	62	342		3		61		406	98,31	0	2		2		1		2		0		7	1,69	

n = antal isolater; S = sensitiv; I = Intermediær; R = resistent; GS = Golden Standard; IM = IRIS-100; VME = very major error; MAE = major error; MIE = minor error.

I Tabel 7 ses resultaterne for primær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard for de gramnegative bakterier. Her ses de pågældende antibiotika, der er brugt til de gramnegative bakterier samt SIR-vurderingen for Golden Standard. SIR-overensstemmelser mellem de to metoder er målt i antal og procent. Yderligere ses hvor mange VME, MAE og MIE afvigelser der er for de gældende antibiotika samt den totale SIR-afvigelse. Rækken markeret med mørkeblå, er der hvor der ses flest afvigelser. Der ses flest afvigelser for ampicillin, hvoraf den ene afvigelse er for *Escherichia coli* og den anden for *Klebsiella pneumoniae*. Sidste række i Tabel 7 viser det totale antal af aflæsninger, overensstemmelser og afvigelser.

Tabel 8. Viser resultaterne for **sekundær** resistensbestemmelse for IRIS-100 (IM) sammenlignet med Golden Standard (GS) for gramnegative bakterier, ved brug af EUCAST breakpoints (7).

Antibiotika	Total aflæsning	GS			IM vs. GS				Total SIR overensstemmelse		VME		MAE		MIE				Total SIR afvigelse							
	n	S	I	R	S→S	%	I→I	%	R→R	%	n	%	S→R	%	R→S	%	S→I	%	I→S	%	R→I	%	I→R	%	n	%
Piperacillin-tazobactam	35	33	1	1	31	88,57	1	2,86	1	2,86	33	94,29	0	0	0	0	0	0	2	5,71	0	0	0	0	2	5,71
Ceftazidime	35	32	1	2	31	88,57	1	2,86	2	5,71	34	97,14	0	0	0	0	1	2,86	0	0	0	0	0	0	1	2,86
Ciprofloxacin	35	29	0	6	29	82,86	0	0	4	11,43	33	94,29	1	16,67	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,86	2	19,52
Meropenem	35	35	0	0	35	100,0	0	0	0	0	35	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Gentamicin	34	31	1	2	31	91,18	0	0	2	5,88	33	97,06	0	0	0	0	1	2,94	0	0	0	0	0	1	2,94	
Trimethoprim-sulfamethoxazole	35	25	0	10	25	71,43	0	0	10	28,57	35	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Mecillinam	32	27	1	4	27	84,38	0	0	4	12,50	31	96,88	0	0	0	0	1	3,13	0	0	0	0	0	1	3,13	
Ampicillin	35	15	1	19	14	40,00	0	0	19	54,29	33	94,29	0	0	1	6,67	0	0	0	0	1	2,86	0	0	2	9,52
Amoxicillin-clavulansyre	35	26	1	8	23	65,71	0	0	8	22,86	31	88,57	0	0	1	3,85	0	0	2	5,71	1	2,86	0	0	4	12,42
Cefpodoxime	34	29	1	4	28	82,35	0	0	4	11,76	32	94,12	0	0	0	0	1	2,94	1	2,94	1	2,94	0	0	2	5,88
Cefuroxime	35	30	0	5	26	74,29	0	0	5	14,29	31	88,57	0	0	0	0	4	11,43	0	0	0	0	0	0	4	11,43
Temocillin	34	32	0	2	32	94,12	0	0	2	5,88	34	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
											Total overensstemmelse														Total afvigelse	
Total	414	344	7	63	332		2		61		395	95,41	1		2		2		10		3		1		19	4,59

n = antal isolater; S = sensitiv; I = Intermediær; R = resistent; GS = Golden Standard; IM = IRIS-100; VME = very major error; MAE = major error; MIE = minor error.

I Tabel 8 ses resultaterne for sekundær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard for de gramnegative bakterier. Her ses de pågældende antibiotika, der er brugt til de gramnegative bakterier samt SIR-vurderingen for Golden Standard. SIR-overensstemmelser mellem de to metoder er målt i antal og procent. Yderligere ses hvor mange VME, MAE og MIE afvigelser der er for de gældende antibiotika samt den totale SIR-afvigelse. Rækker markeret med mørkeblå, er der hvor der ses flest afvigelser samt en very major error. Ud af disse afvigelser ses flest for *Escherichia coli*. Sidste række i Tabel 8 viser det totale antal af aflæsninger, overensstemmelser og afvigelser.

Tabel 9. Viser resultaterne for **primær manuel** resistensbestemmelse (PM) sammenlignet med Golden Standard (GS) for gramnegative bakterier ved brug af EUCAST breakpoints (7).

Antibiotika	Total aflæsning			Manuel						PM vs. GS				Total SIR overensstemmelse		VME		MAE		MIE				Total SIR afvigelse		
	n	S	I	R	S→S	%	I→I	%	R→R	%	n	%	S→R	%	R→S	%	S→I	%	I→S	%	R→I	%	I→R	%	n	%
Piperacillin-tazobactam	35	33	1	1	33	94,29	0		1	2,86	34	97,14	0	0	0	0	1	2,86	0	0	0	0	0	0	1	2,86
Ceftazidime	35	32	1	2	31	88,57	1	2,86	2	5,71	34	97,14	0	0	1	2,86	0	0	0	0	0	0	0	1	2,86	
Ciprofloxacin	35	29	0	6	29	82,86	0		5	14,29	34	97,14	1	16,67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16,67	
Meropenem	35	35	0	0	35	100,0	0		0		35	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Gentamicin	34	31	1	2	31	91,18	1	2,94	2	5,88	34	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Trimethoprim-sulfamethoxazole	34	25	0	9	25	73,53	0		9	26,47	34	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
Mecillinam	34	27	1	6	27	79,41	0		6	17,65	33	97,06	0	0	1	2,94	0	0	0	0	0	0	0	1	2,94	
Ampicillin	34	15	1	18	14	41,18	0		17	50,00	31	91,18	0	1	2,94	0	0	1	2,94	1	2,94	1	2,94	3	8,82	
Amoxicillin-clavulansyre	34	25	1	8	25	73,53	0		8	23,53	33	97,06	0	0	0	0	0	1	2,94	0	0	0	0	1	2,94	
Cefpodoxime	34	29	1	4	29	85,29	0		4	11,76	33	97,06	0	0	1	2,94	0	0	0	0	0	0	0	1	2,94	
Cefuroxime	34	29	0	5	28	82,35	0		5	14,71	33	97,06	0	1	2,94	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,94	
Temocillin	32	31	0	1	31	96,88	0		1	3,13	32	100,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
				</																						

Tabel 10. Viser samlet antal VME, MAE og MIE for alle grampositive aflæsninger.

	VME		MAE		MIE	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Primær res. IRIS-100 vs. Golden Standard	0		25	11,42	21	7,75
Sekundær res. IRIS-100 vs. Golden Standard	0		0		3	1,11
Primær res. Manuel vs. Golden Standard	0		10	4,59	14	5,17

n = antal isolater; VME = very major error; MAE = major error; MIE = minor error.

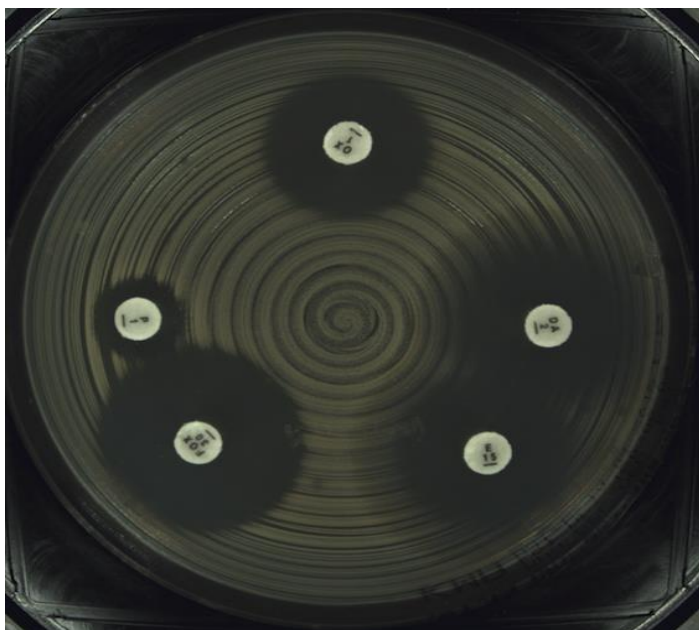
I Tabel 10 ses resultaterne for de samlede antal VME, MAE og MIE for alle grampositive bakterier.

Tabel 11. Viser samlet antal VME, MAE og MIE for alle gramnegative aflæsninger.

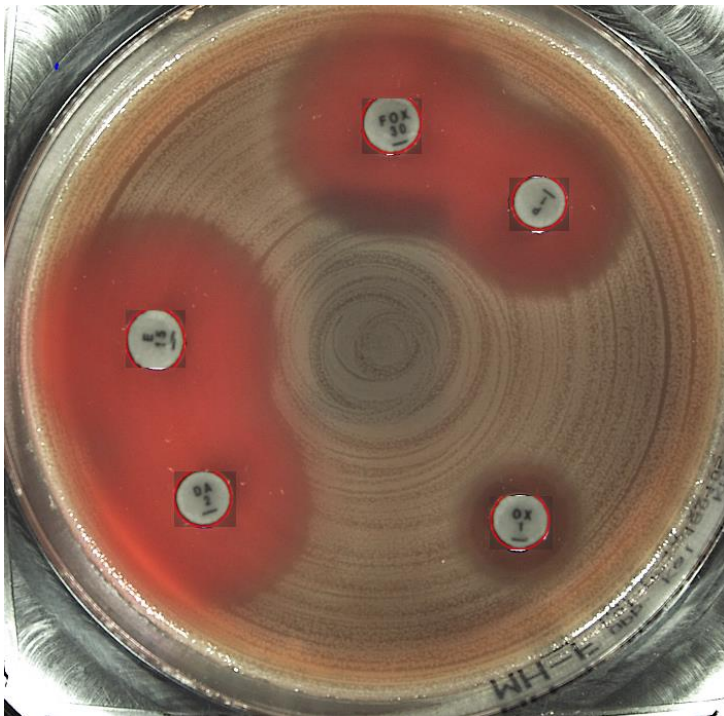
	VME		MAE		MIE	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Primær res. IRIS-100 vs. Golden Standard	0		2	0,58	5	1,2
Sekundær res. IRIS-100 vs. Golden Standard	1	1,59	2	0,58	16	3,9
Primær res. Manuel vs. Golden Standard	1	1,61	3	0,88	6	1,5

n = antal isolater; VME = very major error; MAE = major error; MIE = minor error.

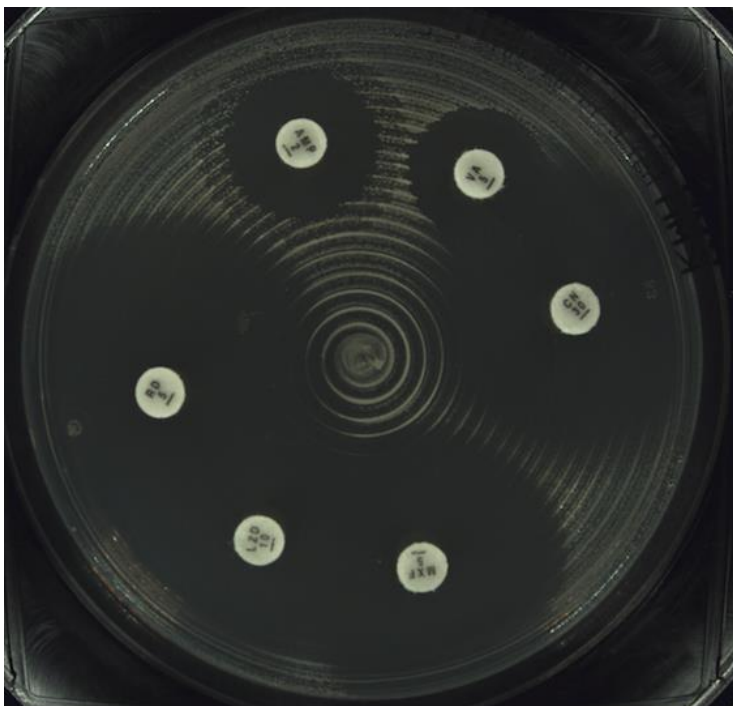
I Tabel 11 ses resultaterne for de samlede antal VME, MAE og MIE for alle gramnegative bakterier.



Figur 5 (eget foto). Isolat 3P (*Staphylococcus aureus*). Figuren viser hæmningszoner med uklare/dobbelt zonegrænser for clindamycin og erythromycin.



Figur 6 (eget foto). Isolat 5K (*Streptococcus pneumoniae*). Figuren viser hæmningszoner der har dannet α -hæmolyse.



Figur 7 (eget foto). Isolat 33P (*Staphylococcus aureus*). Figuren viser store hæmningszoner for rifampicin, linezolid og moxifloxacin.

4. Diskussion

Formålet med dette projekt var at sammenligne semi-automatisk aflæsning ved IRIS-100 med manuel aflæsning af størrelsen af hæmningszoner ved diskdiffusion. Her blev der testet 70 isolater fra bloddyrkninger, hvor der ud af disse var 35 grampositive og 35 gramnegative bakterier. For at understøtte validiteten og reliabiliteten af forsøget, blev der medtaget tre ATCC-kontrolstammer; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 og *Escherichia coli* ATCC 25922.

Resultaterne af hæmningszonerne blev målt i mm og SIR-fortolket, hvor det blev angivet hvor mange very major errors, major errors og minor errors der var mellem de to aflæsningsmetoder. I følgende afsnit diskuteres kontrolresultaterne, efterfulgt af resultaterne fra hæmningszonerne, hvor afvigelser og overensstemmelser diskuteres samt IRIS-100 vurderes.

4.1. Kontroller

I Tabel 3 side 21 ses middelværdien samt EUCAST target og range for de tre kontrolstammer *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 og *Escherichia coli* ATCC 25922 (12). I bilag 1 side 47 ses alle de målte værdier for kontrolstammerne.

For *Staphylococcus aureus* ligger middelværdien for både IRIS-100 aflæsningerne og de manuelle aflæsninger alle inden for EUCAST range, med undtagelse af gentamicin. For gentamicin er middelværdien for den manuelle aflæsning på 26 mm, hvor EUCAST range er mellem 19-25 (12). Dette er en afvigelse på 1 mm, som højst sandsynligt skyldes en aflæsningsfejl, grundet dobbeltzoner. Ved dobbeltzoner er det den inderste zonegrænse der aflæses - der hvor der er 100% hæmning af bakterien. Det er ikke ualmindeligt, at *Staphylococcus aureus* danner uklare zonegrænser, som kan være med til at vanskeliggøre aflæsningen, hvilket ses i Figur 5 på side 28 (11).

Ved manuel aflæsning var det vanskeligt at måle dobbeltzoner, da det ikke med sikkerhed kunne bestemmes om det var den inderste zonegrænse, der blev målt på begge sider af antibiotikadisken. Derimod gjorde lysopsætningen på IRIS-100, at der var en højere kontrast mellem hæmningszonerne og baggrunden, således at zonerne fremstod tydeligere og blev nemmere at måle.

For *Streptococcus pneumoniae* er middelværdien både for IRIS-100 og de manuelle aflæsninger inden for EUCAST range, med undtagelse af oxacillin. Middelværdien for oxacillin ligger 2 mm over EUCAST range for manuel aflæsning, som er på 8-14 mm (12). Dette kan skyldes at *Streptococcus pneumoniae* kan danne α -hæmolyse, som ses i Figur 6 på side 29. α -hæmolyse kan være vanskeligt at aflæse, da det er zonegrænsen for bakterien der skal aflæses og ikke zonegrænsen for α -hæmolysen (11).

Til behandling af patienten kan det have stor betydning at α -hæmolyse aflæses korrekt i forhold til antibiotikavalg. Aflæses hæmolysegrænsen i stedet for vil det betyde, at hæmningszonen vil blive målt højere og dermed påvirke SIR-fortolkningen. Ligesom ved dobbeltzoner var det nemmere at aflæse α -hæmolyse på IRIS-100 grundet en større kontrast mellem baggrunden og agarpladen.

For *Escherichia coli* ligger middelværdien for alle antibiotika for både IRIS-100 og den manuelle aflæsning indenfor EUCAST range (12).

For *Escherichia coli* kontrollen var der et større range end der var for de to andre kontroller.

Dette ses for blandt andet ciprofloxacin og meropenem der har en range på 8mm og 7mm, hvorimod EUCAST range for de grampositive bakteriers antibiotika har en range på 6mm.

Et større range for de gramnegative aflæsninger kan skyldes, at de to antibiotika danner større hæmningszoner og dermed ses et større range. Større hæmningszoner kan være sværere at aflæse, da det ikke altid er muligt at måle diameteren og det derfor er nødvendigt at måle radius. En fejlkilde ved at måle radius er, at måles der 1mm for meget/lidt i radius, bliver det 2mm mere/mindre i diameteren – og dermed en fejlkilde i forhold til korrekt medicinering af patienten.

Når kontrollerne ligger inden for range betyder det, at de faktorer der har indflydelse på hæmningszonerne ved følsomhedsbestemmelse er overholdt. Disse faktorer kan være inkokulum, inkubationstid, inkubationstemperatur, højden pladerne er stablet under inkubation, korrekt mængde antibiotika, tykkelsen på agarpladen samt overholdelse af 15-15-15 reglen (15).

Eftersom resultaterne for kontrollerne ligger inden for range betyder det, at der er en høj reliabilitet og validitet og dermed muligt, at gentage projekts forsøg og teoretisk set få de samme resultater for de samme isolater, som blev benyttet til dette projekt.

4.2. Grampositive bakterier

I følgende afsnit diskuteres der hvor mange very major errors, major errors og minor errors der er registreret for de grampositive bakterier.

4.2.1. Primær resistensbestemmelse ved IRIS-100 vs. Golden Standard

I Tabel 4 side 22 ses resultaterne for primær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard for grampositive bakterier. Der blev i alt aflæst 271 hæmningszoner, hvor der er 224 overensstemmelser mellem IRIS-100 og Golden Standard og 47 afvigelser. Ud af de 47 afvigelser er der 25 major errors og 21 minor errors.

Resultaterne for Tabel 4 viser en total overensstemmelse på 82,66%, hvilket er under kriteriet på 90% ifølge Jorgensen. Major errors og minor errors afviger tilsammen 17,34% hvilket er langt over de 7% (16).

Ifølge Thornsberry et al. (14) skal der være en total overensstemmelse mellem testmetoden (IRIS-100) og referencemetoden (Golden Standard) på over 90%, samtidig med at very major errors og major errors tilsammen ikke må afvige mere end 5% (14).

Yderligere mener Jorgensen (16), at den totale overensstemmelse mellem testmetoden og referencemetoden skal være over 90%, samtidig med at very major errors ikke må afvige mere end 3% og major errors og minor errors tilsammen ikke må afvige mere end 7% (16). Til at vurdere antallet af afvigelser tages der udgangspunkt i Jorgensen, da disse kriterier er modificeret kriterier fra Thornsberry et al. og dermed er nyere og mere specifikke kriterier (14; 16).

En af grundene til de høje afvigelser mellem IRIS-100 og Golden Standard kan være, at det er to forskellige udsåningsmetoder der blev sammenlignet. IRIS-100 er aflæst fra den primære resistensbestemmelse, mens Golden Standard er aflæst fra den sekundære resistensbestemmelse. Den sekundære resistensbestemmelse er udført i henhold til EUCAST retningslinjer, hvor der er et bestemt inokulum på agarpladen (6). For den primære resistensbestemmelse er inokulum ukendt, da der udsås direkte fra bloddyrkningskolben på agarpladen. Dette giver forskellige mængder materiale på de enkelte agarplader, så det vides ikke hvor stor en kolonitæthed, der er på agarpladen. Et for højt inokulum kan betyde at hæmningszonerne bliver mindre end hvad de reelt er, idet antibiotikaet vil have sværere ved at hæmme bakterievæksten.

Et for lavt inokulum giver større afstand mellem bakteriekolonierne og gør at hæmningszonerne fremstår større end hvad de reelt er (2).

4.2.2. Sekundær resistensbestemmelse ved IRIS-100 vs. Golden Standard

I Tabel 5 side 23 ses resultaterne for sekundær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard for grampositive bakterier. Der er i alt aflæst 271 hæmningszoner, hvoraf der er 268 overensstemmelser og 3 afvigelser. Ud af disse afvigelser er der 3 minor errors.

Dette giver en total overensstemmelse på 98,89%, som er indenfor Jorgensens kriterium, hvor de samlede overensstemmelser skal være på mindst 90% (16). Samtidig opfylder antallet af major errors og minor errors også kriteriet, da disse tilsammen giver 1,11%, hvilket er under kravet på 7% (16).

Den høje overensstemmelse kan skyldes, at der er et bestemt inokulum for alle isolater, da alle isolater er udført ved sekundær resistensbestemmelse i henhold til EUCAST (6). Herved er det kontrolleret, at der er en bestemt bakteriemængde for hvert isolat på agarpladerne.

De tre afvigelser er for isolat nummer 3S og 4S (*Staphylococcus aureus*) for clindamycin og isolat nummer 35S (*Enterococcus faecalis*) for erythromycin. Disse afvigelser kan skyldes, at der er dannet dobbeltzoner rundt om antibiotikadiskene, som har gjort det vanskeligere at aflæse størrelsen af hæmningszonerne. Ved dobbeltzonedannelse er det den inderste zonegrænse der skal aflæses, altså der hvor antibiotikummet har hæmmet bakterien 100% (11).

4.2.3. Primær manuel resistensbestemmelse vs. Golden Standard

I Tabel 6 side 24 ses resultaterne for primær manuel resistensbestemmelse sammenlignet med Golden Standard for grampositive bakterier. Her er der i alt aflæst 272 hæmningszoner, hvor der er 246 overensstemmelser og 24 afvigelser. Ud af disse afvigelser er der 10 major errors og 14 minor errors.

Der er en total overensstemmelse på 90,77% hvilket netop opfylder Jorgensens kriterium (16). De 10 major errors og de 15 minor errors udgør tilsammen 8,86%, som overstiger de 7% tilladte (16). 13 af afvigelseerne ses ved linezolid og moxifloxacin, hvoraf 9 af disse afvigelser er for *Staphylococcus aureus* og *Staphylococcus epidermidis*. Disse to antibiotika danner ofte store hæmningszoner, som kan vanskeliggøre aflæsningen da radiussen måles og ikke diameteren.

4.2.4. Samlet diskussion for de grampositive bakterier

Gældende for alle de grampositive bakterier er, at der ses flest afvigelser ved antibiotikadiskene; erythromycin, clindamycin, linezolid og moxifloxacin. Hvis de fire antibiotikadisk blev ekskluderet i resultaterne, ville der for eksempel ved den primære resistensbestemmelse for IRIS-100 vs. Golden Standard (Tabel 4) være 13 afvigelser i stedet for de 47 afvigelser, da 35 af afvigelseerne er for de fire antibiotika. Grunden til afvigelseerne for de fire antibiotikadisk, er at hæmningszonerne har været udfordrende at aflæse.

Ved 10 ud af 26 *Staphylococcus sp.* isolater var der dannet dobbeltzoner rundt om clindamycin og erythromycin. Disse dobbeltzoner har gjort aflæsningen vanskeligere, da det er den inderste zonegrænse der skal aflæses. Ved forsøget blev det fundet nemmere at aflæse isolater med dobbeltzoner på IRIS-100, på grund af lysopsætningen, hvor zonegrænserne fremstod tydeligere, i modsætning til den manuelle aflæsning.

Ifølge Fiebelkorn et al. (17) som undersøgte clindamycinresistens ved diskdiffusionsmetoden for *Staphylococcus sp.*, blev der ligeledes dannet dobbeltzoner eller uklare zonegrænser for størstedelen af forsøgets *Staphylococcus aureus* isolater (17).

Som det ses i Figur 7 side 29, danner både moxifloxacin og linezolid store hæmningszoner samt hæmningszoner, der ikke har en afgrænset kant. Dette kan være svært at aflæse og grunden til at der er opstået afvigelser.

Hamilton-Miller et al. (18) har foretaget et forsøg hvor linezolid blev følsomhedsbestemt ved både diskdiffusion og MIC (mindst hæmmende koncentration) ud fra CLSI og BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) retningslinjer for følsomhedsbestemmelse (18). Hamilton-Miller et al. har ligeledes observeret at linezolid danner store hæmningszoner ved diskdiffusion. Desuden blev hæmningszonerne målt større ved diskdiffusionsmetoden i henhold til BSAC retningslinjer end ved CLSI retningslinjer. Ved måling af MIC blev det modsat observeret, at resultaterne blev målt til samme MIC-værdi for begge retningslinjer (18). Hamilton-Miller et al. påpeger derfor at MIC er bedre end diskdiffusion til følsomhedsbestemmelse af linezolid, på grund af de store hæmningszoner ved diskdiffusionsmetoden (18).

Afvigelserne for linezolid kan også skyldes at antibiotikummet ligger mellem moxifloxacin og

rifampicin, der begge danner store hæmningszoner. Derfor har det oftest ikke været muligt at måle diameteren, hvorved radius er blevet målt. Måles radius i stedet for diameter kan det give den fejl, at hvis der måles 1mm for meget i radius, bliver dette 2mm for meget i diameter.

Dette har betydning for SIR-fortolkningen hvis EUCAST breakpoints ligger tæt på hinanden for de givne antibiotika. Breakpoints for SIR-fortolkningen for linezolid og moxifloxacin, for *Staphylococcus sp.*, adskilles med 1mm. En målefejl hvor zonestørrelsen ligger tæt på breakpoint vil derfor have betydning for SIR-fortolkningen og kan have en betydning for patienten samt behandlingsmulighederne. Eksempelvis vil afvigelser for linezolid have betydning for patienten, da antibiotikummet bruges til MRSA-behandling til de indlagte patienter (19).

Ifølge Pletz et al. (20) kan moxifloxacin anvendes i samspil med beta-laktamantibiotika til behandling af patienter med sepsis (20). Hvis der behandles efter de 11 major errors der blev noteret for moxifloxacin, for de grampositive bakterier vil dette mindske patientens behandlingsmuligheder. Patientens behandlingsmuligheder vil blive mindsket da bakterien bliver fortolket som resistent for moxifloxacin i testmetoden, men er sensitiv i referencemetoden, hvorved moxifloxacin ikke vil kunne bruges til behandling af sepsis (20).

Kriteriet om at der skal være en total overensstemmelse mellem de to metoder på over 90% ifølge Jorgensen, stemmer overens med den samlede overensstemmelse i Tabel 5 og 6, som er på henholdsvis 98,89% og 90,77% (16).

I Tabel 4 side 22 stemmer procenten ikke overens med kriteriet, da den samlede overensstemmelse er på 82,66% (16). Årsagen til den høje afvigelse i Tabel 4, kan skyldes at størrelsen på hæmningszonerne har været vanskelige at aflæse grundet dobbeltzoner, store hæmningszoner samt α -hæmolyse. En anden årsag til afvigelserne kan være det forskellige inokulum mellem den primære resistensbestemmelse og Golden Standard.

4.3. Gramnegative bakterier

I følgende afsnit diskuteres hvor mange very major errors, major errors og minor errors der er for de gramnegative bakterier.

4.3.1. Primær resistensbestemmelse ved IRIS-100 vs. Golden Standard

I Tabel 7 side 25 ses resultaterne for primær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard for gramnegative bakterier. Her er der aflæst 413 hæmningszoner, hvor der er 406 overensstemmelser og 7 afvigelser. Ud af disse afvigelser er der 2 major errors og 5 minor errors.

Den totale overensstemmelse udgør 98,36%, hvilket er over kriteriet på de 90% ifølge Jorgensen (16). Antallet af major errors og minor errors udgør tilsammen 1,69%, hvilket er under de 7% som er kriteriet når der sammenlignes en testmetode med en referencemetode (16).

I modsætning til de grampositive resultater, hvor der ses flest afvigelser ved sammenligning af primær resistensbestemmelse ved IRIS-100 og Golden Standard, ses der i Tabel 7 en høj overensstemmelse. Grunden til den høje overensstemmelse kan skyldes at de gramnegative isolater fra dette forsøg ofte dannede skarpe og afgrænsede hæmningszoner. Dette gjorde det nemmere at aflæse hæmningszonerne i modsætning til de grampositive isolater, hvor mikroorganismen oftere dannede dobbeltzoner samt α -hæmolyse.

4.3.2. Sekundær resistensbestemmelse ved IRIS-100 vs. Golden Standard

I Tabel 8 side 26 ses resultaterne for sekundær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard for gramnegative bakterier. Der er i alt aflæst 414 hæmningszoner, hvor der er 395 overensstemmelser og 19 afvigelser. Ud af disse afvigelser er der 1 very major error, 2 major errors og 16 minor errors. Det samlede antal overensstemmelser udgør 95,41% og samtidig overstiger major errors og minor errors ikke kriteriet på 7%, da det ligger på 4,44% (16).

I tabellen ses den første af i alt to very major errors, hvor hæmningszonen er blevet fortolket som sensitiv for den sekundære resistensbestemmelse for IRIS-100, men er fortolket som resistent i Golden Standard. Dette vil have betydning for patientbehandlingen, da patienten vil blive behandlet med et antibiotikum som bakterien er resistent mod og dermed ikke kunne

dræbe/hæmme bakterien. Denne very major error ses for *Escherichia coli* for ciprofloxacin, hvor den manuelle aflæsning er målt til 24 mm (R) og IRIS-100 aflæsningen er målt til 27 mm (S). Dette er en afvigelse på 1,59%, hvilket er under kriteriet om at very major errors ikke må afvige mere end 3% ifølge Jorgensen (16).

Grunden til den very major error for ciprofloxacin kan være, at antibiotikummet kan danne store hæmningszoner, som kan give afvigelser i aflæsningen, når radius aflæses frem for diameteren. Ved very major error afvigelsen i Tabel 8 side 26 blev størrelsen på hæmningszonen målt til 24mm for Golden Standard og 27mm ved IRIS-100. Her er det meget muligt at den manuelle aflæsning er blevet aflæst forkert, hvis radiussen er blevet målt 1mm for lavt og dermed blevet 2mm for lidt i diameteren. Hvis dette er tilfældet ville både den manuelle aflæsning og IRIS-100 aflæsningen begge have været sensitive og der ville derfor ikke have været en very major error.

Sanchez et al. (21) har udført et lignende forsøg, hvor der sammenlignes en automatisk hæmningszoneaflæser (OSIRIS video-assisted reading system) med diskdiffusion. Udover at måle afvigelserne i procent, har de yderligere et kriterium for, at der er en total overensstemmelse, hvis de to metoder ikke afviger mere end 3mm (21). Bruges dette til at vurdere den very major error i tabellen, ville der ikke have været en very major error, men derimod en total overensstemmelse, da de to metoder afviger 3mm.

4.3.3. Primær manuel resistensbestemmelse vs. Golden Standard

I Tabel 9 side 27 ses primær manuel resistensbestemmelse sammenlignet med Golden Standard for gramnegative bakterier. Her er der aflæst 410 hæmningszoner, hvor der er 400 overensstemmelser og 10 afvigelser. Ud af disse afvigelser er der 1 very major error, 3 major errors og 6 minor errors.

Der er en total overensstemmelse på 97,57%, som opfylder Jorgensens kriterium på 90% (16).

I tabellen ses også en very major error for det samme isolat og antibiotikum som i Tabel 8. Her måles hæmningszonen for Golden Standard til 24mm (R) og den primære manuelle aflæsning måles til 28mm (S). Da det er det samme isolat hvor den very major error ses, er det højst sandsynligt den samme manuelle aflæsningsfejl - at radius er målt i stedet for diameteren.

Very major error afvigelsen er på 1,61% og dermed under de 3% som er kriteriet (16). Major errors og minor errors overstiger ikke kriteriet på 7 %, da de er på 2,04% (16).

4.3.4. Samlet diskussion for de gramnegative bakterier

Gældende for alle de gramnegative resultater er, at der ses flest afvigelser for ampicillin, ciprofloxacin, amoxicillin-clavulansyre og cefuroxim for *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumoniae*. Fejltolkes ampicillin vil det have betydning for behandlingen af patienten, da ampicillin benyttes som førstevalg til behandling af sepsis (19). Hvis ampicillin fortolkes som resistent i Golden Standard, men sensitiv ved IRIS-100, vil patienten blive behandlet med et antibiotikum som bakterien er resistent over for, hvis der behandles efter IRIS-100 resultatet.

Som der ses i Tabel 7 side 25, fortolkes ampicillin som sensitiv i Golden Standard, men resistent ved IRIS-100, som er en major error. Behandles der efter IRIS-100 resultatet vil dette begrænse behandlingsmulighederne for patienten og der vil blive behandlet med et andet antibiotikum som muligvis ikke er nødvendigt.

Grunden til afvigelserne, der ses ved ciprofloxacin, kan være at når antibiotikaet danner store hæmningszoner og antibiotikaene ved siden af også danner store hæmningszoner har det ikke været muligt at måle diameteren ved den manuelle aflæsning, men kun radius. Igen kan radius give anledning til at zonestørrelserne måles for store eller små. Ved IRIS-100 bliver diameter altid målt, derved kan afvigelsen opstå når IRIS-100 måles ved diameteren og manuelt måles ved radius.

Edelman et al. (1) har foretaget et lignende forsøg hvor der sammenlignes en testmetode over for en referencemetode for bloddyrkningsisolater (1). Ved Edelman et al. forsøg var der flest afvigelser for de gramnegative bakterier for antibiotikaene amoxicillin-clavulansyre og cefuroxim (1; 15).

Ved projektets forsøg var der også en del afvigelser ved disse to antibiotika, noget der kan skyldes dobbeltzoner, som har gjort aflæsningen vanskeligere. Afvigelser for cefuroxim kan have en betydning for det kliniske udfald, da cefuroxim bruges til patienter der har penicillinallergi (19). Som det ses i Tabel 9 side 27 er der en major error for cefuroxim, som er fortolket resistent ved IRIS-100, men sensitiv i Golden Standard. Hvis der her behandles efter IRIS-100 resultatet, vil dette

mindske behandlingsmulighederne for patienter med penicillinallergi (19). Samtidig anvendes amoxicillin-clavulansyre også når penicillin ikke kan benyttes. En fejl i SIR-fortolkningen vil derfor også have betydning for behandlingsmulighederne til patienten (19).

4.4. Betydning af very major error, major error og minor error

I Tabel 10 side 28 ses det samlede antal very major errors, major errors og minor errors for alle grampositive bakterier. Her er der observeret flest afvigelser ved sammenligning af IRIS-100 fra primær resistensbestemmelse med Golden Standard. Her er der observeret 27 major errors og 22 minor errors.

Tabel 11 side 28 viser det samlede antal very major errors, major errors og minor errors for alle gramnegative bakterier. Her er der observeret flest afvigelser ved sekundær resistensbestemmelse for IRIS-100 sammenlignet med Golden Standard, hvor der er observeret 16 minor errors. I Tabel 11 side 28 ses der yderligere to very major errors, i modsætning til Tabel 10, hvor der ingen very major errors var.

Generelt for de to tabeller er der observeret flest afvigelser for de grampositive bakterier.

Grunden til at der er færre afvigelser for de gramnegative bakterier kan være, at de gramnegative bakterier dannede en skarpere kant på hæmningszonen ved dette forsøg, end de grampositive bakterier, der dermed har gjort de gramnegative bakterier nemmere at aflæse.

Ved de gramnegative aflæsninger var der to very major errors. Very major errors burde undgås idet, det vil have betydning for patienten, da bakterien vil blive fortolket som sensitiv i testmetoden, men værende resistent i referencemetoden. Dette vil have betydning for antibiotikabehandlingen og behandlingsmulighederne for patienten, da patienten vil blive behandlet med antibiotika som bakterien er resistent overfor (14). Ifølge Jorgensen må antallet af very major errors ikke overstige 3%. De to very major errors der var ved dette forsøg lå på 1,59% og 1,61%, hvilket ikke overstiger kriteriet på 3% (16).

Vurderes resultaterne med udgangspunkt i Sanchez et al., ville en af de to very major errors ikke være blevet fortolket som en very major error (21). Her mener Sanchez et al. at der er en total overensstemmelse mellem de to metoder hvis målingerne afviger ≤ 3 mm. Til projektet blev den

ene aflæsning målt til 24mm, mens den anden aflæsning blev målt til 27mm, hvilket er en afvigelse på 3mm.

Det har stor betydning for SIR-fortolkningen om resultaterne vurderes ud fra procentafvigelser eller afvigelser i mm. Fortolkes resultatet som resistent ved IRIS-100 og sensitiv ved Golden Standard, vil resultatet enten blive fortolket som sensitiv eller resistent hvis der er en afvigelse på under 3mm. Dette er noget der vil have en betydning for antibiotikabehandlingen, hvor udfaldet kan være at patienten får den forkerte behandling.

Fra et klinisk perspektiv er major errors mindre kritiske end very major errors, idet at bakterien vil blive fortolket som resistent i testmetoden, men værende sensitiv i referencemetoden. Major errors påvirker ikke på samme måde antibiotikabehandlingen som very major errors, men vil mindske antallet af behandlingsmuligheder. Dette er et problem for infektioner forårsaget af resistente mikroorganismer (14).

Forskellen mellem afvigelserne for de grampositive og gramnegative bakterier er, at for de grampositive bakterier er der flest afvigelser for de bakteriostatiske antibiotikas, mens der er flest afvigelser ved de baktericide antibiotikas for de gramnegative bakterier. Afvigelserne skyldes nødvendigvis ikke IRIS-100 aflæsningsmetoden, men derimod antibiotikadiskene, da hæmningszoner kan være svære at aflæse af forskellige årsager såsom dobbeltzoner, α -hæmolyse og store hæmningszoner. Yderligere kan afvigelserne skyldes, at der er forskellig inokulum ved sammenligning af primær resistensbestemmelse med Golden Standard.

Alle afvigelserne er gennemgået for at vurdere om der var et mønster i, at afvigelserne blev observeret ved den samme bakterieart. Afvigelserne ses for alle bakteriearter, noget der tyder, på at det blandt andet er størrelsen på hæmningszonen der har haft indflydelse på afvigelserne. Dog ses der flest afvigelser for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* og *Klebsiella pneumoniae*. Da der blev analyseret flest isolater fra disse tre bakteriearter, er det ikke overraskende at der er flest afvigelser ved disse.

4.5. Vurdering af IRIS-100

Generelt var der høj overensstemmelse mellem de to aflæsningsmetoder; IRIS-100 og Golden Standard. Samme resultat blev observeret af Hombach et al. (22), som har foretaget et lignende forsøg mellem automatisk aflæsning (Sirscan automatic) og manuel aflæsning af hæmningszoner ved diskdiffusion (22). Hombach et al. oplevede at ingen af de to metoder systematisk målte hæmningszonerne højere eller lavere sammenlignet med hinanden for *Staphylococcus sp.* (22). Dette er i kontrast til projektets forsøg, hvor det blev observeret at IRIS-100 målte hæmningszonerne en smule lavere sammenlignet med manuel aflæsning for både grampositive og gramnegative isolater. Det samme gjorde sig gældende for kontrolisolaterne.

Hvis hæmningszonerne måles lavere end hvad de er, vil det betyde at der er større risiko for at bakterierne bliver fortolket som resistente men ikke er det. Dette vil betyde at der er færre behandlingsmuligheder for patienten.

At automatisk aflæsning måler hæmningszonerne lavere end manuel aflæsning er yderligere blevet observeret i to andre lignende forsøg, hvor en automatisk hæmningszone aflæser er sammenlignet med manuel aflæsning ved diskdiffusionsmetoden (21; 23). I begge disse forsøg oplevede forfatterne ligeledes at den automatiske aflæsning målte hæmningszonerne mindre end den manuelle aflæsning (21; 23).

En grund til at IRIS-100 målte hæmningszonerne mindre kan være at diameteren altid aflæses modsat den manuelle aflæsning, hvor det ikke altid er muligt at måle diameteren, hvorved radius måles. Dette kan eksempelvis betyde at diameteren kan blive 4mm for meget, hvis radius måles 2mm for meget. Idet at IRIS-100 altid benytter sig af diameteren til aflæsning af hæmningszonerne kan automatisk aflæsning være med til at standardisere aflæsning af hæmningszoner. Dette understøttes også af Idelevich et al. (23), der har sammenlignet ADAGIO automated system med diskdiffusion (23). Idelevich et al. mener, at manuel aflæsning af følsomhedsbestemmelse kan give interpersonelle variationer i resultatet, grundet den subjektive aflæsning (23). Subjektiv aflæsning vil altid være en faktor ved manuel aflæsning af hæmningszoner i og med, at det er personer der aflæser hæmningszoner, og dermed giver denne interpersonelle variation.

Yderligere påpeger Hombach et al. at der ved manuel aflæsning er variationer, som ikke kan forekomme ved automatisk aflæsning af hæmningszoner på grund af standardisering af blandt

andet lys, placering af agarpladen og baggrunden (22). Ved manuel aflæsning mener Hombach et al. at lys, vinkel af agarpladen og om agarpladen aflæses fra toppen eller bunden varierer alt efter hvem der aflæser hæmningszonerne (22). Dette gjorde sig også gældende ved projektets forsøg, hvor især lys havde en stor betydning for, hvordan de manuelle hæmningszoner blev aflæst. Ved IRIS-100 var dette standardiseret, idet der skulle vælges en algoritme for hver bakterieart.

En fordel ved IRIS-100 er, at alle billeder af resistenspladerne gemmes. Dette gør det muligt at gå tilbage og kigge på de målte hæmningszoner. Herved er det muligt at dobbelttjekke resultater samt at gemme data fra kontrolisolater. Dette er en stor fordel hvis isolatpladerne ikke længere er tilgængelige og det ønskes at gå tilbage og tjekke resultaterne. KMA benytter sig af billeddokumentation til blandt andet podninger, hvor billeder tages og gemmes i 3 måneder. Da der på nuværende tidspunkt ikke tages billeder af resistensplader fra bloddyrkningsisolater på KMA, er det en fordel at IRIS-100 tager billeder af resistenspladerne.

Også Idelevich et al. ser automatisk aflæsning som en fordel, da data fra kontrolmålinger gemmes (23). Til projektets forsøg var det en stor fordel at IRIS-100 gemte billederne. Dette gjorde det muligt at sammenligne de manuelle aflæsninger med IRIS-100, hvis der var stor uoverensstemmelse mellem de to aflæsninger.

En yderligere fordel ved IRIS-100 er, at det er nemmere at måle hæmningszoner, der ikke har en skarp kant, grundet kontrasten mellem resistenspladen og baggrunden på billedet. Der hvor der var hæmningszoner med skarpe kanter, var manuel aflæsning på samme niveau som IRIS-100.

En ulempe ved IRIS-100 er, at der hvor antibiotikadisken ligger for langt ude mod kanten af agarpladen, kan IRIS-100 ikke opfange antibiotikadisken på billedet. Herved er det ikke muligt for IRIS-100 at måle hæmningszonerne. Når IRIS-100 ikke kunne registrere antibiotikadisken var det til forsøget ikke muligt at tegne en hæmningszone rundt om antibiotikadisken i programmet.

Idelevich et al. oplevede en ulempe ved automatisk aflæsning af hæmningszoner for *Haemophilus influenzae* isolater grundet den svage vækst på agarpladen (23). Denne ulempe blev ikke oplevet ved projektets forsøg, hvor det var nemmere at aflæse hæmningszoner for *Haemophilus influenzae* samt andre isolater udsået på MH-F-plader ved IRIS-100. Årsagen til dette var den høje kontrast mellem billedet og baggrunden i IRIS-100.

4.6. Konklusion

Projektets resultater viste stor overensstemmelse mellem de to aflæsningsmetoder – IRIS-100 over for Golden Standard (manuel aflæsning i henhold til EUCAST).

For de grampositive bakterier var der en gennemsnitlig overensstemmelse på 91%. For de gramnegative bakterier var der en gennemsnitlig overensstemmelse på 97%.

Det kan konkluderes at den høje overensstemmelse mellem IRIS-100 og Golden Standard viser at IRIS-100 har et klinisk potentiale til aflæsning af hæmningszoner ved diskdiffusion, til fortolkning af SIR for bloddyrkningsisolater.

Yderligere kan det konkluderes, at IRIS-100 kan anvendes til at standardisere aflæsninger af hæmningszoner ved diskdiffusion.

4.7. Perspektivering

Da flere studier har fundet det svært at aflæse *Haemophilus influenzae* isolater grundet den svage vækst, kunne det være interessant at foretage et forsøg med flere isolater fra *Haemophilus influenzae*.

Til et nyt forsøg ville det yderligere være interessant at optimere aflæsningsforholdene for de manuelle aflæsninger, således at lysforhold og baggrund bliver af samme kvalitet for begge aflæsningsmetoder.

Et yderligere aspekt til et nyt forsøg kunne være tidsmåling. Her kunne tiden måles for både de manuelle aflæsninger og de semi-automatiske aflæsninger og derefter sammenlignes.

5. Litteraturliste

1. Edelmann A, Pietzcker T, Wellinghausen N. *Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates*. Journal of Medical Microbiology. 2006 sep; 56(2007): 202-207.
2. Cimolai N. *Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections*. New York: Marcel Dekker, 2001: 189.
3. Hudzicki J. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. American Society for Microbiology. 2009 dec: 1-23.
4. Klinisk Mikrobiologisk afdeling, Hvidovre Hospital. *Resistensbestemmelse generelt, Laboratorieinstruks*. 2015 sep.
5. Degré M, Hovig B. *Medisinsk Mikrobiologi*. 2. udgave. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS, 2004: 495.
6. European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Antimicrobial susceptibility testing, EUCAST disk diffusion method* [Internet] 2017. [Citeret d. 26 mar 2018]. Tilgængelig fra:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_5/Manual_v_6.0_EUCAST_Disk_Test_final.pdf
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters* [Internet] 2012. [Citeret d. 26 mar 2018]. Tilgængelig fra:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf
8. Pro Devices. *Produktinformation* [Internet] 2015. [Citeret d. 28. mar 2018]. Tilgængelig fra:
<http://www.pro-devices.com/da/IZR-100.html>
9. Klinisk Mikrobiologisk afdeling, Hvidovre Hospital. *Bloddyrkning BacT/Alert, Laboratorieinstruks*. 2016 maj.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* [Internet] 2018. [Citeret d. 03. maj 2018]. Tilgængelig fra:
https://clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf
11. European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Reading guide EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing* [Internet] 2017. [Citeret d. 26 mar 2018]. Tilgængelig fra:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_5/Reading_guide_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf
12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST* [Internet] 2018. [Citeret d. 26 mar 2018]. Tilgængelig fra:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_8.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf

- 13.** Breteler KBK, Rentenaar RJ, Verkaart K, Sturm PDJ. *Performance and clinical significance of direct antimicrobial susceptibility testing on urine from hospitalized patients.* Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2011 maj; 43: 771-776.
- 14.** Stokkou S, Geginat G, Schlüter D, Tammer I. *Direct Disk Diffusion Test using European Clinical Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints Provides Reliable Results Compared with The Standard Method.* European Journal of Microbiology and Immunology. 2015 feb; 5(2015): 1-9.
- 15.** Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologis Referencegruppe vedrørende Antibiotika Resistensbestemmelse. *Klaringsrapport* [Internet] 2004. [Citeret d. 03 maj 2018]. Tilgængelig fra: <http://dskm.dk/klaringsrapport-RETTET.pdf>
- 16.** Jorgensen JH. *Selection Criteria for an Antimicrobial Susceptibility Testing System.* Journal of Clinical Microbiology. 1993 nov; 31(11): 2841-2844.
- 17.** Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. *Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci.* Journal of Clinical Microbiology. 2003 okt; 41(10): 4740-4744.
- 18.** Hamilton-Miller JMT, Shah S. *Susceptibility Testing of Linezolid by Two Standard Methods.* Clinical Microbial Infection Diseases. 1999; 1999(18): 225-227.
- 19.** SFR Mikrobiologi. *Antibiotikadosering, forholdsregler og behandlingsrekommandationer - håndbog.* København: Region Hovedstaden, 2017: 19-20
- 20.** Pletz MW, Bloos F, Burkhardt O, Brunkhorst FM, Bode-Böger SM, Martens-Lobenhoffer J et al. *Pharmacokinetics of moxifloxacin in patients with severe sepsis or sepsis shock.* Intensive Care Medicine. 2010 mar; 2010(36): 979-983.
- 21.** Sanchez MA, Sanchez del saz B, Loza E, Baquero F, Canton R. *Evaluation of the OSIRIS video reader system for disk diffusion susceptibility test reading.* Clinical Microbiology Infections. 2001 apr; 7: 352-357.
- 22.** Hombach M, Zbinden R, Böttger EC. *Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone reader.* BMC Microbiology. 2013 okt; 13(225): 1-8.
- 23.** Idelevich EA, Becker K, Schmitz J, Knaack D, Peters G, Köck R. *Evaluation of an Automated System for Reading and Interpreting Disk Diffusion Antimicrobial Susceptibility Testing of Fastidious Bacteria.* PLOS one. 2016 jul; 1371: 1-8.

Bilag 1

Tabel 12. Viser rådata for *Staphylococcus aureus* ATCC-kontrolstammen.

Kontrolstamme	Oxacillin		Penicillin		Cefoxitin		Erythromycin		Clindamycin		Ampicillin		Rifampicin		Linezolid		Moxifloxacin		Gentamicin		Vancomycin	
	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM
SA1K	20	20	14	14	26	27	26	25	26	27	16	16	28	31	26	23	30	30	26	26	13	13
SA2K	22	20	14	14	28	26	26	25	26	25	18	16	30	34	26	22	28	28	27	26	15	14
SA3K	22	20	16	14	28	26	26	24	28	26	18	16	34	31	24	23	32	28	26	24	14	13
SA4K	22	19	16	14	28	27	30	25	26	23	17	-	32	-	26	-	30	-	27	-	14	-
SA5K	19	19	13	12	23	26	26	23	23	23	14	13	32	30	22	22	28	27	26	24	14	13
SA6K	22	19	14	14	27	27	24	24	26	26	15	15	32	30	24	26	30	28	26	24	14	12
SA7K	22	19	14	13	27	26	25	25	26	23	16	15	32	30	24	24	30	26	25	23	14	13
SA8K	23	20	13	12	27	25	26	23	26	23	17	15	32	31	24	22	28	23	26	23	14	13
SA9K	22	20	15	13	28	26	26	24	28	25	17	15	34	31	24	23	30	28	26	24	15	13
SA10K	23	20	14	13	27	25	26	24	24	24	16	15	33	29	26	23	28	27	22	23	14	13
Middelværdi	22	20	14	13	27	26	26	24	26	25	16	15	32	31	25	23	29	27	26	24	14	13
EUCAST breakpoint																						
Target i mm	22		-		27		26		26		18		33		24		28		22		-	
Range i mm	19-25		-		24-30		23-29		23-29		15-21		30-36		21-27		25-31		19-25		-	

Tabel 13. Viser rådata for *Streptococcus pneumoniae* ATCC-kontrolstammen.

Kontrolstamme	Oxacillin		Penicillin		Cefoxitin		Erythromycin		Clindamycin		Ampicillin		Rifampicin		Linezolid		Moxifloxacin		Gentamicin		Vancomycin	
	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM
SP1K	12	13	20	21	26	26	30	25	24	26	30	29	30	30	28	26	30	28	17	17	20	22
SP2K	12	14	19	20	25	25	30	28	26	23	30	28	30	27	28	26	26	26	16	16	18	19
SP3K	14	15	22	20	28	23	8	9	26	24	26	28	30	28	30	28	28	27	14	15	18	18
SP4K	17	12	23	19	26	27	23	25	23	24	30	28	34	28	28	23	32	26	17	15	22	19
SP5K	18	13	21	19	27	23	24	28	24	23	34	-	28	27	26	27	28	26	16	15	22	19
SP6K	14	15	19	21	26	25	27	28	24	24	28	29	27	27	30	27	27	26	13	14	20	21
SP7K	15	12	20	20	26	27	32	30	26	27	28	35	30	31	26	29	28	28	18	17	21	21
SP8K	16	13	21	18	26	23	27	26	24	22	28	26	27	27	28	24	24	24	16	15	18	18
SP9K	20	20	20	18	25	23	28	26	24	22	28	27	28	26	25	25	26	24	17	16	19	20
SP10K	17	12	20	18	23	22	26	25	23	21	27	26	28	25	25	25	25	24	16	16	18	17
Middelværdi	16	14	21	19	26	24	26	25	24	24	29	28	29	28	27	26	27	26	16	16	20	19
EUCAST breakpoint																						
Target i mm	11		-		-		29		25		28		29		26		27		-		20	
Range i mm	8-14		-		-		26-32		22-28		25-31		26-32		23-29		24-30		-		17-23	

Tabel 14. Viser rådata for *Escherichia coli* ATCC-kontrolstammen.

Kontrolstamme	Piperacillin+tazobactam		Ceftazidim		Ciprofloxacin		Meropenem		Gentamicin		Trimethoprim+sulfamethizol		Mecillinam		Ampicillin		Amoxicillin+clavulansyre		Cefepodoxim		Cefuroxim		Temocillin	
	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM
EC1K	24	26	27	28	34	32	32	33	24	23	23	26	26	33	20	21	22	22	28	27	24	25	22	24
EC2K	26	25	28	27	42	39	38	35	26	24	30	27	26	28	18	19	20	21	30	25	26	22	24	21
EC3K	24	25	26	25	36	32	32	31	24	24	28	26	28	28	20	20	23	22	28	26	24	24	23	22
EC4K	28	25	30	28	40	35	35	34	28	26	28	26	28	27	20	20	22	22	28	27	24	24	24	23
EC5K	25	23	28	26	26	34	34	31	26	24	28	25	27	25	20	20	22	20	28	25	24	23	22	21
EC6K	26	24	28	23	34	36	34	32	24	24	22	26	32	28	20	19	23	22	26	26	25	23	23	22
EC7K	27	25	28	28	38	28	39	32	25	25	30	27	30	28	20	20	24	23	30	28	26	25	24	23
EC8K	25	23	30	26	36	32	32	33	23	23	28	24	27	26	20	19	22	20	28	24	24	22	23	21
EC9K	26	25	26	26	34	35	36	33	27	23	27	26	27	27	20	19	24	21	28	25	26	23	24	22
EC10K	26	24	28	25	36	31	35	32	26	24	23	26	29	27	21	19	22	21	28	26	23	23	23	23
Middelværdi	26	25	28	26	36	33	35	33	25	24	27	26	28	28	20	20	22	21	28	26	25	23	23	22
EUCAST breakpoint																								
Target i mm	24		26		33		31-32		22-23		26		27		18-19		21		25-26		23		-	
Range i mm	21-27		23-29		29-37		28-35		19-26		23-29		24-30		15-22		18-24		23-28		20-26		-	