

FAQ -Frequently Asked Questions till EUCAST/RAF-M angående EUCAST lappdiffusionsmetod

FAQ v 1.1 2010-02-01	Fråga 9 – omformulerat svar. Fråga 19 och 22 nya.
FAQ v 1.2 2010-02-16	Alla frågor efter 3 har fått nya nummer. Nya frågor är 4, 9, 21 och 23. Fråga 11 är omformulerad.
FAQ v 1.3 2010-03-05	Alla frågor efter 16 har fått nya nummer. Frågorna 17, 23 29 och 30 är nya.
FAQ v 1.4 2010-08-31	Alla frågor efter 4 har nya nummer. Gråmarkerade frågor är nya.

A. Medium, lappar och övrigt material

1. Vilket Mueller Hinton rekommenderar ni?

Svar: EUCAST/RAF-M rekommenderar inte någon enskild leverantör. Vi har validerat Mueller Hintonagar från BD (BBL Mueller HintonII, artnr 211438), Oxoid (Mueller Hinton, artnr CM0337) samt färdiga plattor från bioMérieux (Mueller HintonII, artnr 43301) när vi har utvecklat metoden. Vi har även validerat MH-F-plattor (Mueller Hinton Fastidious organisms) tillverkade av ovan nämnda Mueller Hinton från BD och Oxoid. Ytterligare leverantörer kan bli aktuella.

2. Vad är det för skillnad på Mueller Hinton och Mueller HintonII?

Svar: Vissa leverantörer har enbart Mueller Hinton och andra leverantörer har enbart Mueller HintonII. Båda varianterna går bra att använda så länge zonerna på referensstammarna hamnar inom angivna QC-intervall. Problem med katjoninnehållet kan kontrolleras med *P. aeruginosa* och aminoglykosider (se nedan). Vi har inte sett några generella skillnader mellan Mueller Hinton och Mueller HintonII från olika leverantörer i detta avseende.

3. Hur ska vi kontrollera en ny batch Mueller Hintonagar?

Svar: Varje ny batch Mueller Hintonagar från leverantör behöver kontrolleras med avseende på tillväxt och hämningssonernas storlek på rutinmässigt använda antibiotika. Använd EUCAST rekommenderade QC-stammar. Gentamicin (eller tobramycin) bör sättas på *P. aeruginosa* ATCC 27853 för att upptäcka problem med katjoninnehåll. Trim-sulfa bör sättas på *E. faecalis* ATCC 29212 för att upptäcka problem med tymin-/tymidinnehåll i agarn.

4. Kan man slamma i PBS istället för NaCl?

Svar: EUCAST lappdiffusionsmetod är, precis som CLSI-metoden, baserad på slamningar i 0.85% NaCl och vi rekommenderar att man följer instruktionerna i manualen. Laboratorier som önskar avvika från den beskrivna metoden förväntas kalibrera åtgärden gentemot den standardiserade metoden.

5. Kan man använda fårblod istället för hästblod?

Svar: Nej. Haemophilus växer inte på MH med 5% fårblod och 20 mg/L β-NAD. Alla brytpunkter är kalibrerade mot MH med 5% hästblod och 20 mg/L β-NAD och gäller inte om man använder något annat medium.

Vilket β -NAD ska jag använda?

Svar: Vi har testat β -NAD från sju olika leverantörer med renhetsgrad från 95% och uppåt och alla gav likvärdiga resultat. Vi rekommenderar dock att man använder β -NAD med högre renhet ($\geq 98\%$). Under utvärderingen har vi använt β -NAD från Sigma-Aldrich (N1511, $\geq 99\%$). På lite sikt kan vi tänka oss att producera en lista på de leverantörer och artikelnummer vi undersökt.

B. Metodologi

6. Måste man följa "15-15-15-minutersregeln"?

Svar: När man har slammat sina isolat rekommenderar EUCAST/RAF-M att man helst använder slamningen inom 15 minuter -och alltid inom 60 minuter. När man har strukit sina plattor är det viktigt att sätta på antibiotikalapparna inom 15 minuter och att sedan starta inkuberingen inom ytterligare 15 minuter för att inte få felaktiga zoner.

7. Måste man mäta grumligheten på sina slamningar?

Svar: EUCAST/RAF-M rekommenderar att man mäter grumligheten på alla sina slamningar för att hamna inom det angivna området McFarland 0,40-0,60. Det är svårt att bedöma grumligheten visuellt.

8. Måste man mäta alla zoner?

Svar: RAF-M rekommenderar att man under övergångsperioden mäter alla zoner och analyserar sina histogram mot de referenshistogram som finns publicerade på www.eucast.org. Vi rekommenderar också att man under de första tre månaderna sätter rutinmässigt använda antibiotikalappar på aktuella referensstammar. Även här mäter man och lagrar zondiametrar. Histogram finns tillgängliga på EUCAST hemsida för varje referensstam.

9. Ska man läsa både zoner på MH och MH-F mot en mörk bakgrund?

Svar: MH ska alltid läsas med ljus mot plattan, mot mörk bakgrund och ca 30 cm från ögat. Anledningen till detta är att tunn inväxt och dimmor som man inte ska ta hänsyn till "försvinner" när man läser enligt dessa instruktioner. MH-F ska läsas med locket av, med ljus mot plattan och mot en ljus bakgrund. På MH-F kan man behöva titta lite närmre på plattan för att kunna skilja på hemolys och växt.

10. Varför ska man inte plocka kolonier från ett selektivt medium?

Svar: Selektiva medier innehåller substanser som "trycker" eller framhäver växt. Det är en allmän rekommendation gällande resistensbestämning att man ska undvika att plocka kolonier från selektiva medier. Om man vill frånga rekommendationen är det laboratoriets ansvar att kontrollera att det inte påverkar resultaten.

11. Ska man plocka mer än en koloni för att inte missa heteroresistens?

Svar: Nej, det behöver man inte. För de flesta organismer är det dock **nödvändigt** att plocka mer än en koloni för att kunna slamma till McFarland 0,5. CLSI-manualen anger: "Prepare the inoculum by making a suspension of isolated colonies selected from an 18-24 h agar plate (a non-selective medium such as blood agar should be used). Regeln "att man ska plocka från mer än en koloni" tillkom för att undvika att resistensbestämningen utfördes på en enstaka muterad bakterie. Det saknas dokumentation på att detta verkligen utgör ett problem.

Kan man sätta Etest på MH-F?

Svar: bioMérieux (f.d. Biodisk) rekommenderar Haemophilus Test Medium (**HTM**) för Haemophilus och Mueller Hinton med 5% blod för streptokocker (**CLSI's streptokockplatta**). Vi har i samband med utvecklingen av den europeiska metoden jämfört de rekommenderade medierna med **MH-F** för både Etest och M.I.C.Evaluator (Oxoid). Vi upptäckte inga systematiska skillnader mellan MH-F och rekommenderade medier. Som väntat varierade värden +/-1 spädningssteg. Trim-sulfa är alltid problematiskt på blodinnehållande medier (skillnader på +/-2 spädningssteg).

C. Avläsning

12. Ska man läsa bakteriostatiska och baktericida antibiotika på samma sätt?

Svar: Ja, man ska läsa fullständig hämning på alla antibiotika. Ta hänsyn till växt som ses med blotta ögat enligt anvisningarna för avläsning, men leta inte efter dimmor.

13. Hur ska jag tolka inväxt i ampicillinzonen på Haemophilus NCTC 8468?

Svar: Haemophilus influenzae NCTC 8468 ska inte ha inväxt i ampicillin- (2ug) eller penicillin V-zon. Det kan bero på för tjockt inokulat eller för lång inkuberingstid. På kliniska isolat kan inväxt i ampicillin-, cefaclor- eller penicillin V-zon dock vara ett tecken på resistens.

14. Varför får jag ibland inväxt i zonen på Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853?

Svar: Det beror förmodligen på att inokulatet är för tjockt. Tryck bort mer vätska från bomullspinnen innan du stryker plattorna.

D. Tolkning och brytpunkter

15. Finns det brytpunkter för Staphylococcus saprophyticus och ampicillin och cefadroxil?

Svar: Brytpunkterna för ampicillin och cefadroxil är: Ampicillin (OBS! 2 ug): S \geq 15 mm, R<15 mm, Cefadroxil S \geq 18 mm, R<18 mm.

16. I EUCASTs tabeller under fliken Enterobacteriaceae, står det att brytpunkterna för (piv-)mecillinam endast gäller för okomplicerad urinvägsinfektion. RAF-M säger att brytpunkterna för mecillinam endast gäller för E. coli och K. pneumoniae. Vad gäller fortsättningsvis?

Svar: I Enterobacteriaceae-gruppen orsakas okomplicerad (nedre) urinvägsinfektion i huvudsak av *E. coli* och möjligen av *K. pneumoniae* och *Pr. mirabilis*. Restriktionen för mecillinam är således egentligen densamma i både EUCAST och RAF-M. Handläggningmässigt är det enklast att begränsa brytpunkten till arterna *E.coli*, *K.pneumoniae* och *Proteus mirabilis*, men kom ihåg att i kommentarsform begränsa resultatet till att endast gälla okomplicerad urinvägsinfektion. För alla andra arter bör man besvara R eller låta bli att lämna ut resultat.

17. Brytpunkten för Enterobacteriaceae och cefadroxil är 12/12. Ska vi svara ut dem som S?

Svar: Brytpunkten för cefadroxil gäller vid okomplicerad nedre urinvägsinfektion (*E. coli*, *K. pneumoniae* och *Proteus mirabilis*) och ska svaras ut S för dessa patogener (jmf mecillinam). För alla andra arter bör man besvara R eller låta bli att lämna ut resultat.

18. Brytpunkten för Enterobacteriaceae och ampicillin är 14/14. Ska vi svara ut dem som S?

Svar: Brytpunkten för ampicillin gäller vid okomplicerad nedre urinvägsinfektion och enbart för *E. coli* och *Proteus mirabilis* och ska svaras ut S för dessa patogener. För alla andra arter bör man besvara R eller låta bli att lämna ut resultat.

19. I EUCASTs tabeller saknas ännu brytpunkter för *Pasteurella multocida*. Kan RAF-M ange preliminära brytpunkter?

Svar: Ampicillin (OBS! 2 ug): S \geq 16 mm, R<16, Penicillin V: 22/22 mm, Ciprofloxacin 25/25 mm, Tetracyclin (kan besvaras som doxycyklin): 22/22 mm, trimetoprim-sulfa 20/20 mm (preliminära brytpunkter 2010-02-01).

20. Finns det brytpunkter för stafylokker och mupirocin?

Svar: EUCAST har fastställt MIC-brytpunkter för mupirocin till S \leq 1 och R>256 mg/L och zonbrytpunkter kommer inom kort.

21. Varför finns inte mecillinam med i brytpunktstabellen för stafylokker?

Svar: Mecillinam har utgått ur tabellen eftersom resistensbestämning inte är aktuell. Följande kommentar kan, utan föregående resistensbestämning, bifogas i svaret: "Det finns klinisk tradition för att behandla *S. saprophyticus* med mecillinam, trots att in vitro aktiviteten är låg."

E. Övrigt

22. Hur ska vi göra med *Campylobacter*, *Helicobacter*, gonokocker och anaerober?

Svar: Kriterier för lappdiffusion för *Campylobacter* publiceras troligen under första halvan av 2010. För *Helicobacter*, gonokocker och anaerober rekommenderas MIC-bestämning i dagsläget. RAF-M rekommenderar att man a) skickar till Örebro för resistensbestämning eller b) använda referensmetodik för MIC-bestämning av gonokocker.

23. Hur gör vi med direktresistensbestämningar?

Svar: EUCAST/RAF-M rekommenderar att man gör resistensbestämningar på rena isolat för att kunna tolka enligt EUCAST brytpunkter. Om man vill göra direktresistensbestämningar är det laboratoriets ansvar att kalibrera tolkningen så att det blir rätt enligt EUCAST tolkningskriterier.

24. Ska man sluta med vankomycin-lappen på stafylokker?

Svar: JA. Samtliga brytpunkts- och metodkommittéer avråder i dagsläget från vankomycin lappdiffusion på stafylokker. Nedsatt känslighet för vankomycin hos stafylokker drabbar i stort sett enbart meticillinresistenta stafylokker. MIC-bestämning rekommenderas när det bedöms relevant att utföra resistensbestämning mot vankomycin.

25. Finns det QC-tabeller för *Str. pyogenes* CCUG 25571?

Svar: Tabellerna för denna stam är inte officiella och tillhör tillsvidare inte EUCAST lappdiffusionsmetod.