

**Udgave efter høringsrunde, 20.4.2004**

**Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologi  
Referencegruppe vedrørende Antibiotika Resistensbestemmelse**

# **KLARINGSRAPPORT**

<b>Disposition for Klaringsrapport :</b>	Side
1. Forklaring på forkortelser anvendt i teksten	3
2. Introduktion	4
a. Indledning	
b. Internationale referencegrupper vedr. resistensbestemmelse	
c. Den danske referencegruppens sammensætning	
d. Målsætningen for gruppens arbejde	
3. De hyppigst anvendte antibiotikagrupper og deres resistensmekanismer.	7
a. Ændring af antibiotikas angrebepunkt	
b. Impermeabilitet	
c. Enzymatisk inaktivering af antibiotika	
d. Krydsresistens	
4. Metoder til resistensbestemmelse	13
a. Disk-/tabletdiffusion	
b. MIC-bestemmelse	
c. Kvalitetssikring (QC)	
5. Resistensbestemmelse af specielle mikroorganismer	25
a. Gærsvampe ( <i>Candida</i> og <i>Cryptococcus</i> species).	
b. Anaerobe bakterier	
c. Bakteriearter med særlige vækstforhold eller med resistens-egenskaber vanskeligt påviselige i rutinelaboratoriet	
6. MIC-værdier og brydepunkter (breakpoints): Forslag til fælles rapportering af resistensbestemmelse i Danmark.	29
a. Speciesrelaterede brydepunkter	
b. S(I)R-besvarelse	
7. Konklusion	35
8. Referencegrupper, rapporter	36
9. Referencer	37

### **1. Forklaring på forkortelser anvendt i teksten:**

ATCC	American Type Culture Collection
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
MIC	Minimal inhibitory concentration ~ mindste hæmmende koncentration
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PEAK	Top (-koncentration; den højest målte koncentration)
PBP	Penicillin Bindende Protein
QC	Quality Control ~ kvalitetssikring
S-I-R	Sensitive (følsomme) – Intermediære – Resistente

## 2. Introduktion.

### **2.a. Indledning**

Resistensbestemmelse af potentielt patogene bakterier udføres rutinemæssigt på alle klinisk mikrobiologiske afdelinger i Danmark som en naturlig del af den bakteriologiske diagnostik og er en integreret del af prøvesvaret til rekvirenten. Denne baserer sin antibiotikabehandling af patienten på resistensbestemmelsen, som dermed udgør basis for antibiotikapolitikken, idet også den empiriske behandling – den behandling, der gives før ætiologien og resistensbestemmelsen foreligger – hviler på den klinisk diagnosticerede sygdom og erfaringen med resistensforekomsten det pågældende sted.

Resistensbestemmelsesmetoderne i Danmark – såvel som internationalt – er langt fra standardiserede eller ensrettede. Resistensbestemmelse kan foretages på en række forskellige måder, som alle kan skelne de følsomme fra de resistente, men selv om alle klinisk mikrobiologiske afdelinger i landet rutinemæssigt anvender disk-/tabletdiffusionsmetoden, bruges der i Danmark mindst 4 forskellige disk/tablet-systemer, agarmedier, inokuleringsmetoder, aflæsningsmåder, MIC (mindste hæmmende koncentration), breakpoints (brydepunkter) og rapporteringssystemer, hvilket vanskeliggør tolkningen.

Tabel 1 viser de forskellige betegnelser på resistenssvar, der p.t. anvendes i Danmark.

#### **Tabel 1:**

**Eksempler på besvarelse af følsomhedsbestemmelse i Danmark**

Betegnelse	Forklaring		
	Følsom	Intermediær	Resistent
S I R	S	I	R
3 - 0	3	2	1 - 0
3 - 0	3 - 2	U	1 - 0
2 - 0	2	1	0
1 - 0	1		0
S R	S		R

Som det ses, kan tallet "1" visse steder i landet betyde følsom og andre steder resistent. De klinisk mikrobiologiske afdelinger bruger ikke altid samme MIC for en given bakterieart, og betegnelsen "følsom" anvendes for flere antibiotika og bakteriearter, selv om standarddoser af de pågældende antibiotika ikke kan påregnes at kurere infektioner med de pågældende bakterier.

## **2.b. Internationale referencegrupper.**

Lignende forskelle findes mellem landene. Der har internationalt siden begyndelsen af 1950'erne været forsøgt en række forskellige tiltag til standardisering af resistensbestemmelse, men på trods af de gode intentioner og forståelse for formålet, er det ikke lykkedes at skabe enighed om systemerne i hverken Skandinavien, andre europæiske lande eller USA. De fleste lande har nedsat nationale referencegrupper, som i løbet af de sidste 10-15 år er fremkommet med en række klarings- eller konsensusrapporter. Størst gennemslagskraft har det amerikanske privat/nationale NCCLS haft med sine metodeforlæg, bl.a. fordi de fleste amerikanske videnskabelige tidsskrifter, der beskæftiger sig med antibiotikabehandling, har krævet rapportering af følsomhed/resistens i henhold til NCCLS. En række lande, også europæiske, har siden adopteret NCCLS-systemet. Imidlertid bygger dette system langt fra i alle tilfælde på en rationel forståelse af resistensbegrebet, og der kan derfor være god grund til at de enkelte lande opretholder referencegrupper af interesserede eller eksperter, der følger udviklingen inden for denne videnskab.

Senest er der via den europæiske sammenslutning af selskaber, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) forsøgt at skabe europæisk enighed via underudvalget, EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), og det ser ud til, at de forskellige europæiske referencegrupper kan enes om et fælles system – det samme som dette danske forslag bygger på.

## **2.c. Den danske referencegruppe for antibiotikaresistensbestemmelse**

Det var derfor naturligt, at Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologi (DSKM) i 1996 nedsatte en referencegruppe med det formål at forsøge at standardisere metoder til resistensbestemmelse i Danmark. Arbejdet er bl.a. udmøntet i to rapporter fra reference-

gruppen i 1997 og i 1999, omtalt på

<http://inet.uni2.dk/home/dskm/antibiotikaresistensbestemmelse.html>.

I denne klaringsrapport fremlægger referencegruppen, efter høring hos medlemmerne af DSKM, et **forslag til resistensbestemmelse og –besvarelse**, der hviler på danske traditioner og det bedste af de udenlandske systemer.

Referencegruppen har bestået af følgende medlemmer:

Alice Friis-Møller

Niels Frimodt-Møller (formand fra 2000)

Jette Elisabeth Kristiansen

Susanne Pedersen

Helga Schumacher

Knud Siboni (formand 1996 – 99) – udtrådt pr. 31.10.2003

Robert Leo Skov

Supplerende kapitler til denne klaringsrapport er venligst leveret af: Maiken Arendrup (resistensbestemmelse af svampe) og Tage Justesen (resistensbestemmelse af anaerobe bakterier).

#### **2.d. Målsætningen for gruppens arbejde har været følgende:**

- at angive metoder til at afgøre, om der findes mekanismer, som gør mikroorganismen resistent mod et givet antibiotikum.
- at opnå ensartet besvarelse af resistensbestemmelsen på landsplan.

**S = Sensitiv** eller **Følsom**: Bakterien har ingen påviste resistensmekanismer mod pågældende antibiotikum, og behandling med dette antibiotikum i standarddosering forventes at have effekt.

**I = Indeterminant/intermediær**: Bakterien har nedsat følsomhed for pågældende antibiotikum, hvorfor effekt af behandling:

- kræver højere dosering eller at stoffet opkoncentreres på infektionsstedet (herunder ved anvendelse som lokalbehandling (fx inhalation))
- eller er uafklaret (= indeterminant)

For nogle antibiotika, hvor S- og R-populationerne ligger meget tæt på hinanden, anvendes I som en bufferzone, for at forhindre inkonsistens i laboratoriesvar.

I bør altid følges af en kommentar på laboratoriesvaret. Hvis anvendelse som *lokalbehandling* ønskes meddelt, kan anvendes betegnelsen: **L**.

**R = Resistent:** Bakterien har en eller flere signifikante resistensmekanismer, der betyder at infektion ikke kan forventes behandlet med pågældende antibiotikum.

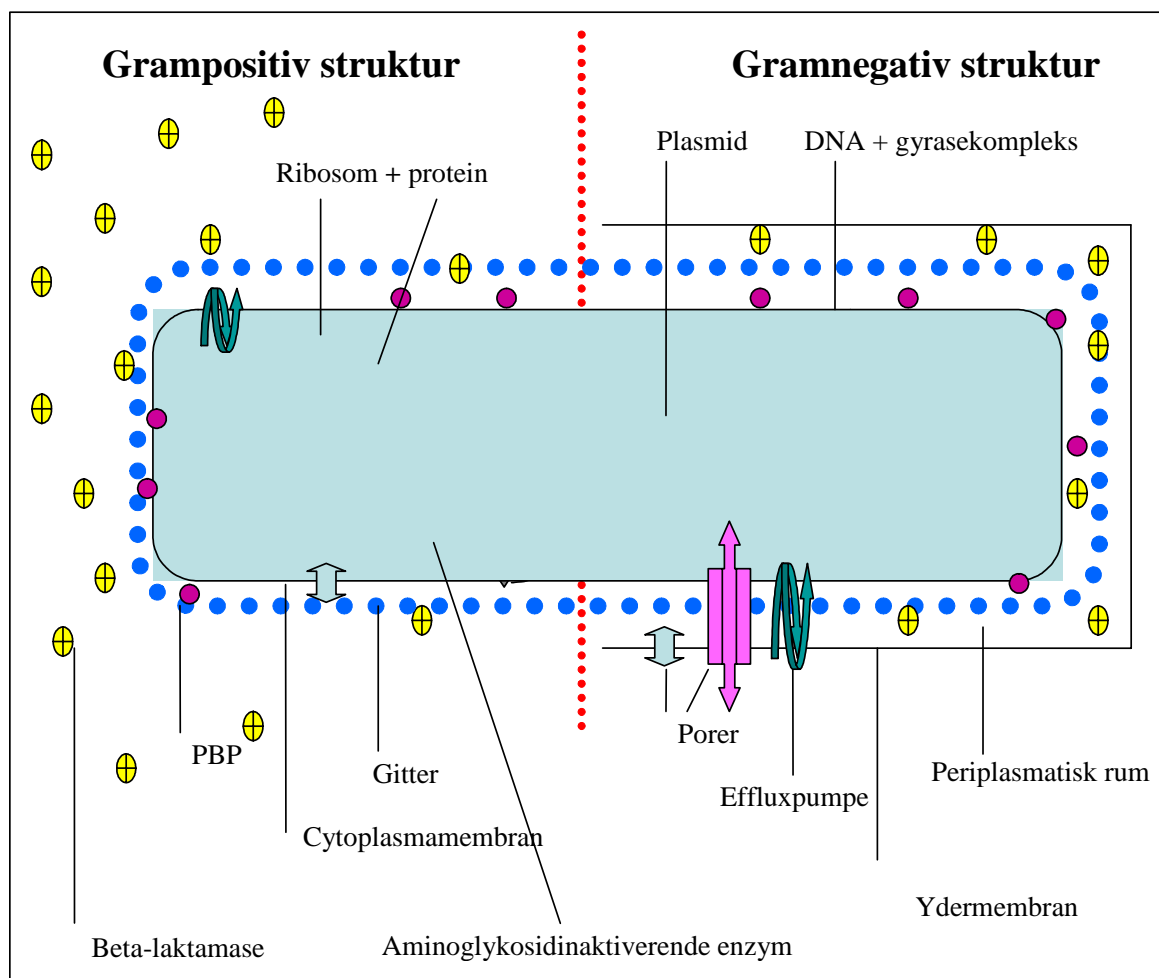
Til dette formål gives her forslag til brydepunkter, der bør anvendes i Danmark (Tabel 10).

### 3. De hyppigst anvendte antibiotikagrupper og deres resistensmekanismer.

Siden fremkomsten af sulfonamid, der var det første antimikrobielle middel til systemisk anvendelse mod infektioner hos mennesker, er der udviklet talrige nye antibiotika med vidt forskellige virkningsmekanismer. Et fællestræk er, at antibiotika fortrinsvis virker på synteseveje og bakteriestrukturer, som enten ikke eksisterer i humane celler (fx cellevæg og DNA-gyrase) eller adskiller sig i opbygningen (fx ribosomer).

**Figur 1.**

Opbygningen af den grampositive (til venstre for den røde stiplede linje) og den gramnegative (til højre) bakteries cellevæg med angivelse af de forskellige antibiotikas angrebepunkter samt andre strukturer, der har betydning for resistensudvikling. Symbolikken er ens på begge sider. Hos gramnegative bakterier består cellevæggen af en cytoplasmamembran, en ydre membran og et mellemliggende periplasmatiske rum med en gitterstruktur af peptidoglycan. Grampositive bakterier mangler den ydre membran. PBP = penicillin bindende protein.



De enkelte stoffer i en antibiotikagruppe kan have vidt forskelligt antibakterielt spektrum, fx afhænger  $\beta$ -laktamantibiotikas antibakterielle effekt til dels af deres evne til at binde sig til de forskellige PBP, se Figur 1. Angrebepunkt og virkningsmekanismer er anført i Tabel 2 for de vigtigste antibiotikagrupper.

**Tabel 2:**

Antibiotikas virkningsmekanismer og bakteriedræbende egenskaber, i.e. baktericid ~ dræber bakterien; bakteriostatisk ~ hæmmer bakteriens vækst.

Antibiotika gruppe	Angrebepunkt i bakterien	Mekanisme	Effekt på bakterien
$\beta$ -laktam	Penicillin Bindende Protein	hæmning af cellevægsyntese	baktericid
glykopeptid	cellevæg	hæmning af cellevægsyntese	baktericid
aminoglykosid	ribosom	irreversibel proteinsyntesehæmning	baktericid
makrolid	ribosom	reversibel proteinsyntesehæmning	bakteriostatisk
kinolon	DNA-gyrase/topoisomerase	interferens med DNA-replikation	baktericid
sulfonamid, trimethoprim	purin- og pyrimidin stofskiftet	reversibel proteinsyntesehæmning	bakteriostatisk
oxazolidinon	t-RNA's binding til ribosom	reversibel proteinsyntesehæmning	bakteriostatisk
nitroimidazol	DNA	DNA-destabilisering	baktericid

Bakterier kan være **naturligt resistente** over for visse antibiotika (oprindeligt, naturlig resistens), enten fordi de mangler det rette angrebepunkt (fx har *Mycoplasma* spp. ingen cellevæg og er derfor resistente over for  $\beta$ -laktamantibiotika) eller fordi de for-

hindrer et antibiotikum i at nå sit angrebepunkt (fx er ydermembranen hos gramnegative bakterier næsten uigennemtrængelig for en del antibiotika, Figur 1). Den oprindelige naturlige resistens er anført i Tabel 3 for de bakteriearter, der hyppigst forekommer i klinisk prøvemateriale.

### **Tabel 3**

**Eksempler på genuin, naturlig resistens i almindeligt forekommende potentielt patogene bakterier.**

**R = resistent.**

	β-laktamantibiotika								Genta- micin	Sulfa- trim	Tetra- cyklin	Poly- myxin
	Peni- cillin	Me- thi- cillin	Ampi- cillin	Cefu- roxim	Cefo- taxim	Cef- ta- zidim	Aztre- onam	Imi- penem				
<i>Escherichia coli</i>	R	R										
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R									
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R									R	R
<i>Salmonella</i> spp	R	R										
<i>Ps. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R					R		
<i>Neisseria</i> spp		R										
<i>Staphylococcus aureus</i>							R					R
<i>Strep. tococcus pneumoniae</i>		R					R		R			R
<i>Enterococcus faecalis</i>		R		R	R	R	R		R	R		R

**Erhvervet resistens** er udvikling af resistens hos en tidligere følsom bakterie. Bakterier tilpasser sig hele tiden miljøet, også et antibiotikaholdigt miljø, ved ændringer i deres arvemasse, fx ved mutationer eller ved overførsel af resistensgener fra resistente bakterier til de følsomme. Hvis antibiotika er til stede i så lave koncentrationer,

at det ikke slår bakterierne ihjel men tillader dem at dele sig, vil det i særlig grad fremme væksten af de bakterier, der tilfældigt er modstandsdygtige over for det pågældende antibiotikum, mens de helt følsomme bakterier vil dø ud. Herved sker der en **selektion** af resistente bakterier. I klinisk sammenhæng kan dette fx forekomme i gastrointestinalkanalen, på huden, i vanskeligt penetrerbare infektionsfoci, abscesser eller biofilm omkring fremmedlegemer. Risikoen for resistensudvikling varierer meget for forskellige bakteriearter og for typen af antibiotikum. Men **generelt medfører et stigende antibiotikaforbrug øget hyppighed af resistens**. Konsekvensen bliver behandlingssvigt og anvendelse af mere bredspektrede antibiotika. Når antibiotikabehandlingen ophører, vil der heldigvis ofte ske det, at de normale, følsomme bakterier overvokser de resistente bakterier, som pga. deres ændrede egenskaber ikke kan klare sig i konkurrencen med de følsomme bakterier.

Bakteriers erhvervede resistensmekanismer kan groft inddeles i tre typer (jævnf. Figur 1 og Tabel 2), evt. i forskellige kombinationer, desuden kan der være krydsresistens (dvs. resistens over for flere forskellige medlemmer af en antibiotikagruppe):

### 3.a. Ændring af antibiotikas angrebepunkt

β-laktamantibiotikas angrebepunkt, PBP, er enzymer, som deltager i opbygning af cellevæggen. Resistens pga. ændring i struktur, antal eller type af PBP dominerer hos grampositive bakterier.

Aminoglykosider og makrolider bindes til ribosomer og hæmmer proteinsyntesen, og deres virkning kan ophæves ved ændring i bakteriers ribosomstruktur, fx opstået ved mutation.

Kinolonresistens ses hyppigst som følge af mutationer i gener, der koder for bakteriens DNA-gyrase/topoisomerase. Antallet af mutationer er i reglen proportional med graden af resistens. Let nedsat følsomhed kan være vanskeligt at detektere fx hos *Salmonella*, hvor nalidixansyre har vist sig at være bedst til at detektere fluorokinolon-resistens.

Sulfonamid ligner para-aminobenzoesyre og virker ved konkurrencehæmning af enzymet dihydropteroate synthase, der indgår i folinsyresyntesen. Resistens ses hos bakteriearter, der har udviklet varianter af enzymet eller mangler det.

Trimetoprimresistens ses hos arter med en variant af dihydrofolat-reduktase.

Genetik: Gener for antibiotikas angrebepunkt er som regel beliggende på kromosomet og denne type resistens overføres normalt ikke til andre bakteriestammer, så spredning af i hospitalsmiljøet kræver selektion og direkte spredning af de resistente bakterier. Sulfonamid- og trimethoprim resistensgener ligger imidlertid ofte på overførbare plasmider.

### 3.b. Impermeabilitet / efflux

Skyldes enten en nedsat penetration af antibiotikum over cellemembranen eller en energikrævende transport af antibiotikum ud af bakteriecellen (effluxmekanisme). Effluxgener koder bl.a. for eksterne receptorer, der binder molekyler, som cellerne har nytte af, men som også kan være både antibiotika og andre lægemidler. Effluxmekanismerne er i nogle tilfælde yderst selektive i valg af molekyler men er ellers relativt uspecifikke. In- og efflux mekanismer er koblete og kan være vanskelige at påvise, da de ofte kun medfører let nedsat følsomhed. Typisk rammes flere antibiotikagrupper samtidig, fx tetracyclin, kinoloner,  $\beta$ -laktamantibiotika og aminoglykosider.

Genetik: Oftest kromosomale gener, men kan også være placeret på plasmider.

### 3.c. Enzymatisk inaktivering af antibiotika

$\beta$ -laktamantibiotika kan hydrolyseres af bakterielle enzymer,  $\beta$ -laktamaser. Grampositive bakterier udskiller  $\beta$ -laktamaser til omgivelserne, hvorimod gramnegative bakterier opkoncentrerer enzymerne i det periplasmatiske rum (Figur 1). Detektion af denne type resistens kan være vanskelig, da enzymaktiviteten er variabel. Det vil ofte være en fordel at teste bakteriers følsomhed over for et ældre antibiotikum af klassen, fx penicillin, ampicillin, mecillinam eller cefalothin. Der er efterhånden beskrevet flere hundrede  $\beta$ -laktamaser med forskellig evne til hydrolysering af  $\beta$ -laktamantibiotika. Nogle er artsspecifikke, andre i mindre grad eller slet ikke.

Aminoglykosider kan inaktiveres af cytoplasmatiske enzymer, der bindes til en eller flere  $-OH$  eller  $-NH_2$  grupper.

Genetik: Resistensgenerne for enzymatisk inaktivering af antibiotika kan være lokaliseret på kromosomet, eller en udveksling af resistensfaktorer kan ske ved

overførsel af plasmider eller andre mobile DNA elementer mellem stammer af samme art og til dels mellem forskellige bakteriearter.

### **3.d. Krydsresistens og ko-resistens.**

Krydsresistens er normalt betegnelsen for bakteriers resistens over for forskellige antibiotika i *samme* gruppe med samme virkningsmekanisme, fx grampositive bakteriers resistens over for erythromycin, clarithromycin, azithromycin og roxithromycin.

Ko-resistens ses hos nogle bakterier som resistens over for antibiotika fra *forskellige* grupper af antibiotika, og kan fx skyldes impermeabilitet. Flere af ovennævnte mekanismer kan optræde koblet. Bakterierne er da ofte multiresistente, altså resistente over for mange forskellige antibiotika. Ko-resistens opstår hyppigst i gastrointestinalkanalen, på hud og slimhinder eller i vanskeligt penetrerbare foci ved overførsel af plasmider.

#### 4. Metoder til resistensbestemmelse.

Resistensbestemmelse af mikroorganismer foregår enten ved bestemmelse af MIC eller indirekte ved bestemmelse af en hæmningszone ved agardiffusion. MIC-bestemmelse udgør standarden for resistensbestemmelse. MIC-bestemmelse er kostbar og / eller arbejdskrævende, specielt hvis mange stammer skal undersøges. Som følge heraf anvendes disk-/tabletdiffusion som rutinemetode i såvel Danmark som i resten af Skandinavien og en stor del af Europa og resten af Verden. Metoden er en semikvantitativ, men indirekte resistensbestemmelse; tolkningen af hæmningszonens størrelse i følsomhedsgrupperne S, I eller R hviler på samme principper som MIC-bestemmelse.

##### **4. a. Disk- /tabletdiffusion:**

Da der ikke er væsentlige metodeforskelle, hvad enten man anvender disk eller tabletter, vil metoden i det følgende blive omtalt som diskdiffusion.

Diskdiffusion udføres ved at en agarplade tilsås med en bakteriekultur og efter kortvarig tørring pålægges en eller flere disks indeholdende antibiotika, og pladen inkuberes i 18 – 24 timer. Antibiotikum vil under inkubationen diffundere ud i agarmediet, og der dannes en hæmningszone, hvis bakterien er følsom for det pågældende antibiotikum. Dannelsen af hæmningszonen sker i et samspil mellem antibiotikums diffusion og bakteriekulturens fremvækst. Der eksisterer således i) en *kritisk antibiotikumkoncentration* som lige netop hæmmer bakterievæksten, ii) et *kritisk bakterietal* som er det bakterietal, der giver synlig vækst samt iii) en *kritisk tid*, den tid det tager at danne det kritiske bakterietal. Den kritiske antibiotikumkoncentration er ydermere direkte afhængig af mængden af bakterier (inokulum), idet antallet af bakterier vil påvirke den mængde antibiotikum, der er nødvendig for hæmning. Der er således et konkurrenceforhold: jo tættere inokulum, desto mindre hæmningszone. Matematisk kan det beskrives på følgende måde: Er  $c$  koncentrationen i afstanden  $r$  fra centrum af disken, vil koncentrationsfaldet  $dc$  over stykket  $dr$  være proportionalt med  $c$  og med tilvæksten i cirkelns areal  $= d(\pi r^2)$ , heraf:

(i)  $dc/c = -k d(\pi r^2)$  eller:

(ii)  $d \ln c = k \pi dr^2$  . ( $k$  er en proportionalitetsfaktor).

Heraf fås:

$$(iii) \ln c (= \ln \text{MIC}) = \ln c_o - k \pi r^2 ,$$

hvor  $c_o$  er koncentrationen i pladen ved disken. Det ses således, at der er en matematisk forklaring på korrelationen mellem MIC- og zonestørrelsen. Zonegrænsen dannes netop der, hvor koncentrationen i agarpladen svarer til MIC-værdien. Desto mindre MIC er (mere følsom), jo større bliver zonen omkring disken.

I Tabel 4 er nævnt en række af de faktorer, der påvirker dannelsen af hæmningszonen. Det skal fremhæves, at flere af disse er indbyrdes relateret!

Det fremgår af ovennævnte, at for at opnå reproducerbare resultater kræves en **høj grad af standardisering**. En række af faktorerne nævnt i Tabel 4 kan anses for konstante for det enkelte antibiotikum testet på et standardmedie overfor en bakteriekultur fra dag til dag, mens andre er mere eller mindre variable.

Det er et ufravigeligt krav, at det anvendte medie understøtter **god vækst** for at få en pålidelig resistensbestemmelse. Det er i talrige forsøg vist, at foruden kravet om anvendelse af et godt vækstmedie, er **inokulums størrelse den absolut mest betydningsfulde enkeltfaktor**. Det er som følge heraf specielt vigtigt, at inokulum er standardiseret. Dette gøres bedst ved anvendelse af bakterieopslemninger, der er justeret til en given bakterietæthed målt som OD (optical density) værdi.

I Danmark og resten af Skandinavien anvendes et **inokulum**, der resulterer i **semikonfluerende vækst**. Dette er defineret som vækst, hvor enkeltkolonierne er sammenstødende, men ikke sammenflydende ("skulder ved skulder"). I mange lande inklusive USA er der tradition for anvendelse af inokulum, der giver konfluerende vækst, fx Kirby-Bauers metode. Fordelen ved semikonfluerende vækst er, at det direkte visuelt kan kontrolleres om inokulum har været perfekt. Anvendelse af stort inokulum er til gengæld bedre til at påvise resistente sub-populationer.

Almindeligvis anvendes inkubation natten over i atmosfærisk luft for ikke-kræsne aerobe bakterier. Ved **aflæsning** er det vigtigt, at der måles så tæt på agaroverfladen som muligt for at undgå parallaksefejl. **Zonegrænsen** er ikke altid skarpt aftegnet, hvilket især ses ved bakteriostatiske antibiotika. Området med partiel vækst kan være på flere millimeter, hvorfor **hæmningszone** kan aflæses som: komplet hæmning (100 %), 80 % eller ingen hæmning. For **gramnegative** bakterier er aflæsning til fuld

vækst det mest reproducerbare, mens for **grampositive** bakterier, der har mindre kolonier, er det 80 % alternativt 50 % hæmning, der er den mest reproducerbare aflæsningsmetode. Ved undersøgelse for methicillin-resistens hos stafylokokker og vancomycin-resistens hos enterokokker aflæses svarende til komplet hæmning for ikke at overse resistente subpopulationer.

Lejlighedsvis vokser der enkeltkolonier inde i hæmningszonen. Tolkningen heraf afhænger af det pågældende antibiotikum. Disse repræsenterer oftest resistente mutanter (fx aminoglykosider), men kan også være såkaldte "**persisters**" (fx mecillinam), som ved gentagelse af resistensbestemmelsen fremtræder som følsomme.

I en række tilfælde må testforholdene justeres i form af brug af specielle medier, ændrede inkubationsforhold fx inkubation i CO<sub>2</sub>, eller under anaerobe forhold, og /eller ændret inkubationstid fx fulde 24 eller 42-48 timer.

Ovennævnte principper bygger på resistensbestemmelse af renkulturer, såkaldt **sekundær resistensbestemmelse**. Dette medfører, at der først kan foretages resistensbestemmelse dagen efter, at der er vækst fra en prøve. I Danmark har der været en lang tradition for at udføre **primær resistensbestemmelse**, det vil sige at resistensbestemmelsen udføres direkte fra prøvematerialet. Dette har den fordel, at man ofte kan give svar et døgn tidligere end ved anvendelse af sekundær resistensbestemmelse. En yderligere fordel ved primær resistensbestemmelse er, at den ofte er et vigtigt hjælpeværktøj både til adskillelse af forskellige bakteriearter i en prøve og til artsbestemmelse. På den anden side kan prøver indeholde forskellige bakteriearter med risiko for at en art påvirker resistensbestemmelsen af en anden art. Som eksempel kan nævnes resistensbestemmelse af  $\beta$ -hæmolytiske streptokokker for penicillin ved samtidig tilstedeværelse af  $\beta$ -laktamase producerende *S. aureus*.

Under alle omstændigheder må der foretages sekundær resistensbestemmelse, hvis der er tvivl om resistensforholdene. Resultater opnået ved primær resistensbestemmelse kan sjældent anvendes til kvalitetssikrings- eller systematiske overvågningsdata, da inokulum ikke er standardiseret.

#### **Tabel 4:**

**Enkeltfaktorer der påvirker hæmningszonens størrelse og dermed følsomhedsbestemmelsen**

---

Inokulum  
Bakteriens generationstid  
Nødvendigt antal bakteriedelinger for synlig vækst  
Varighed af lag-fase (tiden til eksponentiel vækst starter)  
Mængden af antibiotikum i depot  
Fysisk-kemiske forhold, der påvirker effekten af antibiotikum  
(fx: proteinbinding, pH, chelat-dannere, divalente kationer)  
Molekylestørrelse af antibiotikum  
Medie – skal give anledning til god vækst!  
Agarmediets viskositet  
Agarmediets tykkelse  
Inkubationstemperatur  
Inkubationstid  
Stakhøjde af agar plader i inkubatoren

---

Som nævnt i Tabel 4 influerer en række **fysisk-kemiske forhold** på antibiotikas aktivitet fx proteinbinding, pH, indhold af divalente kationer ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ), og chelatdannende stoffer. Dette skyldes, at **kun den frie fraktion af det ikke-ioniserede antibiotikum er aktiv**. Stærkt proteinbundne antibiotika (> 90% proteinbinding) vil således have mindsket aktivitet, når de undersøges på medier, der indeholder blod. Ligeledes vil ændring af pH fx ved inkubation i  $\text{CO}_2$ , der medfører fald i pH, medføre ændret aktivitet af en række antibiotika fx nedsat aktivitet af makrolider og aminoglykosider, mens tetracyclin udviser øget aktivitet. Teoretisk er det optimalt at teste bakterierne ved det pH, der er på infektionsstedet. Dette er imidlertid ikke praktisk muligt, og det har vist sig, at resistensbestemmelse ved neutral pH (7.2-7.4) er korreleret til klinisk behandlingseffekt.

Resistensbestemmelse ved diffusionsmetoden er først og fremmest billigere at udføre end MIC-bestemmelse, men giver samtidig den fordel, at man ved undersøgelse af mange forskellige antibiotika på samme plade opnår, at man aflæser et **resistensmønster**, der hos en erfaren aflæser kan bekræfte en bestemt **resistenstype** eller

give mistanke om, at der foreligger en afvigelse enten i form af en sjælden resistensmekanisme eller måske tekniske problemer. Karakteristiske resistensmønstre kan også bruges som epidemiologiske markører, dvs. give mistanke om spredning fra patient til patient ved hospitals-infektioner.

Specifik sammensætning af antibiotika kan også kategorisere mekanismen bag en resistens, såkaldt **interpretativ resistensbestemmelse**. Viden om naturlig eller genuin resistens bruges rutinemæssigt i laboratoriet til hjælp ved diagnosticering af bakteriearter (se Tabel 3). Fx anvender de fleste danske klinisk mikrobiologiske afdelinger resistensbestemmelse over for polymyxin (selv om det ikke meddeles i prøvesvaret) til artsbestemmelse af *Proteus* arter samt adskillelse af *S. aureus* fra koagulase-negative stafylokokker. I Tabellerne 5-8 er vist eksempler på resistensmønstre, der kan hjælpe til klassifikation af bakteriers resistensmekanisme – dette udnyttes i laboratorierutinen som baggrund for hurtig diagnose af bakterien samt dens resistensegenskaber.

Tabel 5 illustrerer, hvordan resistensmekanismen over for  $\beta$ -laktamantibiotika hos *Haemophilus influenzae* og *M. catarrhalis* kan afdækkes ved hjælp af resistensbestemmelse over for 3 forskellige  $\beta$ -laktamantibiotika. Ligeledes vises i Tabel 6 hvordan de forskellige makrolid-resistens genotyper hos *Streptococcus pyogenes* kan påvises ved hjælp af 3-4 forskellige makrolid antibiotika.

**Tabel 5**

*Haemophilus influenzae* og *Moraxella* arters følsomhed for penicillin, ampicillin og visse cefalosporiner afhængig af deres resistensegenskaber.

Bakterieart	Penicillin-G, Penicillin-V	Ampicillin, Amoxicillin	Amox/Clav <sup>a</sup> Cefuroxim, Cefaclor
<i>H. influenzae</i> , følsom	PenG: S PenV: R	S	S
<i>H. influenzae</i> , +β-laktamase	R	R	S
<i>H. influenzae</i> , -β-laktamase, PBP-ændring	R	R	R
<i>Moraxella</i> , følsom	S	S	S
<i>Moraxella</i> , +β-laktamase	R	R	S

<sup>a</sup>) amoxicillin + clavulansyre

**Tabel 6**

Makrolider, klindamycin og streptograminer: Resistensegenskaber hos hæmolytiske streptokokker og pneumokokker. Antal ringe i makrolidmolekylet i parentes.

Resistens- Betegnelse	Erythro-(14) , Roxi- (14), Clarithro- (14), Azithromycin (15)	Spiramycin (16)	Klindamycin	Streptogramin B (Quinopristin)	Streptogramin A + B (Synercid)
<i>ErmB</i> <sup>1</sup> MLS-B <sup>2</sup> <i>konstitutiv</i>	R	R	R	R	S
<i>ErmB</i> <sup>1</sup> MLS-B <sup>2</sup> <i>inducerbar</i>	R	R	I -> R <sup>3</sup>	R	S
<i>ErmTR</i> <sup>1</sup> MLS-B <sup>2</sup> <i>inducerbar</i>	R	I -> R	I -> R	R	S
<i>MefA</i> <sup>1</sup>	R	S	S	S	S

<sup>1</sup> betegnelsen for genet for resistensmekanismen, erm ~ændring i methylase, mef ~ efflux-mekanisme

<sup>2</sup> klassifikation, M=makrolid, L=lincosamin, S=streptogramin

<sup>3</sup> induration I makroliddisk-/tabletzonen induceret af klindamycin-disk/tabletten

Tabel 7 demonstrerer, hvordan *Enterobacteriaceae* kan inddeles i  $\beta$ -laktamase resistensklasser vha. artsdiagnose og resultaterne af resistensbestemmelse mod 6 forskellige  $\beta$ -laktamantibiotika. Valg af antibiotikabehandling vil også følge denne klassificering.

**Tabel 7:**

Beta-laktamantibiotika og *Enterobacteriaceae*: følsomhedsbestemmelse relateret til  $\beta$ -laktamaser og species

Antibiotikum		Ampicillin	Carbenicillin	Cefuroxim	Cephalothin	Aztreonam	Cefoxitin
<b>Ikke beta-laktamase dannere:</b> <i>E. coli, Shigella, Salmonella, P. mirabilis</i>	Aflæsning	zone	zone	zone	zone	zone	zone
	Tolkning	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Kromosomal cefalosporinasedannere:</b> <i>C. freundii, H. alvei, E. coli</i> (5% af stammer), <i>E. cloacae, E. aerogenes, M. Morganii, S. marcescens, P. rettgeri</i> (hæmmes ikke af clavulansyre)	Aflæsning	ingen-, lille zone	zone	zone (resistente subpopulationer ved stort inokulum)	ingen zone	zone (resistente subpopulationer ved stort inokulum)	lille zone, (inducerer $\beta$ -laktamaseproduktion og påvirker nabo-zoner)
	Tolkning	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Kromosomal ampicillinase-dannere:</b> <i>K. pneumoniae</i> , (hæmmes af clavulansyre)	Aflæsning	ingen zone	ingen-, lille zone	zone	zone	zone	zone
	Tolkning	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Kromosomal ampicillinase- + cefalosporinasedannere:</b> <i>P. vulgaris, K. oxytoca, visse Serratia, C. koseri</i> (hæmmes af clavulansyre)	Aflæsning	ingen zone	ingen-, lille zone	ingen zone	ingen zone	zone	zone
	Tolkning	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R*</b>	<b>R</b>
<b>Plasmid-bårne ampicillinasedannere:</b> <i>E. coli</i> (30% af species i DK), <i>P. mirabilis, Salmonella sp</i> , men sjældent andre EB, (hæmmes af clavulansyre),	Aflæsning	ingen zone	ingen zone	zone	zone	zone	zone
	Tolkning	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Plasmid-bårne ampicillinase-+cefalosporinasedannere (ESBL); angriber ampicillin, cefotaxim, cef-tazidim og ceftriaxon</b> <i>E. coli, Klebsiella</i> sjældent andre EB (hæmmes af clavulansyre)	Aflæsning	ingen zone	ingen zone	variabel zone	variabel zone	variabel zone	zone
	Tolkning	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>		<b>S</b>

\* *P. vulgaris* og *C. koseri* dog S for aztreonam. ESBL= extended-spectrum-beta-laktamase producers. EB = enterobakterier.

Kilde: Per Søgaard, Disputats; David Livermore m.fl.

På lignende måde kan resistens over for et eller flere af 7 aminoglykosider angive, hvilken type aminoglykosidresistensmekanisme en stamme indeholder (Tabel 8). Bakterier kan imidlertid indeholde flere resistensenzymmer, hvilket vanskeliggør fænotypisk resistensbestemmelse. I de tilfælde, hvor stammens reaktionsmønster ikke passer i skemaet, eller hvis man vil sikre sig diagnosen, må man anvende DNA-analyse.

**Tabel 8.**

De mest almindelige aminoglykosid modificerende enzymer og deres resistensfænotype i kliniske bakterieisolater I Danmark

Enzym	Bakterieart	Ami-kacin	Genta-micin	Kana-mycin	Neo-mycin	Netil-micin	Siso-mycin	Tobra-mycin
Normal	<b>Enterobacteriaceae</b>	S	S	S	S	S	S	S
AAC(3)-I <sup>a</sup>	<i>Enterobacteriaceae</i>	S	R	S	S	S	R	S
AAC(3)-II	<i>Enterobacteriaceae</i>	S	R	S	S	I/R	R	I/R
AAC(3)-V	<i>Enterobacteriaceae</i>	S	R	I/S	I/S	I/R	-	I/R
AAC(2')	<i>Providencia</i>	S	R	S	I/R	I/R	R	I/R
AAC(6')-I	<i>Enterobacteriaceae</i>	R	S/R	I/R	R	R	R	R
ANT(2'')	<i>Enterobacteriaceae</i>	S	R	R	S	S	R	R
APH(3')	<i>Enterobacteriaceae</i>	S	S	R	I/R	S	S	S
ANT(4',4'')	<i>Staphylococcus</i>	R	S	R	R	S	S	R
AAC(6')+ APH(2'')	<i>Staphylococcus</i>	I	R	R	S	S	R	R
AAC(6')+ APH(2'')+ APH(3')	<i>Staphylococcus</i>	I	R	R	R	I	R	R
ANT(2'')+ APH(3')	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	I	I	R	R

<sup>a</sup>, acetyltransferase <sup>b</sup>, adenylnukleotidase <sup>c</sup>, acetylphosphorylase

Over for visse antibiotika er diffusionsmetoder ikke i stand til at adskille den følsomme fra den (lav)resistente population. I nogle af disse tilfælde kan dette dog gøres ved at

**teste for et svagere antibiotikum** i samme klasse. Screening for penicillin resistens hos pneumokokker sker ved resistensbestemmelse over for oxacillin med efterfølgende MIC-bestemmelse af resistente stammer til at afgøre SIR klassifikation. Ligeledes kan en lille stigning i ciprofloxacin MIC hos *Salmonella spp.* og visse *Enterobacteriaceae* bedst detekteres ved påvisning af resistens over for nalidixansyre. Nogle resistensmekanismer erkendes bedst ved direkte påvisning af resistensgenet. Eksempler er påvisning af methicillinresistens hos stafylokokker, *mecA* genet, samt vancomycinresistens, *vanB* genet, hos enterokokker. Genetiske test med påvisning af resistensgenet er væsentlig mere præcise end konventionel hæmningszone- eller MIC-bestemmelse. Direkte påvisning af  $\beta$ -laktamase anvendes rutinemæssigt ved resistensbestemmelse af *H. influenzae*, *M. catarrhalis* samt *N. gonorrhoeae* over for penicilliner.

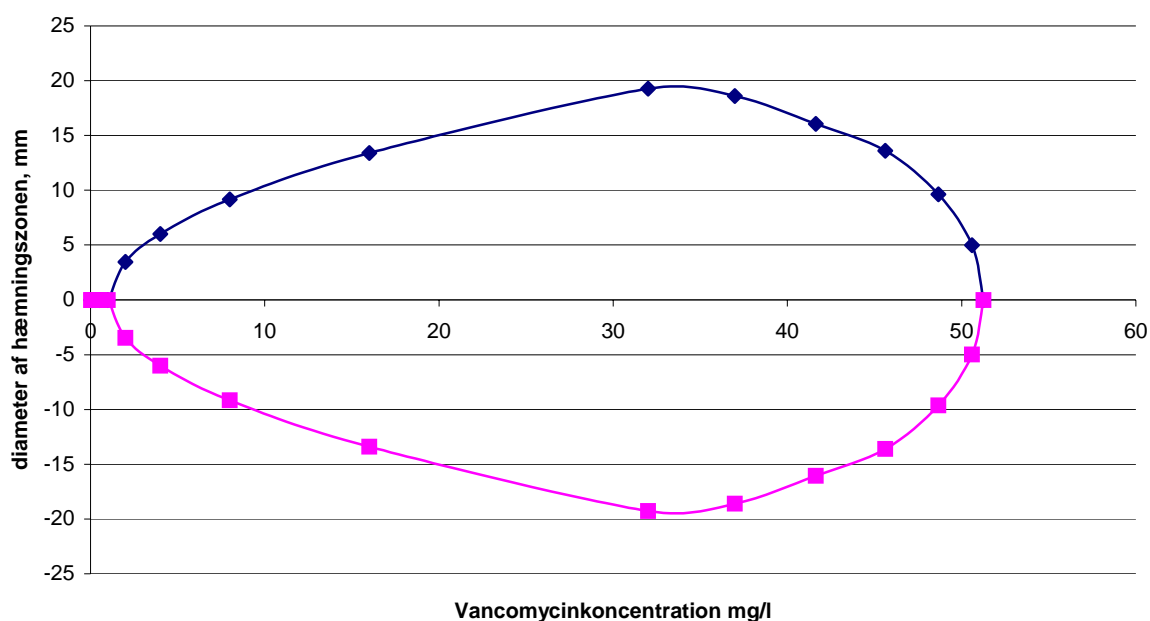
#### 4.b. MIC-bestemmelse

Udførelse: Bestemmelse af MIC i form af **agar- eller bouillonfortynding** er som tidligere nævnt referencemetoderne for *in vitro* bestemmelse af en bakteries antibiotikafølsomhed. Princippet ved MIC-bestemmelse er, at bakteriestammen undersøges for vækstevne på agar eller i bouillon indeholdende antibiotikum i to-folds fortyndingsrækker. **MIC-værdien er den laveste koncentration, der forhindrer vækst inden for en defineret tidsperiode.** Fortyndingsrækken laves enten i bouillon, oftest i mikroformat i en mikrotiter-bakke eller ved agarfortyndingsrække. Ved sidstnævnte metode kan man undersøge  $\geq 20$  bakteriestammer ad gangen på samme agarplade. Som nævnt under diffusionsmetoder er det et krav, at det anvendte medie samt inkubationsforhold understøtter god vækst af den bakterie, der skal undersøges. MIC-bestemmelsen er påvirkelig af de samme faktorer som er nævnt i Tabel 4, hvor inokulum er den mest betydende enkeltfaktor. Følgende inokula giver ækvivalente MIC-værdier ( $\pm$  et tofolds fortyndingstrin) for de 2 metoder: Bouillonfortynding:  $5 \times 10^5$  CFU (Colony Forming Units)/ml; agar fortynding:  $1-2 \times 10^4$  CFU/dråbe.

MIC er ved agarfortynding defineret som den koncentration, hvor der er sket en fuldstændig hæmning af synlig vækst, dvs. man ser bort fra en enkelt koloni eller slør, hvor inokulum er placeret. Der er imidlertid generelt enighed internationalt om at defi-

nere MIC som den laveste koncentrationen, hvor der vokser  $\leq 1$  koloni. Ved bouillonfortynding aflæses MIC som den koncentration, der er i første glas uden uklarehed. Ud over de to ovennævnte fortyndingsmetoder findes der en 3. metode, **E-test** (AB Biodisk, Solna Sverige) som bygger på gradientdiffusion. E-test er en plastic strip, hvorpå der er afsat antibiotika i geometrisk stigende koncentration. Med geometrisk stigende koncentration i depotet giver formel (i) på side 14 en parabel. Dette afsløres ved aflæsningen af E-testen, som viser en parabelformet væksthæmning afsluttet med en halvcirkel (se Figur 2), hvor MIC-værdien aflæses direkte på strippen. E-test er standardiseret til udførelse ved inkulum svarende til konfluerende vækst (dette giver MIC-værdier der er ækvivalente med MIC-værdier ved agar- og bouillonfortynding). Aflæsning sker til nærmeste øvre værdi, men rapporteres som nærmeste øvre 2-fold fortyndingstrin, således at den altid er sammenlignelig med andre MIC-bestemmelser udført med to-fold fortyndingstrin. Man skal være opmærksom på, at der ud over faktorerne nævnt i Tabel 4 er særdeles mange særregler for udførelse og aflæsning af E-test. E-test valideringer er med få undtagelser primært foretaget på Mueller-Hinton mediet, hvorfor man ikke uden forudgående undersøgelser bør udføre testen på andre medier.

Figur 2. E-test (Vancomycin) med *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok).



Ved bouillon-metoden kan man endvidere bestemme **MBC (den minimale baktericide koncentration)**. Denne defineres som den laveste antibiotikumkoncentration, der reducerer inokulum med en faktor 1.000. Dvs. at bakterieindholdet i inokulum skal bestemmes nøjagtigt, samt at det kræver kvantitativ udsåning fra bouillon fra MIC-bestemmelsen for at bestemme, hvor mange kolonier (= bakterier), der er tilbage. Computerbaseret artsbestemmelse og resistensbestemmelse af ikke-kræsne bakterier vinder efterhånden frem. Fra renkultur foretages automatiseret inokulation, inkubation, aflæsning og/eller tolkning af resultatet. Specielt automatisering af aflæsning har tidligere været et problem, men de systemer, der er fremkommet inden for de senere år, synes mere pålidelige over for renkulturer af homogent resistente bakteriearter. Flere af disse systemer er desuden i stand til at foretage resistensbestemmelse indenfor 6-8 timer samtidig med at de foretager artsbestemmelse og muliggør derved samme dags besvarelse.

#### **4.c. Kvalitetskontrol (QC):**

Uanset hvilken af ovennævnte metoder der anvendes, er en høj grad af **standardisering** nødvendig for, at opnå reproducerbare og pålidelige resultater. Til kontrol af det samlede resultat er hyppig anvendelse af stammer med kendt følsomhed – **kvalitetskontrol** stammer – nødvendige. Selv under optimale forhold er minimumsvariationen for den samme stamme  $\pm$  et tofolds fortyndingstrin for MIC-metoderne og 5-8 mm ved agardiffusion, og det er ikke unormalt, at gennemsnits zonediameteren for én stamme testet løbende (fx daglig) af flere forskellige personer har et udsving på 10 mm.

Resistensbestemmelse af mikroorganismer er uanset metoden en vanskelig proces, der afhænger af en lang række faktorer: dyrkningsmåden, mediet, antibiotikadysken mm. Det er derfor uhyre vigtigt nøje at følge standarden af ens følsomhedsmetode, og til dette formål findes en lang række forslag og hjælpemidler. Det er ligeledes vigtigt, at personalet er uddannet – og kontinuerligt opdateres - til udførelse af undersøgelsen.

### Metoder til QC-kontrol:

1) Intern QC med referencestammer: Den bedste måde kontinuerligt at overvåge laboratoriets resistensbestemmelsesmetode er regelmæssigt at undersøge referencestammer i rutinen. Referencestammer vil oftest være internationalt anerkendte stammer fra anerkendte stammekollektioner (ATCC, NCCLS osv.), hvor der findes publicerede grænser for acceptable zonestørrelser. Stammevalget kan baseres på hyppigheden af de pågældende arter (fx *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* o.l.) og/eller anvendelse af stammer med specielle resistensforhold, som kan volde vanskelighed i rutinen (fx vancomycin-resistente enterokokker, penicillin-resistente pneumokokker e.l.). Stammerne bør testes over for hele det udvalg af antibiotika, der indgår i rutinen og på alle relevante medier, inkubationsforhold osv.

Daglig kontrol på skift mellem hele personalet giver det mest aktuelle billede af rutinemethodens tilstand, og fungerer herved både som daglig kontrol af medier samt disks men på længere sigt også som udtryk dels for laboratoriet som helhed dels for hver enkelt bioanalytiker. Under alle omstændigheder skal der være regler for, hvordan laboratoriet skal reagere på afvigelser. Alle resultater indføres i laboratoriesystem (alternativt bogføres), således at den kumulerede viden kan anvendes til langsigtede kontrolforanstaltninger samt til undervisning af personalet. Ethvert laboratorie, der udfører resistensbestemmelse i klinisk øjemed, bør udføre intern QC.

2) Ekstern QC med ukendte stammer : De fleste danske laboratorier deltager i eksterne QC-programmer, hvor tilsendte stammer undersøges for følsomheds. Dette kræves ved akkreditering, og anbefales under alle omstændigheder ethvert laboratorium, der foretager resistensbestemmelser i klinisk øjemed.

3) Elektronisk dataovervågning: Ved indførelse af laboratorie-EDB-systemer er der mulighed for at kumulere de indtastede resistensbestemmelser og herigennem at overvåge, om der sker ændringer i systemet. Specielt hvis der registreres zonestørrelser, har man et kvantitativt mål for resistensbetømmelsen. Kumulerede histogrammer, der viser variationen i følsomhedstesten for hver antibiotikum/species kombination, vil give et overblik over metodens stabilitet (se [www.srga.org](http://www.srga.org) for eksempler)

## **5. Resistensbestemmelse af specielle mikroorganismer:**

### **5.a. Gærsvampe (*Candida* og *Cryptococcus* species).**

**Baggrund:** Behovet for resistens bestemmelse af *Candida* isolater er stigende. Dels på grund af forekomsten af flere systemiske svampeinfektioner end tidligere, dels fordi andelen af infektioner forårsaget af non-*albicans* isolater er øget. Resistens hos *Candida* skyldes dels øget forekomst af genuint resistente species, dels selektion af resistente mutanter blandt ellers følsomme species. Forskellige metoder til resistensbestemmelse er kommercielt tilgængelige, og i 1997 udkom en NCCLS reference metode med dertil hørende brydepunkter for en del men ikke alle antimykotika. Til denne reference metode er knyttet kvalitets kontrolstammer, der gør det muligt at kontrollere, at MIC-bestemmelser i eget laboratorium ligger på niveau med de værdier, der opnås med NCCLS reference metoden, således at tilsvarende brydepunkter kan anvendes.

**Metoder:** Der findes aktuelt to principielt forskellige metoder at foretage resistensbestemmelse for gærsvampe på. Agardiffusion (E-test og Rosco Neosensitabs) og bouillonfortyndingsmetode.

- Agardiffusionsmetoder har en umiddelbar fordel i at være rutinemetoder til resistensbestemmelse af bakterier. Metoderne er karakteriseret ved at være meget følsomme for inokulum, substratvalg, inkubationstid og temperatur. For specielt azolers vedkommende giver metoden ofte anledning til zoner, der er vanskelige at aflæse på grund af mikrokolonier i hæmningszonen. Dette har ført til regler for aflæsning af zonen afhængigt af om denne er klar, har gradvis overgang til mikrokolonier, om der er vækst helt til strip'en eller dobbeltzoner. Det er derfor nødvendigt at opnå en vis praktisk rutine og at inkludere kvalitets kontrolstammer, for at sikre reproducerbarhed og at MIC niveauet ligger i overensstemmelse med det, der opnås med NCCLS metoden. E-testen viser større overensstemmelse med NCCLS reference metoden end Rosco tabletdiffusionsmetoden.
- Bouillonfortyndingsmetoden (NCCLS Document M27-A) har en umiddelbar fordel i at inkludere en vækstkontrol i forhold til hvilken vækstreduktionen vurderes og at kunne udføres i mikrotiterbakker med aflæsning i ELISA reader, hvor-

ved variation i væksthastighed, standardisering af inokulum og person-til-person variation får mindre betydning. Også for bouillon metoden er der vanskeligheder med azol resistensbestemmelse, idet en del isolater udviser delvis vækstreduktion over et bredt koncentrationsområde – såkaldt trailing phenotype – betydningen af denne fænotype er ikke endeligt afklaret. I dyremodeller er isolaterne tilsyneladende følsomme, men omvendt er incidensen af ”trailing” isolater i nogle opgørelser stigende i takt med egentlig azol resistens, således at sådanne stammer muligvis rummer en større eller mindre minoritetspopulation. I kliniske opgørelser er der korrelation mellem stigende MIC og risiko for behandlings svigt.

**Konklusion:** Både agardiffusions - og bouillonfortyndingsmetoder vil formentlig være genstand for fortsat udvikling de nærmeste år, men resultaterne ved resistensbestemmelse er nu på et niveau, hvor de kan være til hjælp i valg af det mest hensigtsmæssige antimykotikum i en klinisk situation. Imidlertid er metoderne stadig behæftet med vanskeligheder, der betyder at specialviden og erfaring er nødvendig for at implementere metoderne i rutinefunktion. Mikrotiterbouillonmetoden har størst reproducerbarhed.

### **5.b. Anaerobe bakterier.**

**Baggrund:** Anaerobe bakterier er en ligeså heterogen gruppe som aerobt voksende bakterier, med varierende følsomheder overfor de fleste almindeligt anvendte antibiotika. Undtagelser herfra er den manglende eller ringe følsomhed overfor aminoglykosider og ciprofloxacin, samt metronidazols selektive virkning udelukkende på anaerobe bakterier.

Antibiotika, som har en veldokumenteret effekt ved behandling af infektionstilstande med et bredt udsnit af anaerobe bakterier, er: Metronidazol, clindamycin, imipenem og meropenem medens  $\beta$ -laktamantibiotika specielt af penicillingruppen overvejende kan forventes at være aktive overfor gram positive anaerobe bakterier.

I de fleste situationer anvendes metronidazol til behandling af infektioner med anaerobe bakteriearter, og følsomheden for dette antibiotikum har været forbløffende stabil. Mange afdelinger anvender en metronidazol disk/tablet på den primære anaerobe dyrkningsplade til påvisning af eventuel anaerob vækst, hvorved følsomheden samti-

dig aflæses. En efterfølgende sekundær resistensbestemmelse anvendes derfor sjældent.

Situationer hvor resistensbestemmelse af anaerobe bakterier kommer til anvendelse:

- A. Rutinemæssig resistensbestemmelse af klinisk betydningsfulde anaerobe bakterier bør foretages kontinuerligt i det klinisk mikrobiologiske laboratorium. Det drejer sig først og fremmest om blodisolater og andre isolater fra normalt sterile områder samt renkulturer eller ved dominerende forekomst af anaerobe bakterier i fokale infektionsprocesser. NB: Peptostreptokokker er følsomme for penicillin, men ikke nødvendigvis for methicillin og dicloxacillin.
- B. Periodevise undersøgelser af resistensforholdene for visse hyppigt forekommende anaerobe isolater overfor relevante antibiotika vil være ønskelig fx. i bestemte sygehusafsnit eller geografiske områder. Konsekvente følsomhedsundersøgelser af klinisk betydningsfulde isolater vil løbende give oplysninger om afvigelser fra forventede forhold .
- C. Undersøgelse af nye antimikrobielle midlers aktivitet overfor anaerobe bakterier.
- D. Kvalitetskontrol af den anaerobe resistensbestemmelse.

**5.c. Bakterierarter med særlige vækstforhold eller med resistensegenskaber, som er vanskelige at påvise i rutinelaboratoriet:**

I Tabel 9 er givet en oversigt over nogle almindeligt forekommende patogene bakterierarter med resistensegenskaber, der kan være vanskelige at påvise i rutinelaboratoriet. For visse bakterierarter kan de gængse metoder som diskdiffusion eller MIC-bestemmelse ikke med sikkerhed påvise resistensegenskaber, og man anvender direkte påvisning af resistensgenet med molekylærbiologiske metoder. Som eksempel kan nævnes methicillin-resistens hos stafylokokker, der forårsages af *mecA* genet. Mange stafylokok stammer har imidlertid heterogen expression af *mecA* genet således, at nøjagtig resistenspåvisning fænotypisk er vanskelig. Direkte påvisning af *mecA*-genet anses nu for at være den gyldne standard for påvisning af methicillin resistens hos stafylokokker, når mistanken er opstået.

## 6. MIC-værdier og brydepunkter: Forslag til rapportering af resistensbestemmelse i Danmark.

### 6.a. Species-specifikke brydepunkter

Der er to hovedårsager til, at man skal have en velfungerende resistensbestemmelse til undersøgelse af humanpatogene bakterier: 1) at kunne vejlede antibiotikabehandling, og 2) at overvåge bakterielle resistensforhold. Med de stigende resistenshyppigheder blandt mange relevante arter i de seneste år er (2) blevet endnu vigtigere. Det er nødvendigt at have et fælles rapporteringsgrundlag, dvs at alle – både inden for- og i mellem landene - anvender samme nomenklatur for at kunne følge udviklingen.

En bakterieart uden resistensmekanismer kan klassificeres som et godt eller et dårligt mål for behandling med et antibiotikum. Dette afhænger af de farmakokinetiske forhold for stoffet (absorption, vævspenetration, proteinbinding), de farmakodynamiske forhold vedr. dosering, og bivirkningerne. **Kun bakteriearter, der kan behandles med et antibiotikum, dvs. hvis stoffet kan opnå tilstrækkelig koncentration i infektionsfokus i tilstrækkelig lang tid, vil indgå i overvejelser om resistensbestemmelse og brydepunkter.** Således vil erythromycin ikke blive foreslået undersøgt over for *E. coli*, eller penicillin for *P. aeruginosa*.

Bakteriearter kan i forhold til ethvert relevant antibiotikum inddeles i **to grupper: De som har en erhvervet resistensegenskab, og de som ikke har det.** Sidstnævnte klassificeres som **følsomme, S**, for det pågældende middel.

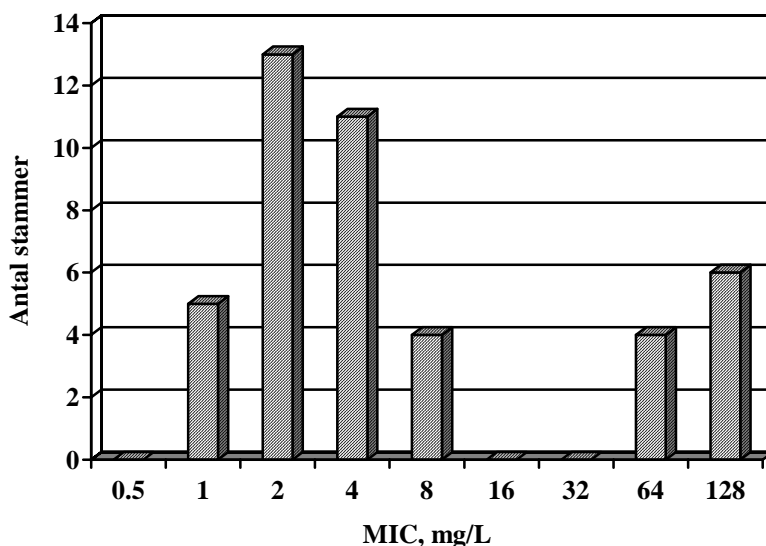
De **resistente, R**, bakterier kan eventuelt inddeles i to grupper alt efter om den erhvervede resistensegenskab gør dem fuldstændig resistente, dvs. det pågældende antibiotikum vil ikke kunne anvendes til behandling overhovedet, eller om der kan være effekt eventuelt ved anvendelse af høj dosering eller ved infektion på et sted, hvor stoffet opkoncentreres (fx. urin).

Det er en almindelig erfaring, at for alle bakteriearter ligger den følsomme population, dvs. uden resistensmekanismer over for et givet antibiotikum, inden for et relativt snævert følsomhedsområde med MIC-værdier spændende over 4-5 to-fold fortyndingstrin. Som eksempel er i Figur 3 vist fordelingen af 43 *E. coli* stammer i forhold til

**Figur 3**

Fordelingen af 43 *E. coli* stammer i forhold til deres MIC for ampicillin.

Y-aksen: Antal stammer. X-aksen: MIC-værdier



MIC for ampicillin. Som det ses, deler bakterie-populationen sig i to, en følsom del med MIC-værdier på 1-8 mg/l (svarende til 4 fortyndingstrin), og en resistent del med MIC-værdier på 64 og  $\geq 128$  mg/l. De fleste resistente stammer danner  $\beta$ -laktamase, hvorfor ampicillin ikke kan anvendes til behandling. I Figur 4 er de samme 43 *E. coli* stammer fordelt i forhold til zonediametrene over for en disk indeholdende ampicillin. Som det ses, fordeler stammerne sig på samme måde i en følsom og en resistent delpopulation; der er altså en nøje korrelation mellem MIC-værdierne og zonestørrelserne, hvilket er baggrunden for udnyttelsen af diskdiffusionsmetoden i praksis (se også Kap.3).

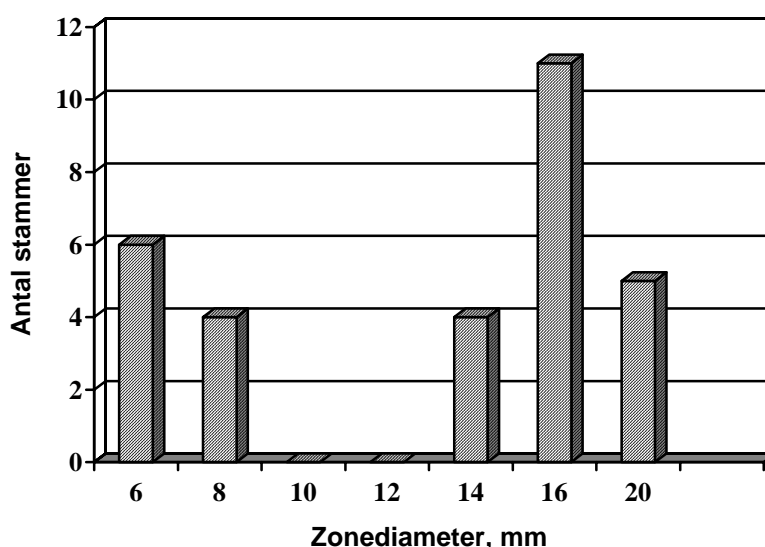
De følsomme *E. coli* stammer i Figur 4 kan adskilles fra de resistente ved zonediameter 13 mm, svarende til en MIC-værdi i Figur 3 på 16 mg/l. Denne værdi kaldes **brydepunktet, grænseværdien eller på engelsk: "breakpoint"**, for adskillelsen mellem følsom og intermediær. Brydepunktet for resistens vil ligge på 10 mm svarende til MIC på 32 mg/l. Brydepunkterne er imidlertid ikke ens for forskellige bakteriearter; i Figur 5 ses, hvordan *Salmonella* generelt er mere følsom end *E. coli* over for ampicillin. Brydepunktet for *Salmonella* ville være 16 mm. Det skal understreges (se oven-

for), at sådanne valg af brydepunkter i øvrigt er fuldstændig afhængig af diskens indhold af antibiotika, hvilket medie og inokulum, man anvender.

### Figur 3

Fordelingen af 43 *E. coli* stammer i forhold til deres zonediameter for ampicillin.

Y-aksen: Antal stammer. X-aksen: Zonediameter i mm



Brydepunkterne angives for den enkelte bakterieart eller –species og kaldes **species-specifikke brydepunkter**.

Med begrebet species-specifikke MIC-grænser menes, at man tager hensyn til fordelingen af MIC-værdierne inden for bakteriepopulationen af én eller relaterede arter med samme følsomhed for det pågældende antibiotikum (fx. gentamicin og *Enterobacteriaceae* eller penicillin og hæmolytiske streptokokker), og at man derved kan bedømme, om bakterien bærer resistensmekanismer eller ej.

Bakterier uden resistensmekanismer benævnes "normale" (synonym: "native", "wild-type", "ikke-resistensbærende"). I det følgende benævnes den ikke-resistensbærende del af bakteriepopulationen som normalpopulationen.

Bakterier som tilhører en og samme art og som savner resistensmekanismer, har samme species-specifikke MIC-grænser og angives med samme S(I)R-betegnelsen.

Ved at placere det speciesspecifikke brydepunkt for følsomme bakterier tæt på normalpopulationen, får man desuden en bedre overvågning af eventuelt begyndende eller pågående resistensudvikling. Beslutningen om en arts normalpopulation skal betegnes S, I eller R afgøres af, om man ved normaldosering af antibiotika kan forvente at opnå antibiotikakoncentrationen i serum, der ligger over stoffets MIC for bakterien. Vil man for eksempel behandle *E. coli* med ampicillin, må ampicillinkoncentrationen overstige 8 mg/l på infektionsstedet. Dette er ikke muligt med standard perorale doser af ampicillin undtagen i urinen, hvor stoffet opkoncentreres. Peroral ampicillin bør derfor kun anvendes til behandling af *E. coli* ved ukomplicerede urinvejsinfektioner. Ved parenteral behandling øges koncentrationen derimod tilstrækkeligt til, at ampicillin kan anvendes også til behandling af *E. coli* infektioner uden for urinvejene. *E. coli* uden resistensmekanismer over for  $\beta$ -laktamantibiotika tilhører derfor I-gruppen. Af antibiotika-politiske grunde kan det imidlertid være at foretrække at kalde normalpopulationen af *E. coli* for S, da det indikerer fravær af erhvervet resistensegenskab, men dette skal altid ledsages af en kommentar i form af "Peroral behandling kan kun anvendes til behandling af ukompliceret urinvejsinfektion".

#### Sammenfattende gælder følgende for species-specifikke MIC-grænser

- S(I)R-klassificeringen bestemmes af de genetiske forhold (genotypen) hos bakterien kombineret med farmakologiske forhold.
- Brydepunkterne vælges, så biologisk homogene bakteriepopulationer ikke "deles"
- Det MIC-brydepunkt, som skal adskille normalpopulationen fra de resistensbærende bakterier, lægges nær ved normalpopulationens MIC-interval, således at resistensbærende bakterier klassificeres som tilhørende en lavere følsomhedsgruppe.

De species-specifikke MIC-brydepunkter for de i Danmark almindeligt anvendte antibiotika fremgår af Tabel 10. De bygger på den svenske referencegruppes, RAF-gruppens forslag, som vi hermed anbefaler.

**De viste MIC-brydepunkter i Tabel 10 bruges som udgangspunkt for disk- eller tablet-metoden, som laboratorierne anvender.** Hvis man anvender Biodisk på PDM-medie eller tilsvarende Oxoid disk på Isosensitest agar, begge med et inokulum, som medfører semikonfluerende vækst, kan man anvende RAF-gruppens zonegrænser, der er tilgængelige på: <http://www.ltkronoberg.se/ext/raf/raf/.htm>.

Hvis man bruger Rosco Neo-Sensitabs og ønsker at følge de nye MIC-brydepunkter, kan de tilsvarende hæmningszoner findes i User's Guide Neo-Sensitabs 16th ed 2003, side 30 – 35, på: <http://www.rosco.dk>

For alle metoder gælder, at man nøje skal følge instruktionerne for anvendelse af medie, disk, atmosfære, inkubationstid osv.

De i Tabel 10 anvendte antibiotika repræsenterer ikke alle markedsførte antibiotika. For visse antibiotikagrupper vælges til resistensbestemmelsen en grupperepræsentant, der vil kunne detektere alle kendte resistensmekanismer for denne gruppe. I Tabel 11 er nævnt de mest betydningsfulde grupperepræsentanter og de antibiotika, de repræsenterer.

### **6.b. S(I)R-besvarelsen.**

Det foreslås med indførelsen af de species specifikke brydepunkter, at danske klinisk mikrobiologiske afdelinger på linie med svenske og andre europæiske lande samt USA, i besvarelsen af resistensbestemmelsen anvender betegnelsen **"S" (sensitiv = følsom), "I" (intermediær) og "R" (resistent)**. Ud over at være den internationalt mest anvendte er dens bogstavvalg logisk, og ud fra ovennævnte diskussion kan det udledes, at resistenssvaret stort set kan gives som "S" eller "R". "I" anvendes så sjældent som muligt, idet det stiller rekvirenten i en usikker situation ved valg af antibiotikum. **Et "I" bør altid være fulgt af en uddybende bemærkning fra laboratoriet.** Overordnet skal "S" for rekvirenten forstås således, at det pågældende antibiotikum kan anvendes i normal dosering til behandling af en infektion med den pågældende bakteriestamme. Med sædvanlig forstås, at den behandlende læge hver gang skal sammenholde prøvesvaret med infektionens art og patientens tilstand og tage stilling

til, om antibiotika alene kan forventes at kurere infektionen. Infektionsfoci fx. i abscesser, i prostata, eller i øjeæblet medfører penetrationsproblemer for lægemidler. Hvis en bakteriestamme er angivet som "R" (resistent) over for et stof, kan man ikke forvente effekt af det pågældende antibiotikum.

## **7. Konklusion:**

Referencegruppen foreslår derfor i Danmark:

- **Indførelse af S-(I)-R-rapportering af bakteriers følsomhed/resistens**
- **S-(I)-R baseres på species-specifikke brydepunkter (svenske reference-gruppe for antibiotikaspørgsmål (RAF))**
- **Brydepunkter angives som MIC-værdier; hver enkelt afdeling må indstille sin resistensbestemmelse til de pågældende MIC-brydepunkter**

**Referencegrupper, rapporter:**

Cars O, Kahlmeter, G. Olsson-Lijequist B. Referencegruppen för antibiotikafrågor og dess metodgrupp RAF och RAF-M. <http://www.ltkronoberg.se/ect/raf/raf.htm>

Bergan T, Bruun JN, Digranes A, Lingaas E, Melby KK, Sander J . Susceptibility testing and bacteria and fungi. Report from "the Norwegian working group on antibiotics". Scand J Infect Dis 1997, suppl. 103: 1-36.

Report of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Clin Microbiol Infect 1996;2 Suppl 1: S1-S49.

British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC standardized disc sensitivity testing method. Birmingham (UK): Newsletter of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; 1998. Update available at URL: <http://www.bsac.org.uk/discdiff/sensitivity2.pdf> (last accessed on 4 February 2002).

Deutsches Institut für Normung. Methods for the determination of susceptibility of pathogens (except mycobacteria) to antimicrobial agents. MIC breakpoints of antibacterial agents. Berlin: DIN; 1998. Suppl 1:58940-4. [www.normung.din.de/index.php?lang=en](http://www.normung.din.de/index.php?lang=en)

Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen. Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie 1996;4:5.

NCCLS. 2002. Performance Standards for antimicrobial Suseptibility Testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS 22.

## Referencer

(Referencelisten har fokuseret på danske arbejder vedr. antibiotika, resistensbetæmmelse, antibiotikabehandling mm)

Aldridge KE, Johnson WD. A comparison of susceptibility results of the *Bacteroides fragilis* group and other anaerobes by traditional MIC results and statistical methods. J. Antimicrob. Chemother. 1997; 39: 309-24.

Andrews JM; BSAC Working Party On Susceptibility Testing ft BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chemother 2001, 48 Suppl 1: 43-57

Angot P, Vergnaud M, Auzou M, Leclercq R. Macrolide resistance phenotypes and genotypes in French clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Observatoire de Normandie du Pneumocoque. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000, 19: 755-8.

Arendrup M, Knudsen JD, Jensen ET, Jensen IP, Frimodt-Møller N. Prevalence of and detection of resistance to ampicillin and other beta-lactam antibiotics in *Haemophilus influenzae* in Denmark. Scand J Infect Dis 2001, 33: 266-71.

Arendrup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Frimodt-Møller N: Comparison of Etest and a tablet diffusion tests with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. J Antimicrob Chemother 2001, 47: 521-6

Arpi M. Time-kill studies and synergy testing of broad-spectrum antibiotics against blood culture isolates. Chemotherapy 1988, 34:393-400.

Arpi M, Victor MA, Mortensen I, Gottschau A, Bruun B. In vitro susceptibility of 124 *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) isolates: comparison of the agar dilution method with the E-test and two agar diffusion methods. APMIS 1996,104:108-14.

Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in Enterococci. Antimicrob Ag Chemother 1993, 37: 1563-71.

Arthur M, Reynolds PE, Depardieu F, Evers S, Dutka-Malen S, Quintiliani jr. R, Courvalin P. Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. J Infect 1996, 12: 11-16.

Baquero F. European standards for antibiotic susceptibility testing: Towards a theoretical consensus. Eur J Clin Microbiol 1990, 9: 492-95.

Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Høiby N. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by

a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. Antimicrob Ag Chemother 2002, 46: 3406-11

Bremmelgaard A, Jansen JE, Justesen T, Gottschau A. Antibiotic sensitivity of the *Bacteroides fragilis* group in Denmark. Danish Study Group. APMIS 1993, 101: 727-31.

Bremmelgaard A, Jansen JE, Justesen T, Gottschau A. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group. Danish study group. APMIS 1994, 102: 446-50.

Bremmelgaard A, Pers C, Kristiansen JE, Korner B, Heltberg O, Frederiksen W. Susceptibility testing of Danish isolates of Capnocytophaga and CDC group DF-2 bacteria. APMIS 1989, 97:43-8.

Bruun B, Friis-Møller A. Ampicillin sensitivity and biotypes of recent Danish isolates of *Haemophilus influenzae*. Acta Pathol Microbiol Scand [B]. 1976, 84: 201-4.

Busch-Sørensen C, Frimodt-Møller N, Miller GH, Espersen F. Aminoglycoside resistance among Danish blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci. APMIS 1996; 104: 873-880.

Busch-Sørensen C, Sonmezöglu M, Frimodt-Møller N, Højbjerg T, Miller GH, Espersen F. Aminoglycoside resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. from two Danish hospitals: correlation with type of aminoglycoside used. APMIS 1996, 104: 763-8

Campbell JI, Ciofu O, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the ampC-ampR genetic region. Antimicrob Ag Chemother 1997, 41:1380-4.

Casals JB, Pringler N. Antibacterial Sensitivity Testing, 9.ed, Rosco Diagn. 1991, p. 32.

Chambers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. J Infect Dis 1999,179 Suppl 2: S353-9

Ciofu O, Bagge N, Høiby N. Antibodies against beta-lactamase can improve cef-tazidime treatment of lung infection with beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of chronic lung infection. APMIS 2002, 110: 881-91

Ciofu O, Beveridge TJ, Kadurugamuwa J, Walther-Rasmussen J, Høiby N. Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 2000, 45: 9-13.

Ciofu O, Giwercman B, Pedersen SS, Høiby N. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF Center. *APMIS*. 1994, 102: 674-80.

Courvalin P. Interpretive reading of antimicrobial susceptibility tests. *ASM News* 1992, 58: 368-75.

Courvalin P, Soussy C-J. 1996 report of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *CMI* 1996, 2, suppl. 1: 1-49.

Davies J. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *J Infect Dis* 1971, 124: Suppl 124: 7-10.

Davies J. Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. In: Lorian V (ed): *Antibiotics in laboratory practice*. 2. ed. 1994; pp. 691-713.

den Hollander JG, Knudsen JD, Mouton JW, Fuursted K, Frimodt-Møller N, Verbrugh HA, Espersen F. Comparison of pharmacodynamics of azithromycin and erythromycin in vitro and in vivo. *Antimicrob Ag Chemother* 1998, 42: 377-82.

Doit D, Denamut E, Picard B, Geslin P, Elion J, Bingen E. Mechanisms of the spread of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis in children in France. *J Infect Dis* 1996, 174: 520-28.

Drasar FA. Detection of aminoglycoside degrading enzymes. In: *Laboratory methods in antimicrobial chemotherapy*, 1978; Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 70-75.

Drlica, K. & Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997, 61, 377-92.

Edwards R. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Bacteroides spp.* *J Med Microbiol* 1997, 46: 979-86.

Ejlertsen T, Schønheyder HC, Thisted E. Beta-lactamase production in *Branhamella catarrhalis* isolated from lower respiratory tract secretions in Danish children: an increasing problem. *Infection* 1991, 19: 328-30.

Ferroni A, Nguyen L, Gehanno P, Boucot I, Berche P. Clonal distribution of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* 23F in France. *J Clin Microbiol* 1996, 34: 2707-12.

Frimodt-Møller N: Correlation of in vitro activity and pharmacokinetic parameters with effect in vivo for antibiotics. Observations from experimental pneumococcus infection in mice. *Dan Med Bull* 1988, 35: 422-37.(Disp.)

Frimodt-Møller N. How predictive is PK/PD for antibacterial agents? *Int J Antimicrob Agents* 2002, 19: 333-9

Frimodt-Møller N, Hartzen SH, Espersen F: In vitro activity of methicillin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1985, 15: 173-80, 1985.

Frimodt-Møller N, Hvass E, Højbjerg T, Møller S, Mortensen I, Thomsen VF: Susceptibility testing with disc diffusion: Pre-diffusion revisited. Acta Path Microbiol Immunol Scand [B] 94: 159-66, 1986.

Frimodt-Møller N, Rosdahl VT, Sørensen G, Hartzen SH, Bentzon MW: Correlation between penicillinase production and the in vitro activity of methicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin and cephalothin against *S. aureus* strains of different phage types. J Antimicrob Chemother 1986, 18: 27-33.

Fuursted K. Postantibiotic effect in vitro. APMIS Suppl. 1999, 90: 1-23 (Disp.)

Fuursted K. Evaluation of the combination effects of ampicillin or vancomycin combined with streptomycin, gentamicin, tobramycin or netilmicin against enterococci. APMIS 1989, 97:23-6.

Fuursted K. Comparison of growth and susceptibility testing of pyrazinamide in different Bactec media using strains of the *M. tuberculosis* complex. APMIS 1993, 101: 154-9.

Fuursted K, Gerner-Smidt P. Analysis of the interaction between piperacillin and ciprofloxacin or tobramycin against thirteen strains of *Pseudomonas aeruginosa*, using killing curves. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B] 1987, 95: 193-7.

Gahrn-Hansen B. Population analysis of susceptibility to methicillin, vancomycin, and three cephalosporines in two methicillin-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B] 1983, 91: 279-84

Gahrn-Hansen B. Coagulase negative staphylococci and micrococci in clinical microbiology. Biotyping, antibiotic susceptibility and clinical distribution. Dan Med Bull 1987; 34: 96-115. (Disp.)

Gahrn-Hansen B, Søgaard P. In vitro activity of cefotaxime against clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype 03. J Antimicrob Chemother 1990, 26: 599-801.

Gahrn-Hansen B, Søgaard P, Arpi M. In vitro activity of ciprofloxacin against methicillin-susceptible and methicillin-resistant staphylococci. Eur J Clin Microbiol 1987, 6: 581-4

Gerner-Smidt P, Fuursted K. Population analyses of the susceptibility to ciprofloxacin of eight clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]. 1986, 94: 273-6.

Giwerzman B, Rasmussen JW, Cioufu O, Clemmetsen I, Schumacher H, Høiby N. Antibodies against chromosomal beta-lactamase. Antimicrob Ag Chemother 1994, 38: 2306-10.

Gootz TD. Discovery and development of new antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1990, 3: 13-31.

Hartzen SH, Andersen LP, Bremmelgaard A, Colding H, Arpi M, Kristiansen J, Justesen T, Espersen F, Frimodt-Møller N, Bonnevie O: Antimicrobial susceptibility testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: importance of medium, inoculum, and incubation time. Antimicrob Ag Chemother 1997, 41: 2634-2639

Heltberg O, Bruun B. Recognition of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* strains by primary polymyxin susceptibility testing. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]. 1984, 92: 115-8.

Heltberg O, Bruun B. Polymyxin susceptibility in staphylococci differentiating coagulase-positive and coagulase-negative strains. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B] 1983, 91: 157-61.

Hindler J (ed.) Section 5. Antimicrobial susceptibility testing in Isenberg HD (ed.) Clinical microbiology procedures handbook, ASM 199X: 5.1.1 - 5.9.19.

Jalal S, Cioufu O, Høiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Ag Chemother 2000, 44: 710-2

Jansen JE, Bremmelgaard A. Effect of culture medium and carbon dioxide concentration on growth of anaerobic bacteria and medium pH. Acta Path Microbiol Immunol Scand [B] 1986, 94: 319-23.

Jansen JE, Bremmelgaard A. Susceptibility testing of 7 antibiotics against anaerobic bacteria: Comparison of 2 different media and carbondioxide concentrations. Acta Path Microbiol Immunol Scand [B] 1987, 95: 65-73.

Jansen JE, Bremmelgaard A. Susceptibility testing of anaerobic bacteria. Regression lines for six antibiotics determined with and without prediffusion. APMIS 1991, 99:711-20.

Jansen JE, Bremmelgaard A. Determination of susceptibility of anaerobic bacteria to beta-lactam antibiotics by a tablet diffusion test. APMIS, 1988; 96:464-70.

Jarløv JO, Busch-Sørensen C, Espersen F, Mortensen I, Hougaard DM, Rosdahl VT. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1996, 40: 241-49.

Jarløv JO. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. *APMIS Suppl.* 1999; 91:1 - 42 (Disp.)

Jarløv JO, Høiby N. Coagulase-negative staphylococci in a major Danish university hospital: diversity in antibiotic susceptibility between wards. *APMIS* 1998, 106: 411-6.

Jarløv JO, Højbjerg T, Busch-Sørensen C, Scheibel J, Møller JK, Kolmos HJ, Wandall DA. Coagulase-negative Staphylococci in Danish blood cultures: species distribution and antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect.* 1996, 32: 217-27.

Jarløv JO, Rosdahl VT, Mortensen I, Bentzon MW. In-vitro activity and beta-lactamase stability of methicillin, isoxazolyl penicillins and cephalothin against coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 1988, 22: 119-25.

Jarløv JO, Rosdahl VT. Quantitative determination of beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus* strains compared to qualitative testing by a microbiological clover leaf test, a chromogenic cephalosporin test and a iodometric test. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1986, 94: 415-21.

Jensen KT, Schonheyder H, Thomsen VF. In-vitro activity of beta-lactam and other antimicrobial agents against *Kingella kingae*. *J Antimicrob Chemother* 1994, 33: 635-40

Jensen KT, Schonheyder H, Gottschau A, Thomsen VF. Impact of the agar medium and disc type on disc diffusion susceptibility testing against teicoplanin and vancomycin. *APMIS* 1994, 102: 94-102.

Jensen TG, Kolmos HJ, Siboni K. Resistance problems in two university hospitals in Denmark. *Int J Antimicrob Agents.* 1999, 12: 71-3.

Jones RN. Important and emerging beta-lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the Amp C enzymes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998, 31: 461-6.

Kaatz GW, Moudgal VV, Seo SM, Kristiansen JE. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47: 719-26.

Knudsen JD. The importance of pharmacodynamic properties in treatment of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Dan Med Bull.* 2000, 47: 313-27. (Disp.)

Knudsen JD, Fuursted K, Espersen F, Frimodt-Møller N. Activities of vancomycin and teicoplanin against penicillin-resistant pneumococci in vitro and in vivo and corre-

lation to pharmacokinetic parameters in the mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41: 1910-5.

Knudsen JD, Fuursted K, Frimodt-Møller N, Espersen F. Comparison of the effect of cefepime with four cephalosporins against pneumococci with various susceptibilities to penicillin, in vitro and in the mouse peritonitis model. *J Antimicrob Chemother* 1997, 40: 679-86.

Knudsen JD, Fuursted K, Raber S, Espersen F, Frimodt-Møller N. Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000,44:1247-54.

Knudsen JD, Frimodt-Møller N, Espersen F. Pharmacodynamics of penicillin are unaffected by bacterial growth phases of *Streptococcus pneumoniae* in the mouse peritonitis model. *J Antimicrob Chemother*. 1998, 41: 451-9.

Knudsen JD, Frimodt-Møller N, Espersen F. Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of in vitro and in vivo activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39: 1253-8.

Kristensen B, Smedegaard HH, Pedersen HM, Andersen MF, Dahlerup JF, Sørensen HT, Korsager B, Schønheyder HC. Antibiotic resistance patterns among blood culture isolates in a Danish county 1981-1995. *J Med Microbiol* 1999, 48: 67-71.

Kristiansen JE, Amaral L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1997, 40: 319-27

Kristiansen JE. Dyes, antipsychotic drugs, and antimicrobial activity. Fragments of a development, with special reference to the influence of Paul Ehrlich. *Dan Med Bull* 1989, 36: 178-85 (Disp.)

Leflon-Guibout V, Heym B, Nicolas-Chanoine M. Updated sequence information and proposed nomenclature for bla(TEM) genes and their promoters. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3232-4.

Lautrop H & al. *Bakteriologiske Undersøgelsesmetoder*, kapitel 38, København, FADL's Forlag 1978, p. 355.

Levy, S.B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance (1992). *Antimicrob Agents Chemother* . 1992, 36, 695-703.

Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2001, ;48 Suppl 1: 59-64.

Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine, 3. ed. Baltimore, Williams & Wilkins 1991.

MacGowan AP, Bowker KE, Holt HA, Wootton M, Reeves DS. Bay 12-8039, a new 8-methoxy-quinolone: Comparative in-vitro activity with nine other antimicrobials against anaerobic bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 1997; 40: 503-09.

Madsen RF, Lorentzen JS, Frimodt-Møller N, Mortensen I, Rosdahl VT. Mechanism of aminoglycoside resistance in Danish *Staphylococcus aureus* strains during the years 1979-87. APMIS 1991; 99: 537-540.

Massidda O, Montanari, MP, Mingoia M. Varaldo PE. Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* have more in common than reduced susceptibility to penicillinase resistant penicillins. Antimicrob. Agents. Chemother. 1996; 40: 2769-74.

Mehtar S (ed.) Guidelines for standards in laboratory practice in medical microbiology. Ass. of Medical Microbiologists 1994, publication no. 3, pp. 49.

Methods for antimicrobial sensitivity testing of anaerobic bacteria. Third edition; approved standard. NCCLS 1993; 13: M11-A3.

Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Waitz JA. In: Survey of aminoglycoside resistance patterns. Developments in industrial microbiology, Underkofler LA & Wulf ML (Ed. 's), 1980; pp. 91-104.

Møller J K, Bak AL, Stenderup A, Zachariae H, Afzelius H. Changing patterns of plasmid-mediated drug resistance during tetracycline therapy. Antimicrob. Ag Chemother 1977, 11: 388-391.

Møller JK. Monitoring antimicrobial drug resistance in hospital microorganisms. Definition of problems and methods. Dan Med Bull. 1990, 37: 263-74 (Disp.)

Møller JK. Drug resistance and plasmid profiles in *Staphylococcus epidermidis* in 1964 and 1986. J Hosp Infect. 1988, 12: 19-27.

Møller JK, Stenderup A. The influence of long-term treatment with mecillinam on fecal *Escherichia coli*. Scand J Infect Dis 1984, 16: 223-4.

Mørch-Lund E. Determination of bacterial resistance to penicillin, sulfathiazole and streptomycin. Acta Pathol. 1949, 26: 821-39.

Nielsen K, Hindersson P, Høiby N, Bangsbo JM. Sequencing of the *rpoB* gene in *Legionella pneumophila* and characterization of mutations associated with rifampin resistance in the *Legionellaceae*. Antimicrob Agents Chemother 2000, 44: 2679-83

Normark S, Lindquist S, Lindberg F. Chromosomal beta-lactam resistance in enterobacteria. Scand J Infect Dis Suppl. 1986;49:38-45.

Nørskov-Lauritsen N, Sandvang D, Hedegaard J, Fussing V, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU, Schønheyder HC. Clonal origin of aminoglycoside-resistant *Citrobacter freundii* isolates in a Danish county. J Med Microbiol. 2001, 50: 636-41.

Olesen B, Kolmos HJ, Ørskov F, Ørskov I. Cluster of multiresistant *Escherichia coli* O78:H10 in Greater Copenhagen. Scand J Infect Dis 1994, 26: 406-10.

Olsson-Liljequist B, Forsgren A. Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. I. The work of the Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA and SRGA-M). Scand J Infect Dis Suppl 1997,105: 5-7

Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Jorge Arroz M, Molnar J, Kristiansen JE, Amaral L. Chlorpromazine has intracellular killing activity against phagocytosed *Staphylococcus aureus* at clinical concentrations. J Infect Chemother 2002, 8: 227-31.

Pedersen G, Schønheyder HC, Kristensen B, Sørensen HT. Community-acquired bacteraemia and antibiotic resistance. Trends during a 17-year period in a Danish county. Dan Med Bull. 2000, 47: 296-300.

Pais A. Subtle is the Lord. The Science and Life of Albert Einstein. OUP 1982; p. 455.

BSAC Working Party on Susceptibility Testing. Report. J Antimicrob Chemother. 2001, 48, Suppl. S1: 1-102.

Poulsen RL, Knudsen JD, Petersen MB, Fursted K, Espersen F, Frimodt-Møller N. In vitro activity of six macrolides, clindamycin and tetracycline on *Streptococcus pneumoniae* with different penicillin susceptibilities. APMIS 1996, 104: 227-33.

Referencegruppen vedrørende Resistensbestemmelse, DSKM. Status ultimo 1997, 7 pp & 1999, 98 pp, Odense 1997 & 1999.

Resende CA, Figueiredo AMS. Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline resistant and susceptible isolates by different methods. J Med Microbiol 1997, 46: 145-49.

Reyn A, Bentzon MW, Ericsson H. Comparative investigations of the sensitivity of *N. gonorrhoeae* to penicillin. Acta Pathol Microbiol Scand. 1963, 57: 235-55.

Rosdahl VT, Frimodt-Møller N, Bentzon MW: Resistance to dicloxacillin, methicillin and oxacillin in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detected by dilution and diffusion methods. APMIS 1989, 97: 715-22

Sanders CC, Sanders EWJr, Goering RV, Werner V. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones,  $\beta$ -lactams, and aminoglycosides with special reference to

cross-resistance between unrelated drug classes. *Antimicrobial Ag Chemother* 1984, 26: 797-801.

Schumacher H, Hoffmann S, Holmboe C, Møller JK. A procedure for evaluation and documentation of susceptibility test methods using the susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to ciprofloxacin as a model. *J Antimicrob Chemother* 2001, 48: 493-500.

Schumacher H, Scheibel J, Møller JK. Cross-resistance patterns among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with decreased susceptibility to cefuroxime. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46: 215-21.

Schumacher H., Skibsted U., Skov R, Scheibel J. Cefuroxime resistance in *Escherichia coli*. *APMIS* 1996, 104, 531-8.

Schønheyder HC, Sanden AK, Sørensen HT. The prevalence of gentamicin resistance among clinical isolates of enterobacteria in a Danish region. *APMIS* 2000, 108: 145-52.

Seligmann SJ. Methicillin-resistant staphylococci. Genetics of the minority population. *J Gen Microbiol* 1966, 42: 315-22.

Shimizu K, Kumada T, Hsieh W, Chung H, Chong Y, Hare RS, Miller GH, Sabatelli FJ, Howard J. Comparison of aminoglycoside resistance pattern in Japan, Formosa, and Korea, Chile and the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 28: 282-88.

Siboni AH, Jensen KT, Rosdahl VT, Gaub J. Is methicillin better than cloxacillin in serious infections caused by strong penicillinase-producing staphylococci (phage-type 94/96)? *Ugeskr Laeger* 1995, 157: 1862-4

Siboni K. Vejledning til Kursus i Medicinsk Mikrobiologi, OU 1969-96, p. 8-3.

Siboni K. Midler mod infektionssygdomme. Kapitel 48 i Kampmann JP & et. al. (eds). *Basal og Klinisk Farmakologi*, FADL's Forlag 1994; p. 461.

Siboni K, Krogh L. The sensitivity to methicillin and penicillin of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Acta path. microbiol. scandinav.* 1968; 74: 381-90.

Skold O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat.* 2000 Jun;3(3):155-160.

Skov R, Christensen JJ, Korner B, N. Frimodt-Møller, Espersen F: In vitro antimicrobial susceptibility of *Aerococcus urinae* to 15 antibiotics, and time-kill curves for penicillin, gentamicin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 2001, 48: 653-8.

Skov R, Frimodt-Møller N, Espersen F. Correlation of MIC methods and tentative interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing using NCCLS methodology for fusidic acid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40:111-116.

Skov RL, Pallesen LV, Poulsen RL, Espersen F. Evaluation of a new 3-h hybridization method for detecting the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and comparison with existing genotypic and phenotypic susceptibility testing methods. *J Antimicrob Chemother* 1999, X: 467-475.

Soussy CJ, Carret G, Cavallo JD, Chardon H, Chidiac C, Choutet P, Courvalin P, Dabernat H, Drugeon H, Dubreuil L, Goldstein F, Jarlier V, Leclercq R, Nicolas-Chanoine MH, Philippon A, Quentin C, Rouveix B, Sirot J. Antibiogram Committee of the French Microbiology Society. Report 2000-2001. *Pathol Biol (Paris)* 2000, 48: 832-71

Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong C, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, Belmont, Star Publishing Company 1993, 5. ed.

Søgaard P. Beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1984, 92: 319-24

Søgaard P. Population analysis of susceptibility to cefotaxime in *Enterobacteriaceae*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1985, 93: 365-9

Søgaard P. The epidemiology of antibiotic resistance in three species of the *Enterobacteriaceae* and the relation to consumption of antimicrobial agents in Odense University Hospital. *Dan Med Bull* 1989,36: 65-84 (Disp.)

Søgaard P, Gahrn-Hansen B. Population analysis of susceptibility to ciprofloxacin and nalidixic acid in *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacteriaceae*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1986, 94: 351-6

Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin Infect Dis* 2001, 15, 33 Suppl 3: S108-15.

Thomas JK, Forrest A, Bhavnani SM, Hyatt JM, Cheng A, Ballow CH, Schentag JJ. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Ag Chemother* 1998; 42: 521-7.

Thomsen VF. *Resistensbestemmelse*. Busck, Copenhagen, 1967 (Disp).

Thrane N, Olesen C, Sørensen HT, Schonheyder HC. Individual use of antibiotics and prevalence of beta-lactamase production among bacterial pathogens from middle ear fluid. *J Antimicrob Chemother* 2001, 47: 211-4.

Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* 2000, 15: 457-70.

Van de Klundert JAM, Vleighenart JS; Van Doorn E, Bongaerts GPA, Molendijk L, Mouton RP. A simple method for the identification of aminoglycoside-modifying enzymes. *J Antimicrob Chemother* 1984, 14: 339-348.

Vavra JJ. Development of resistance to novobiocin, tetracyclin, and a novobiocin-tetracyclin combination in *Staphylococcus aureus* populations. *J Bact* 1967, 93: 801-05.

Vedel G, Peyret M, Gayral JP, Millot P. Evaluation of an expert system linked to a rapid antibiotic susceptibility testing system for the detection of  $\beta$ -lactam resistance phenotypes. *Res Microbiol* 1996, 147: 297-309.

Walther-Rasmussen J, Høiby N. Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Can J Microbiol* 2002, 48: 479-93

Williams JD. Letter to editor: 1996 Report of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *CMI* 1997; 3: 390.

Yeo SF, Akalin E, Arikian S, Auckenthaler R, Bergan T, Dornbusch K, Howard AJ, Hryniewicz W, Jones RN, Koupari G, Legakis NJ, McLaughlin J, Ozkuyumcu C, Percival A, Philips I, Reeves D, Spencer R, Warren RE, Williams JD. Susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* - an international collaborative study in quality assessment. *J Antimicrob Chemother* 1996, 38: 363-86.

Aarestrup FM, Agersø Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000 37:127-137.

**Tabel 9.**

Vigtige bakteriearter med vanskeligt påviselige resistensegenskaber: Resistensmekanismer, klinisk betydning, hvilke antibiotika der er påvirkede, samt fæno- og genotypisk påvisning.

Bakterieart	Resistensmekanisme ( <i>resistensgener</i> )	Afficerede antibiotika	Klinisk betydning for behandling	Påvisning: Fænotypisk	Påvisning: Genotypisk som anvendes i DK	Bemærkninger
<i>Staphylococcus aureus</i>	penicillinase ( <i>bla</i> )	penicillin, ampicillin, amoxicillin, piperacillin, mecillinam	ophævet effekt	1) reduceret zone ved mecillinamtablett/ eller -disk på Danish Blood agar (<22 mm); 2) kløverbladstest;	Påvisning af <i>bla</i> med PCR	Ingen / mindre påvirkning af isoxazolpenicilliner, cefalosporiner, carbapenemer, monobactamer; hæmmes af clavulansyre, sulbactam og tazobactam
<i>Staphylococcus aureus</i>	ændring i penicillinbindende proteiner (PBP) PBP2b ( <i>mecA</i> )	methicillin, alle $\beta$ -laktamantibiotika	ophævet effekt	1) oxacillin 5 $\mu$ g disk, Columbia agar + 4,5% NaCl, Mcfarland 0,5, 24t inkubation ved max. 35°C, zone < 16 mm angiver Methicillin R; 2) Cefoxitin: semikonfluerende vækst, 35-37 °C natten over: disk (30 $\mu$ g), Isosensitestagar.: Zone < 29 mm angiver Methicillin R. Rosco (30 $\mu$ g), Danish Blood agar.: Zone < 32mm angiver Methicillin R. Rosco (30 $\mu$ g), Mueller Hinton: Zone < 28 mm angiver Methicillin R 3) påvisning af ændret PBP vha. monoklonal antistoftest	Påvisning af <i>mecA</i> med PCR el. DNA-hybridisering	<i>mecA</i> negative men oxacillin R isolater er enten såkaldte BORSA isolater eller høj resistente isolater med en anden resistens mekanisme.
Koagulase negative stafylokokker	ændring i PBP2b ( <i>mecA</i> )	methicillin, alle $\beta$ -laktamantibiotika	ophævet effekt	1) oxacillin 5 $\mu$ g disk, Columbia agar + 4.5% NaCl, Mcfarland 0,5, 24t inkubation ved max. 35°C, zone < 25 mm angiver Methicillin R;	Påvisning af <i>mecA</i> med PCR eller DNA-hybridisering	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ændring i PBP2b,2x,3 ( <i>pbp2b,2x,3</i> )	penicillin, ampicillin, alle $\beta$ -laktamantibiotika	Ved penicillin MIC < 2 mg/L god effekt med højere doser $\beta$ -laktamantibiotika*; ved MIC > 2 mg/L	1) oxacillin 1 $\mu$ g disk 2) E-test for penicillin	Påvisning af <i>pbp</i> -gener med PCR	* dette gælder ikke ved meningitis.

			svigtende effekt af selv høje doser			
<i>Streptococcus pyogenes</i> og andre hæmolytiske streptokokker	effluxpumpe ( <i>mefA</i> ); ændring i erythromycin-methylase ( <i>ermB</i> )- konstitutiv og inducerbar	erythromycin, clarithromycin, azithromycin, roxithromycin øvrige makrolider	ophævet effekt af alle makrolider	1) Erythromycindisk eller -tablet samt klindamycindisk eller -tablet (1 - 2 cm mellem disk/tablet); ved induktion med klindamycin ses obtureret (D-format) erythromycinzone; 2) E-test med erythromycin	Påvisning af <i>mefA</i> , <i>ermB</i> med PCR	<i>ermB</i> medfører krydsresistens med streptograminer og klindamycin
<i>Enterococcus sp.</i>	ændring af vancomycin-targetet (d-ala-d-ala receptor) ( <i>vanA</i> , - <i>B</i> , - <i>C</i> , - <i>D</i> )	vancomycin – alle van-gener; teichoplanin – kun <i>vanA</i>	ophævet til reduceret effekt: <i>vanA</i> : MIC for vancomycin og teichoplanin > 256 mg/l <i>vanB</i> : MIC for vancomycin 8-256 mg/l, teichoplanin ikke afficeret <i>vanC</i> : MIC for vancomycin 2 – 32 mg/l, teichoplanin ikke afficeret (kun bevægelige arter)	1) Vancomycin 5 µg og teichoplanin 5 µg disk på agar, Mueller Hinton agar, Isosensitestagar, alle uden blod, 48 timers inkubation 35°C; 2) E-test på Brain Heart infusion-agar 3) mikroskopi for bevægelighed eller halvflydende agar inkuberet ved 30 eller 35°C mhp. <i>vanC</i> -bærende bevægelige enterokokker (bør altid udføres, da test med vancomycin disk ikke finder stammer med lav MIC)	Påvisning af <i>vanA</i> , <i>vanB</i> ved PCR eller ved DNA-hybridisering	
<i>Haemophilus influenzae</i>	β-laktamase (TEM)	ampicillin, penicillin, piperacillin, mecillinam	ophævet effekt	1) ampicillin 1-5 µg disk på chokoladeagar eller lign.; ingen påvirkning af cefuroxim eller amoxicillin/clavulansyre. 2) direkte påvisning af β-laktamase med nitrocefintest		
	ændring i <i>PBP3</i>	Penicilliner, β-laktamaseinhibitor kombinationer, 1. og 2. generations cefalosporiner (fx cefalothin, cefuroxim)	reduceret effekt, kan afhjælpes med højere doser (publiceret klinisk erfaring savnes).	nedsat zone for cefaclor- eller cefalothin- eller, cefuroximdisk, ophæves ikke af clavulansyre.		

**Tabel 10: DSKM referencegruppe for antibiotikaresistens: Brydepunkter (breakpoints) for mest anvendte antibiotika \***  
**Værdierne angiver ≤ (S) eller (R) > MIC, mg/L. "-" angiver, at klinisk effekt ikke kan påregnes eller er ukendt.**

Antibiotikum	<i>Enterobac- teriaceae</i>	<i>Pseudo- monas spp.</i>	<i>Acinetobac- ter spp.</i>	<i>Staphylo- coccus spp.</i>	<i>Entero- coccus spp.</i>	Strepto- kokker	Pneumo- kokker	<i>Haemophi- lus spp.</i>	<i>M. catarrha- lis</i>	<i>Corynebac- terium spp.</i>	<i>Listeria spp.</i>
Penicillin G	-	-	-	penase (1)	0,25/4	0,25/1	0,06/1	1/1 (4)	penase	0,25/1	0,25/1
Oxacillin	-	-	-	1/1 (2)	-	1/1	disk (3)	-	-	-	-
Ampicillin	1/8 **	-	-	penase	2/8	0,25/1	0,06/1	0,5/0,5 (4)	penase	0,25/1	0,5/1
Mecillinam	1/8	-	-	oxacillin (2)	-	-	-	-	-	-	-
Piperacillin	16/16	16/16	16/16	oxacillin (2)	16/16	0,25/1	0,06/1	-	-	-	-
Aztreonam	0,5/1	-	-	oxacillin (2)	-	-	-	0,5/1	-	-	-
Cefuroxim	8/8	-	-	oxacillin (2)	-	0,12/2	0,12/0,25	2/2	2/2	0,12/2	-
Cefotaxim	0,5/1	-	-	oxacillin (2)	-	0,12/2	0,12/1	0,12/1	-	-	-
Ceftriaxon	0,5/1	-	-	oxacillin (2)	-	0,12/2	0,12/1	0,12/1	-	-	-
Ceftazidim	2/4	8/8	8/8	oxacillin (2)	-	2/2	2/2	2/2	-	-	-
Imipenem	1/8	4/8	1/8	oxacillin (2)	1/8	0,06/2	0,06/0,5	1/2	-	-	1/4
Meropenem	0,12/8	2/8	1/8	oxacillin (2)	-	0,06/2	0,06/0,5	1/2	-	-	1/4
Amikacin	4/8	8/8	4/4	4/8	8/8	8/8	8/8	-	-	-	-
Gentamicin	NB 2/2	4/4	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	-	-	-	-
Netilmicin	2/2	4/4	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	-	-	-	-
Tobramycin	2/2	4/4	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	-	-	-	-
Erythromycin	-	-	-	0,5/0,5	-	0,5/0,5	0,5/0,5	-	0,5/4	0,5/4	0,5/4
Klindamycin	-	-	-	0,5/2	-	0,5/2	0,5/2	-	-	-	-
Fusidin	-	-	-	0,5/0,5	-	-	-	-	-	0,5/0,5	-
Kloramfenikol	8/16	-	-	8/16	-	-	8/16	2/4	-	-	-
Tetracyklin	-	-	-	2/2	-	2/2	2/2	2/2	2/2	-	-
Rifampicin	-	-	-	1/2	1/2	1/2	1/2	-	-	-	-
Linezolid	-	-	-	4/4	4/4	2/4	2/4	-	-	-	-
Vankomycin	-	-	-	4/4	4/4 (5)	2/2	2/2	-	-	4/4	4/4
Teichoplanin	-	-	-	4/4	4/4 (5)	0,5/4	0,5/4	-	-	4/4	4/4
Ciprofloxacin	NB 0,06/1 (6)	1/1	1/1	-	-	-	-	0,12/0,25	0,12/0,25	-	-
Moxifloxacin	-	-	-	-	-	1/2	1/2	0,25/0,5	0,25/0,5	-	-
Nitrofurantoin	32/32	-	32/32	32/32	32/32	32/32	-	-	-	-	-
Trimethoprim	2/4	-	-	2/4	2/4	2/4	-	-	-	-	-
Sulfametoxazol/trim	16/32	16/32	16/32	16/32	-	16/32	16/32	16/32	-	-	16/32
Sulfametizol	512/512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Brydepunkter i henhold til RAF-gruppen, dvs. speciesrelaterede brydepunkter.

\*\* *E. coli*: I-populationen kan svares ud som S med kommentar fx: "Peroral behandling kan kun anvendes til behandling af ukompliceret urinvejsinfektion"

1) Penicillinresistens påvises ved a) penasedannelse, fx kløverbladtest, b) manglende strandbred, c) med mecillinam tablet/disk

2) Ved oxacillin-MIC > 1 mg/L, undersøges for *mecA* gen / PBP 2a. Alle β-lactamantibiotika er R for *mecA* positive isolater. Ved oxacillinzone > 1 mg/L men *mecA* negativ afgør MIC-værdien for det enkelte β-lactamantibiotikum om der kan forventes effekt..

3) Oxacillin 1 µg disk zone < 20 mm, udfør penicillin MIC-bestemmelse

4) PBP-ændring hos *Haemophilus* spp. påvises bedst med penicillin V (10 µg) ≤ 15 mm; MIC-grænser for *Haemophilus* spp. med ændring i PBP: Penicillin G: 1/1 mg/l; ampicillin 0,5/0,5 mg/l

5) Bevægelige enterokokker har altid vanC, som medfører vancomycin I/R, teichoplanin S; vanA medfører både vancomycin R og teichoplanin R, mens vanB medfører teichoplanin S, MIC for vancomycin 4-64.

6) Ciprofloxacinresistens hos *E. coli* og *Salmonella* spp. påvises bedst med nalidixansyre (MIC > 4 mg/l)

"I" ledsages altid af en kommentar

**Tabel 11.**

Antibiotika anvendt som grupperepræsentanter ved resistensbestemmelse og de antibiotika, de repræsenterer. Det skal pointeres, at de øvrige antibiotika i grupperne godt kan have forskellige MIC-værdier for visse bakteriearter.

<b>Grupperepræsentant</b>	<b>Øvrige antibiotika i gruppen</b>
Erythromycin	Azithromycin, Klarithromycin, Roxythromycin
Oxacillin (for MecA-positive stafylokokker)	Methicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Flucloxacillin, alle cefalosporiner
Tetracyclin	Doxycylin
Ciprofloxacin	Norfloxacin, Ofloxacin, Fleroxacin
Ampicillin	Amoxicillin, pivampicillin, bacampicillin
Sulfametizol	Sulfametoxazol