

CAT

Critically Appraised Topic

Optimalisatie van colistine gevoeligheidsbepaling in het routine laboratorium

Auteur: Erika De Bont
Supervisor: Dr. Michaël Boudewijns
Date: 9 mei 2017

CLINICAL BOTTOM LINE

Colistine is een oud antibioticum, dat door de opkomst van multiresistente bacteriën terug gebruikt wordt. Het werkingsmechanisme is gebaseerd op de interactie met LPS in de buitenmembraan van gramnegatieve bacteriën. Dit leidt tot de verstoring van het membraan en celdood.

Resistentie voor colistine is dan ook gebaseerd op modificatie van de LPS. Het grootste deel van de verworven resistentie komt door mutaties chromosomaal DNA. Sinds kort is er ook een plasmide gemedieerde colistine resistentie beschreven, namelijk het *mcr-I* gen. In navolging van *mcr-I* zijn ook *mcr-I.2* en *mcr-2* geïdentificeerd. Deze komen minder voor.

Een optimale methode voor de gevoeligheidsbepaling is er nog niet. Er zijn verschillende moeilijkheden door de slechte diffusie van colistine in de agar en de kationische eigenschappen van colistine. Verder zorgt ook het voorkomen van heteroresistentie en het gebrek aan een betrouwbare referentiemethode voor problemen. De Joint working group van EUSCAST en CLSI raden BMD aan als referentiemethode.

We hebben een vergelijking van verschillende gevoeligheidsbepalingmethoden uitgevoerd. Vitek 2, disk diffusie, pre-diffusie, E-test, Rapid Polymyxine NP test en Umic werden vergeleken ten opzichte van Sensititer.

Hieruit werd beslist om gevoeligheid voor colistine standaard te blijven meebepalen met de Vitek 2. Indien er overwogen wordt om colistine als therapie te gebruiken wordt er voor Enterobacteriaceae met een MIC > 0,5 mg/l op Vitek 2 en alle *P. aeruginosa* en *A. baumannii* complex een MIC bepaald met de Sensititer. Bij de isolaten met een MIC ≥ 4 mg/l wordt er een PCR voor de detectie van *mcr-I* en *mcr-2* uitgevoerd.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Colistine is een oud antibioticum dat lange tijd niet meer gebruikt geweest is. Met de opkomst van multiresistente isolaten wordt het terug gebruikt als laatste redmiddel. Ook in het AZ Groeninge komen steeds meer en meer MDR kiemen voor.

Resistentie tegen colistine was altijd vrij zeldzaam en chromosomaal gecodeerd. Recent is er een plasmide gemedieerd resistentiemechanisme beschreven, namelijk het *mcr-I* gen. Het *mcr-I* heeft zich al verspreid in verschillende Enterobacteriaceae op verschillende plasmide. Het komt zowel bij dieren als mensen voor. De verspreiding van een plasmide gemedieerd resistentiemechanisme is veel gemakkelijker als dit van de chromosomaal gemedieerde resistenties.

Er is nog veel onzekerheid over de optimale gevoeligheidsbepaling van colistine. Het is een groot amfofiel molecuul dat moeilijk diffundeert en makkelijk adsorbeert. De joint working group van de EUCAST en CLSI raden BMD aan.

Momenteel wordt de Vitek 2 gebruikt voor routine gevoeligheidsbepaling. Er wordt nagegaan wat er in de literatuur beschreven is over deze methoden en andere gevoeligheidsbepalingmethoden. Daarna wordt er een vergelijkende studie gedaan om te zien welke methode we het best kunnen implementeren in de praktijk.

QUESTION(S)

- 1) Hoe ontstaat resistentie voor colistine en hoe kan men deze best bepalen?
- 2) Wat is de epidemiologie van *mcr-I*?
- 3) Welke flowchart gaan we in het AZ Groeninge gebruiken?

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Yahav, Farbman, Leibovici, Paul: **Colistin: new lessons on an old antibiotic.** *Clinical microbiology and infection* 2012, **18**:18-29
2. Fiaccadori, Antonucci, Morabito, d'Avolia, Maggiore, Regolisti: **Colistin use in patients with reduced kidney function.** *American journal of kidney diseases* 2016, **68**:296-306
3. Wenzler, Fraidenburg, Scardina, Danziger: **Inhaled antibiotics for Gram-negative respiratory infections.** *Clinical microbiology reviews* 2016, **29**:581-632
4. BCFI: <http://www.bcfi.be/nl/chapters/12?frag=10140> (laatst geraadpleegd op 7/5/2017)

5. Nation, Li, Cars, Couet, Dudley, Kaye, Mouton, Paterson, Tam, Theurezbacher, Tsuji, Turnidge: **Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus.** *Lancet infectious diseases* 2015, **15**:225-234
6. Ortwine, Kaye, Li, Pogue: **Colistin: understanding and applying recent pharmacokinetic advances.** *Pharmacotherapy* 2015, **35**:11-16
7. Baron, Hadjadj, Rolain, Olaitan: **Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knows and unknowns.** *International journal of antimicrobial agents* 2016, **48**:583-591
8. Poirel, Jayol, Nordmann: **Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes.** *Clinical microbiology reviews* 2017, **30**:557-596
9. Jayol, Saly, Menard, Andre, Noury, Nordmann, Poirel, Dubois: **Hafnia: a genus naturally resistant to colistin.** *Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse* 2016, CO-120
10. Liu, Wang, Walsh, Yi, Zhang, Spencer, Doi, Tian, Dong, Huang, Yu, Gu, Ren, Chen, Lv, He, Zhou, Liang, Liu, Shen: **Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study.** *Lancet infectious diseases* 2016, **16**:161-168
11. Poirel: **Mechanisms of colistin resistance.** *ECCMID* 2017, SY0825
12. Nordmann, Poirel: **Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace.** *Clinical microbiology and infection* 2016, **22**:398-400
13. Skov, Monnet: **Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds.** *Eurosurveillance* 2016, **21**:30155
14. Di Pilato, Arena, Tascini, Cannatelli, De Angelis, Fortunato, Giani, Menichetti, Rossolini: **Mcr-1.2, a new mcr variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemas-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2016, **60**:5612-5615
15. Xavier, Lammens, Ruhel, Kumar-Singh, Butaye, Goossens, Malhotra-Kumar: **Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016.** *Eurosurveillance* 2016, **21**:30280
16. Jayol, Nordmann, Brink, Poirel: **Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alteration in the PhoPQ regulatory system.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015, **59**:2780-2784
17. Eucast: **Recommendation for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST polymyxin breakpoints working group.** Published on www.eucast.org 22/03/2016
18. Sader, Rhomberg, Flamm, Jones: **Use of surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing for polymyxin B and colistin.** *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2012, **74**:412-414
19. Albur, Noel, Bowker, MacGowan: **Colistin susceptibility testing: time for a review.** *Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014, **69**:1432-1434
20. Humphries: **Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now?** *Pharmacotherapy* 2015, **35**:22-27
21. Jerke, Lee, Humphries: **Polymyxin susceptibility testing: a cold case reopened.** *Clinical microbiology newsletter* 2016, **38**:69-77
22. Matzneller, Strommer, Österreicher, Mitteregger, Zeitlinger: **Target site antimicrobial activity of colistin might be misestimated if tested in conventional growth media.** *European journal of clinical microbiology and infectious diseases* 2015, **34**:1989-1994
23. Hindler, Humphries: **Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli.** *Journal of clinical microbiology* 2013, **51**:1678-1684
24. Matuschek, Ahman, Webster, Kahlmeter: **Evaluation of five commercial MIC methods for colistin antimicrobial susceptibility testing for Gram-negative bacteria.** *ECCMID* 2017, P0161
25. Eucast: **Clinical breakpoint tables v.7.0 valid from 01/01/2017**
26. CLSI: **What's new in the 2017 CLSI standard for antimicrobial susceptibility testing (AST)?**
27. Rosco: **Performance of susceptibility testing: prediffusion method.** Document: 1.5.0
28. Tan, Ng: **Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin.** *Clinical microbiology and infection* 2007, **13**:544-546
29. Arroyo, García-Curiel, Pachón-Ibañez, Llanos, Ruiz, Pachón, Aznar: **Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of clinical microbiology* 2005, **43**:903-905
30. Dafopoulou, Zarkotou, Diitroulia, Hadjichristodoulou, Genniata, Pournaras, Tsakris: **Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015, **59**:4625-4630
31. Biomérieux: **Bericht over Etest colistin.** Ref: FCA 3206, 28/12/2016
32. Lee, Shin, Lee, Joo, Park, Shin, Suh, Rhang, Kim: **Comparison of the Vitek 2, Microscan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean university hospital.** *Journal of clinical microbiology* 2013, **51**:1924-1926
33. Piewngam, Kiratisin: **Comparative assessment of antimicrobial susceptibility testing for tigecycline and colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, including multidrug-resistant isolates.** *International journal of antimicrobial agents* 2014, **44**:396-401

34. Tan, Ng, Poh: **Susceptibility testing of unconventional antibiotics against multiresistant *Acinetobacter* spp. By agar dilution and Vitek 2.** *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2007, **58**:357-361
35. Giordano, Brucculeri, Ceppatelli, Dovere, Ghelardi, Lupetti, Barnini: **Colistin-resistance can be unrevealed by semi-automated systems.** *ECCMID* 2016, OLB07
36. Lo-Ten-Foe, de Smet, Diederer, Kluytmans, van Keulen: **Comparative evaluation of the Vitek 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility test methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007, **51**:3726-3730
37. Nordmann, Jayol, Poirel: **Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*.** *Emerging infectious diseases* 2016, **22**:1038-1043
38. Jayol, Dubois, Poirel, Nordmann: **Rapid detection of polymyxin-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures.** *Journal of clinical microbiology* 2016, **54**:2273-2277
39. Nordmann, Jayol, Poirel: **A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates.** *Journal of clinical microbiology* 2016, **54**:1395-1399
40. Eucast: **Consultation on proposal to reduce colistin breakpoints for *Pseudomonas aeruginosa* to susceptible ≤ 2 mg/L, resistant >2 mg/L.** 10/03/2016
41. Eucast: **EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.** v. 2.0 (maart 2017), onder revisie
42. CLSI: **Continuing conversation about colistin!** *CLSI AST news update* december 2016, 7-8
43. Castanheira, Griffin, Deshpande, Mendes, Jones, Flamm: **Detection of mcr-1 among *Escherichia coli* clinical collected worldwide as part of the SENTRY antimicrobial surveillance program in 2014 and 2015.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2016, **60**:5623-5624
44. Gales, Jones, Sader: **Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006-09).** *Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011, **66**:2070-2074
45. Bogaerts, Bouchanhouf, Piraux, Huang, Glupczynski: **Colistin resistance among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* recovered in Belgium in 201-2015.** *ECCMID* 2017, P0692
46. Rhouma, Beaudry, Letellier: **Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production?** *International journal of antimicrobial agents* 2016, **48**:119-126
47. Lei, Wang, Schwarz, Walsh, Ou, Wu, Li, Shen: **Mcr-1 in *Enterobacteriaceae* from companion animals, Beijing, China, 2012-2016.** *Emerging infectious diseases* 2017, **23**:710-711
48. Prim, Rivera, Rodríguez-Navarro, Español, Turbau, Coll, Mirelis: **Detection of mcr-1 colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015.** *Eurosurveillance* 2016, **21**:30183
49. Voor in 't Holt, Severin, Zndijk, Van Westreenen, Klaassen, Vos: **Gram-negative bacteria harbouring the mcr-1 gene: occurrence and transmission in large tertiary hospital in the Netherlands 2010-2015.** *ECCMID* 2017, P0696
50. Zurfluh, Stephan, Widmer, Poirel, Nordmann, Nüesch, Hächler, Nüesch-Inderbinen: **Screening for fecal carriage of mcr-producing *Enterobacteriaceae* in healthy humans and primary care patients.** *Antimicrobial resistance and infection control* 2017, **6**:28
51. Liassine, Assouvie, Descombes, Tendon, Kieffer, Poirel, Nordmann: **Very low prevalence of mcr-1/mcr-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract *Enterobacteriaceae* in Switzerland.** *International journal of infectious diseases* 2016, **51**:4-5
52. Ecdc: **Plasmid-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae*.** *Rapid risk assessment* 13/06/2016
53. CDC: **Alert to U.S. healthcare facilities: first mcr-1 gene in *E. coli* bacteria found in a human in the United States.** *Health alert network* 13/06/2016
54. Biomerieux: **Vitek 2 product information.**

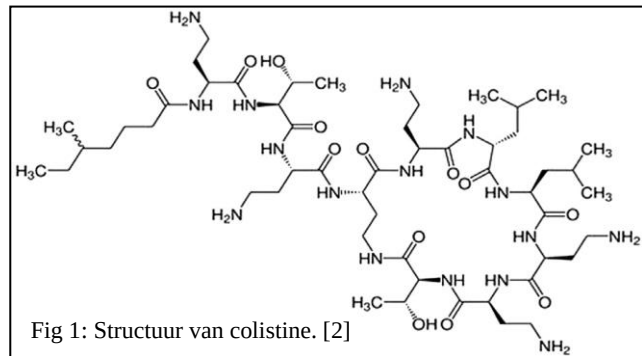
1) Hoe ontstaat resistentie voor colistine en hoe kan men deze best bepalen?

Inleiding.

De polymyxines, die in 1940 ontdekt werden, waren een van de eerste antibiotica klasse met een significante activiteit tegen Gramnegatieve bacteriën. Polymyxine E (colistine) en polymyxine B zijn de enigste die klinisch gebruikt worden. Door melding van nefro- en neuro-toxiciteit en het opkomen van nieuwe minder toxische antibiotica werd het gebruik van polymyxines verlaten. Door de opkomst van multiresistente gramnegatieve bacteriën, waarbij polymyxines vaak het enige overgebleven alternatief zijn, is het gebruik ervan terug toegenomen. [1,2] We gaan het verder specifiek hebben over colistine. Dit wordt wereldwijd het meeste gebruikt [1] en is in België het enige beschikbare polymixine.

Structuur en werkingsmechanisme

Colistine wordt geproduceerd door een stam van *Paenibacillus polymyxa* subspecies *colistinus*. Het is lipopeptide met een moleculair gewicht van 1,163 Da. Het is een amfofiel molecule: de hydrofiële eigenschappen komen van het polycationisch cyclisch peptide en de hydrofobe eigenschappen komen van de vetzuurketen. Colistine bestaat uit verschillende componenten nl. colistine A en colistine B die enkel verschillen in vetzuurketen. (Fig 1.) [2]



Alhoewel het exacte werkingsmechanisme van colistine nog niet volledig opgehelderd is wordt van volgende mechanisme aangenomen dat ze een belangrijke bijdragen hebben. Colistine heeft met zijn positieve lading en hydrofobe staart oppervlakte actieve eigenschappen en heeft daardoor een hoge affiniteit voor de lipopolysaccharide (LPS) op de buitenmembraan. [1] Colistine gaat een elektrostatische interactie aan met de LPS en verplaatst hierdoor de divalente kationen. De divalente kationen stabiliseren in normale omstandigheden de LPS membraan. Door het verplaatsen van de kationen wordt de membraan verstoord en kan de cel inhoud naar buiten lekken. Dit leidt tot celdood. Verder bindt colistine ook het lipide A deel van de LPS en blokkeert zo de endotoxine effecten hiervan. [1,2]

Toedieningsvormen en dosis

Colistine kan toegediend worden als colistinesulfaat of natrium colistimethaat (CMS). Colistinesulfaat wordt gebruikt voor lokale toepassing (topisch of oraal). CMS is een prodrug (mix van methaansulfonaat natrium zouten van colistine A en B) [2], die in contact met water spontaan hydrolyseert naar colistine. CMS is minder toxisch en wordt daarom gebruikt voor systemische behandeling (parenteraal of inhalatie). [1,2] Colistine heeft een klein verdelingsvolume ($\pm$ extracellulair volume) [2] en penetreert slecht in het CSV, pleuravocht en gewrichtsvocht. [1] Voor de behandeling van respiratoire infecties kan inhalatietherapie met CMS gebruikt worden. Zo worden hogere concentraties in het longparenchym bereikt terwijl de plasmaconcentraties laag blijven. [3] In België beschikt men over twee preparaten van CMS: Colistineb, een poeder dat opgelost kan worden voor injectie, infusie of inhalatie en Colobreathe een inhalatiepoeder. [4]

De dosis van colistine kan op verschillende manieren uitgedrukt worden, namelijk IU, mg CMS of mg colistine base. Één IU is de minimale concentratie die de groei van *E. coli* 95 I.S.M. in 1 ml broth op pH 7,2 inhibeert. [1] 10^6 IU komt overeen met 80 mg CMS en 30 mg colistine base. [2,5,6]

Over de exacte dosis die gegeven moet worden is er nog geen consensus. Over twee dingen is men het wel eens. Er moet een oplaaddosis gegeven worden en men moet een hogere dosis geven dan deze die vroeger aanbevolen werden. [1,2,3,6]

Resistentie voor colistine

Het belangrijkste mechanisme van resistentie is de modificatie van de LPS. Dit geldt zowel bij de intrinsieke als de verworven resistentie.

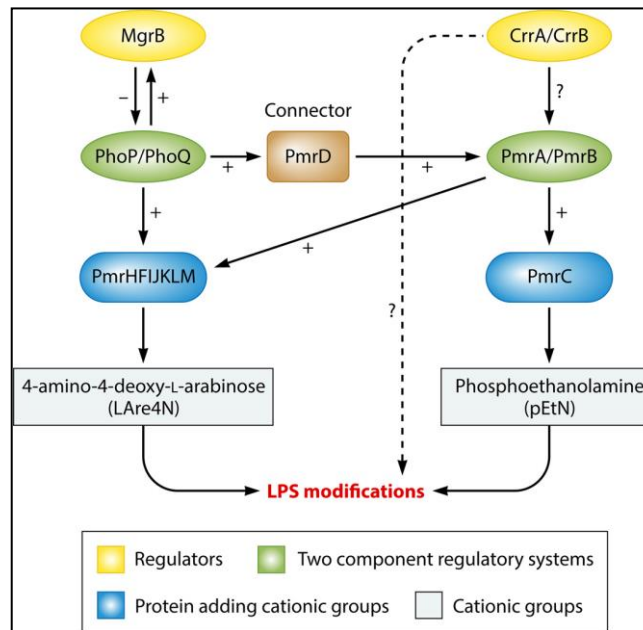
Intrinsiek resistente kiemen

Verschillende soorten Gramnegatieve bacillen zijn intrinsiek resistent aan colistine. Goed gekende voorbeelden hiervan zijn: *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp. en *Morganella* spp.. In deze species is er een constitutieve expressie van het *arnBCADTEF* (*pmrHFIJKLM*) operon en/of *eptB* gen. Dit leidt tot additie van 4-amino-4-deoxy-l-arabinose (l-ara4N) en/of fosfoethanolamine (PEtN) aan LPS. L-ara4N en PEtN zijn kationische groepen en zorgen voor een verhoging van de lading van de LPS en verminderen zo de binding met colistine. [7,8]

Recent is ook het genus *Hafnia* voorgesteld als zijnde intrinsiek resistent aan colistine. Gevoeligheidsbepaling met BMD geeft een hoog percentage resistente kiemen. Verder vertoont het genus *Hafnia* sterke gelijkenissen met andere intrinsiek resistente kiemen. [9] Dit is nog niet opgenomen in de tabellen van de EUCAST en CLSI.

Verworven resistentie, chromosomaal

Het grootste deel van de verworven resistentie is chromosomaal gecodeerd. Additie van PEtN of l-ara4N liggen meestal aan de basis van deze resistentie. [1,7, 8] Verschillende genen zijn betrokken bij de modificatie van LPS. (Fig. 2)



Het *pmrC* gen codeert voor een fosfoethanolamine fosfotransferase, dit zorgt voor de additie van PEtN aan LPS. Het *pmrE* gen en het *pmrHFIJKLM* operon zijn verantwoordelijk voor de synthese van l-ara4N en zijn additie aan LPS. Het twee-componenten systeem PmrAB bestaat uit *pmrA* en *pmrB*. *PmrB* wordt normaal geactiveerd door Fe^{3+} , Al^{3+} en lage pH en activeert op zijn beurt *pmrA*. *PmrA* activeert *pmrC*, *pmrHFIJKLM* en *pmrE* wat leidt tot modificatie van het LPS. Het PhoPQ twee-componenten systeem bestaat uit *phoP* en *phoQ*. Lage pH en laag Mg^{2+} activeren *phoQ* in normale omstandigheden. *PhoQ* zorgt daarna voor de activatie van *phoP*. *PhoP* activeert *pmrHFIJKLM* en *pmrA*. De activatie van *pmrA* gebeurt rechtstreeks of door de activatie van het *pmrD* connector proteïne. Mutaties in het PmrAB en PhoPQ systeem zorgen voor blijvende activatie en zo modificatie van het LPS en resistentie tegen colistine. Het *mgrB* gen zorgt voor de negatieve feedback voor het PhoPQ systeem. Inactivatie van *mgrB* zorgt voor overexpressie van PhoPQ en bijgevolg ook resistentie aan colistine. Inactivatie van CrrAB, bestaande uit *crrA* en *crrB*, zorgt voor de overexpressie van PmrAB, wat zorgt voor colistine resistentie. Verder zorgt de inactivatie van *crrB* ook voor de activatie van een glycosyltransferase dat lipide A modificeert. [7,8]

Bovenstaande regeling geldt voor *Enterobacteriaceae*. *Pseudomonas aeruginosa* heeft nog enkele andere twee-component systemen nl. ParRS, ColRS en CprRS die kunnen zorgen voor colistine resistentie. [7,8] Mutaties in het PmrAB systeem leidt bij *Acinetobacter baumannii* enkel tot additie van PEtN. [8] Verder is er bij *A. baumannii* ook het complete verlies van LPS beschreven. [1] Dit komt door mutaties in *lpxA*, *lpxC* of *lpxD* die voor de synthese van LPS zorgen. [7,8] Ook een mutatie in *lptD*, een buitenste membraanproteïne dat voor de finale translocatie van LPS zorgt, zorgt voor het complete verlies van LPS. [7]

Mutaties in het *ramA* zijn als oorzaak van resistentieontwikkeling bij *Klebsiella pneumoniae* beschreven. *RamA* regelt de expressie van vele genen en speelt een belangrijke rol in het algemene antwoord op antibiotica. [7,8]

Andere minder belangrijke mechanisme van resistentie ontwikkeling zijn de (hyper)productie van kapsel polysacharide, efflux pompen en porines. [1,7,8]

Verworven resistentie, plasmidair

In februari 2016 werd er voor het eerst plasmide gemedieerde colistine resistentie beschreven, namelijk op basis van het *mcr-I* gen. Voordien waren alleen chromosomaal gerelateerde mechanismen gekend. *Mcr-I* codeert voor een fosfoethanolamine transferase dat zorgt voor de additie van PEtN aan LPS. Het plasmide verspreidt zich via conjugatie en blijft stabiel aanwezig ook zonder selectieve druk van polymyxines. [10] *Mcr-I* vertoont grote gelijkenissen met genen uit *Moraxella* spp. [11] De oorsprong van het *mcr-I* zou bij de dieren liggen en van hieruit overgedragen zijn naar de mens. Hiervoor zijn er verschillende argumenten, zoals de hoge selectiedruk bij dieren, associatie met andere genen die vaak voorkomen bij dieren en dierlijke pathogenen. [12] De proportie van positieve stalen ligt hoger bij dieren dan bij mensen. [10]

Mcr-I werd voor het eerst beschreven in China. [10] Vlak na publicatie volgde de detectie en rapportering in verschillende landen. [13] We kunnen stellen dat *mcr-I* momenteel wereldwijd verspreid is. (Fig. 3) [8]

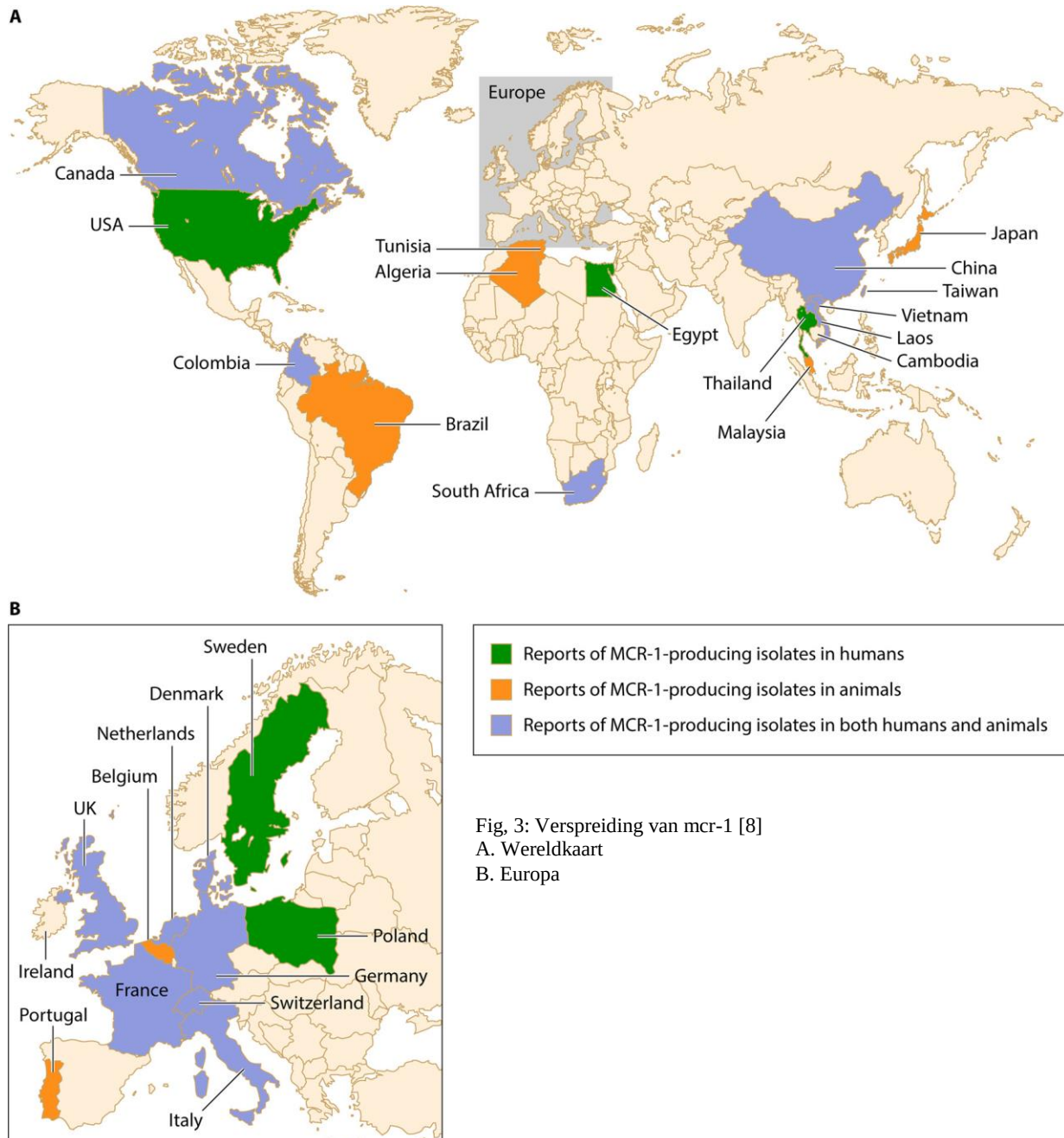


Fig. 3: Verspreiding van mcr-1 [8]
A. Wereldkaart
B. Europa

Di Pilato et al. beschrijven mcr-1.2 een functionele variant van mcr-1. Genomische analyse toont een nucleotide verschil aan, wat leidt tot een verandering van aminozuur in de N-terminus van het proteïne. Andere chromosomale oorzaken voor colistine resistentie worden uitgesloten en na transfer door conjugatie wordt er een MIC stijging voor colistine waargenomen. Het gemuteerde proteïne is dus functioneel. [14]

Volgend op de ontdekking van mcr-1 zijn Xavier et al. nagegaan wat de oorzaak was in verschillende resistente stammen die geen mcr-1 bezaten. Ze zijn uitgekomen op een 2^e plasmide gemedieerd resistentie mechanisme mcr-2. Mcr-2 is voor 76.75% identiek aan mcr-1 en codeert ook voor een fosfoethanolamine transferase. [15]

Heteroresistentie

Heteroresistentie is het voorkomen van resistentie aan colistine in een subpopulatie van een anders gevoelige populatie. De meeste mechanismen voor heteroresistentie blijven onbekend. Net zoals de klinische significantie. Er zijn geen precieze data het exacte percentage heteroresistente isolaten aanwezig in de populatie. Niet alle methoden voor gevoeligheidsbepaling detecteren dit. [16]

Gevoeligheidsbepaling

De optimale methode voor de gevoeligheidsbepaling van colistine is nog niet bepaald. Er zijn verschillende moeilijkheden met betrekking tot deze gevoeligheidsbepaling. Deze hebben te maken met de slechte diffusie in de agar, de kationische eigenschappen van colistine, het voorkomen van heteroresistentie en het gebrek aan een betrouwbare referentiemethode. [8] De EUCAST en CLSI hebben een joint working group (jwg) opgericht om dit verder uit te klaren.

Dilutie methoden

Broth microdilutie (BMD) volgens de ISO standaard is de referentiemethode. Ook de jwg stelt deze methode als referentie voorop. [17] Toch zijn er ook hier verschillende factoren die het resultaat kunnen beïnvloeden. De belangrijkste is de satureerbare adsorptie van colistine aan plastic. Het soort plastic en de coating ervan beïnvloeden de hoeveelheid die geabsorbeerd wordt. [18,19] Hier beveelt de jwg het gebruik van niet gecoate polystyreen platen aan. [17] Het toevoegen van polysorbaat 80 (P-80, een surfactant) vermindert de adsorptie en verlaagt zo de gemeten MIC. [18,19] Een andere verklaring voor de verlaging van de MIC bij het toevoegen van P-80 zou een synergetisch effect met colistine kunnen zijn. [20] Data hierover zijn niet eenduidig. [8,20,21] De jwg raadt het gebruik van surfactant af. [17] Aangezien het gaat om een satureerbare adsorptie heeft dit vooral een effect bij lage concentraties. Bij gevoelige stammen wordt een daling van de MIC waarde gezien bij het toevoegen van P-80, terwijl dit bij resistente isolaten niet het geval is. [21] Een frequent voorkomend probleem van BMD is het voorkomen van skip wells wat zorgt voor niet herhaalbare en niet interpreteerbare resultaten. [8] Een groot nadeel van de ISO standaard BMD is dat deze niet commercieel beschikbaar is.

De jwg raadt aan om colistinesulfaat poeder te gebruiken in gevoeligheidsbepalingen. [17] CMS kan niet gebruikt worden. [8,20] De commerciële preparaten van colistinesulfaat bestaan uit een ongespecificeerd mengsel van chemisch verwante verbindingen. [20] De samenstelling kan variëren tussen fabrikanten en zelfs tussen verschillende loten. Toch lijkt dit niet zo'n grote impact te hebben op de bekomen resultaten. [8]

Gelet op de structuur en werking van colistine kan de hoeveelheid kationen in het medium een invloed hebben op de resultaten van de gevoeligheidsbepaling. Het gebruikte medium kan een bron van variatie zijn. De impact hiervan is vooralsnog onduidelijk. [22] De jwg raadt het gebruik van cation adjusted media aan. [17]

Voor de commercieel beschikbare BMD methode werd maar een beperkt aantal studies gevonden.

Er zijn 2 studies die de accuraatheid van de Sensititer evalueren. Janet et al. vergelijkt de Sensititer met BMD met aanwezigheid van P-80. De MIC waarde van de Sensititer lagen significant hoger dan deze bekomen met BMD + P-80. De grootste afwijkingen op de MIC waarde kwamen voor bij een lage MIC net zoals bij BMD zonder P80. [23] Wat suggereert dat Sensititer ongeveer dezelfde resultaten bekomt als BMD zonder P-80. Matuschek et al. vergelijkt de Sensititer ten op zichte van ISO BMD. De Sensititer is betrouwbaar (EA van 96%) als er geen skipped wells aanwezig zijn. [24]

De performance van de Umic is nog niet geëvalueerd. [8]

Broth macrodilutie vertoont een goede overeenkomst met BMD, maar is niet commercieel beschikbaar. [8,23]

Agar dilutie, een andere referentiemethode, wordt nog weinig gebruikt maar vertoont in de meeste studies wel een goede overeenkomst met BMD. [8,20,21] Het gebruik van een hoger inoculum zou beter zijn voor de detectie van heteroresistentie. [16,21] De jwg raadt het gebruik hiervan af. [17]

Diffusie methoden

De grootte en amfipatische natuur van colistine belemmert de diffusie door de agar. Als gevolg hiervan bekomt men kleine inhibitiezones bij disk diffusie. Dit maakt het moeilijk om een onderscheid te maken tussen gevoelige en resistente isolaten. Men bekomt hierdoor vele verry majer errors (VME) t.o.v. dilutiemethoden. [8,20,21] EUCAST en CLSI voorzien dan ook geen breekpuntdiameters meer. [25,26] Rosco beschrijft een pre-diffusie techniek. Door het antibioticum meer overnacht de tijd te geven om te diffunderen worden grotere inhibitiezones verwacht. [27]

Gradiënt diffusie bv. E-test is ook gebaseerd op diffusie van colistine door de agar. De overeenkomst met dilutie methoden is afhankelijk van de studie, met VME van 5-32%. [8,20] Er lijkt een trend te zijn dat studies met weinig resistente isolaten een betere overeenkomst te vinden dan deze met meer resistente isolaten. [8] Tan and Ng teste 172 isolaten waarvan er 54 (31,4%) resistent zijn t.o.v. agar dilutie. Er worden 8 (4,7%) VME gevonden, waarvan de meeste bij *P. aeruginosa*. [28] Hindler et al. vergelijkt 107 isolaten waarvan er 19 (17,8%) resistent zijn t.o.v. BMD + P80. Hier komen 6 (32%) VME voor en bekomt men een EA van 61%. [23] Arroyo et al. vergelijkt de E-test t.o.v. BMD. Van de 115 isolaten getest waren er 22 (19,1%) resistent. Een goede overeenkomst werd gevonden voor MIC waarde van 0,25-1 µl/ml. Bij MIC waarde onder de 0,25 en boven de 64 µg/ml. Er worden 2 VME vastgesteld. [29] Algemeen lijken de MIC's van resistente kiemen onderschat te worden en deze van gevoelige overschat. [23] Een studie voert een vergelijking uit met stalen met een verhoogde MIC voor colistine. 59 van de 61 isolaten zijn resistent met BMD. Hier bekomt men 24 (39,3%) VME. De MIC waarden lagen lager dan deze bekomen met BMD. [30] In december 2016 stuurde Biomerieux een waarschuwing rond in verband met het gebruik van E-testen voor de gevoeligheidsbepaling van colistine. De E-test zou bij *P. aeruginosa* een groot risico op VME hebben. Voor *Enterobacteriaceae* lijkt er geen probleem van VME te zijn, maar worden vooral de MIC waarde van gevoelige stammen onderschat. [31] De E-test zou net zoals agar dilutie een geschikte methode zijn voor de detectie van heteroresistentie. [16]

Diffusie methoden zowel disk diffusie als gradiënt diffusie worden niet aangeraden door de jwg.

Automaten: Vitek 2

Er zijn maar weinig studies die de Vitek 2 evalueren voor de gevoeligheidsbepaling voor colistine. De meeste hiervan gebruiken geen of zeer weinig resistente stammen. [32,33,34] In de meeste studies wordt een goede categorische overeenkomst (> 95%) bekomen ten opzichte van BMD of agar dilutie. [30,32,33,34] Het aantal vals

gevoelige resultaten ligt bij de meeste studies tussen de 0 en 1%. [30,32,33,34] Hier zitten zowel studies met geen resistente isolaten als studies met bijna alleen maar resistente isolaten. [30,34] Een studie vermeld 57% VME in een vergelijking met agar dilutie. [28] Een andere studie vermeld 20% VME in vergelijking met BMD. [35] Verder is er ook geen detectie van heteroresistente isolaten. [36]

Kwalitatieve methode: Fenotypisch

De Rapid Polymyxin NP test is een kwalitatieve techniek om vlug colistine resistentie op te sporen in *Enterobacteriaceae*. Na evaluatie met 135 resistente en 65 gevoelige stammen geeft de test een goede sensitiviteit (99.3%) en specificiteit (95.4%). [37] De test kan ook gebruikt worden voor de detectie van colistine resistente *Enterobacteriaceae* rechtstreeks uit positieve hemoculturen. [38]

Er bestaat een selectieve bodem (SuperPolymyxin medium) voor de detectie van colistine resistente isolaten. Hierop groeien zowel intrinsiek resistente gramnegatieve bacillen die een heel hoge MIC hebben als kiemen met verworven resistentie waarvan de MIC meestal lager ligt. De sensitiviteit en specificiteit zijn 100% na het testen van 88 resistente en 36 gevoelige isolaten. [39]

Kwalitatieve methode: Genotypisch

Het opsporen van chromosomale mutaties om resistentie voor colistine aan te tonen is moeilijk. Niet alle mechanismen zijn bekend en het is moeilijk uit te maken of gevonden mutaties lijden tot resistentie. De directe detectie van plasmide afhankelijke genen zoals *mcr-1* of *mcr-2* kan wel gebruikt worden. Aanwezigheid van deze genen maakt het organisme zeker resistent. [8]

Breekpunten

Op basis van de richtlijnen van de jwg hebben de EUCAST en CLSI hun breekpunten aangepast.

De EUCAST heeft zijn breekpunten voor *P. aeruginosa* aangepast. Voordien waren deze gevoelig ≤ 4 mg/l en resistent > 4 mg/l, gebaseerd op de epidemiologische cutoff waarde. De aanpassing is gebeurd op basis van PK en PD informatie, waaruit blijkt dat de blootstelling aan colistine niet de adequate waarde bereikt voor isolaten met een MIC ≥ 4 mg/l. [40]

De CLSI heeft de volgende veranderingen doorgevoerd. De breekpunten van *P. aeruginosa* zijn aangepast. In de M100 S26 waren de breekpunten voor *P. aeruginosa* nog gevoelig ≤ 2 mg/l en resistent ≥ 8 mg/l. De intermediaire categorie is hier weggefallen. Verder zijn ook de zone diameters voor *P. aeruginosa* verdwenen. Deze waren gevoelig ≥ 11 mm en resistent ≤ 10 mm. De breekpunten voor *Acinetobacter* spp. zijn enkel nog geldig voor *A. baumannii* complex. Voor de *Enterobacteriaceae* zijn er epidemiologische cutoff waarde bijgekomen. [26]

Zoals te zien is in onderstaande tabel 1 zijn de breekpunten nu geharmoniseerd.

Verder wordt ook een bijkomende referentie stam *E. coli* NCTC 13846 voorgesteld. Deze is *mcr-1* positief en heeft een MIC waarde van 2-8. [41]

	EUCAST [25]				CLSI [26]				CLSI/EUCAST Joint working group [42]			
	MIC		Diameter		MIC		Diameter		MIC		Diameter	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 2	> 2	Geen zone diameters beschikbaar		$\leq 2^1$	$> 2^1$	Geen zone diameters beschikbaar		$\leq 2^1$	$> 2^1$	Geen zone diameters beschikbaar	
<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	> 2			≤ 2	≥ 8			≤ 2	> 2		
<i>A. baumannii</i> complex	≤ 2	> 2			≤ 2	> 2			≤ 2	> 2		

Tabel 1: Breekpunten volgens EUCAST, CLSI en jwg.

¹ Dit zijn geen breekpunten maar epidemiologische cutoff waarde.

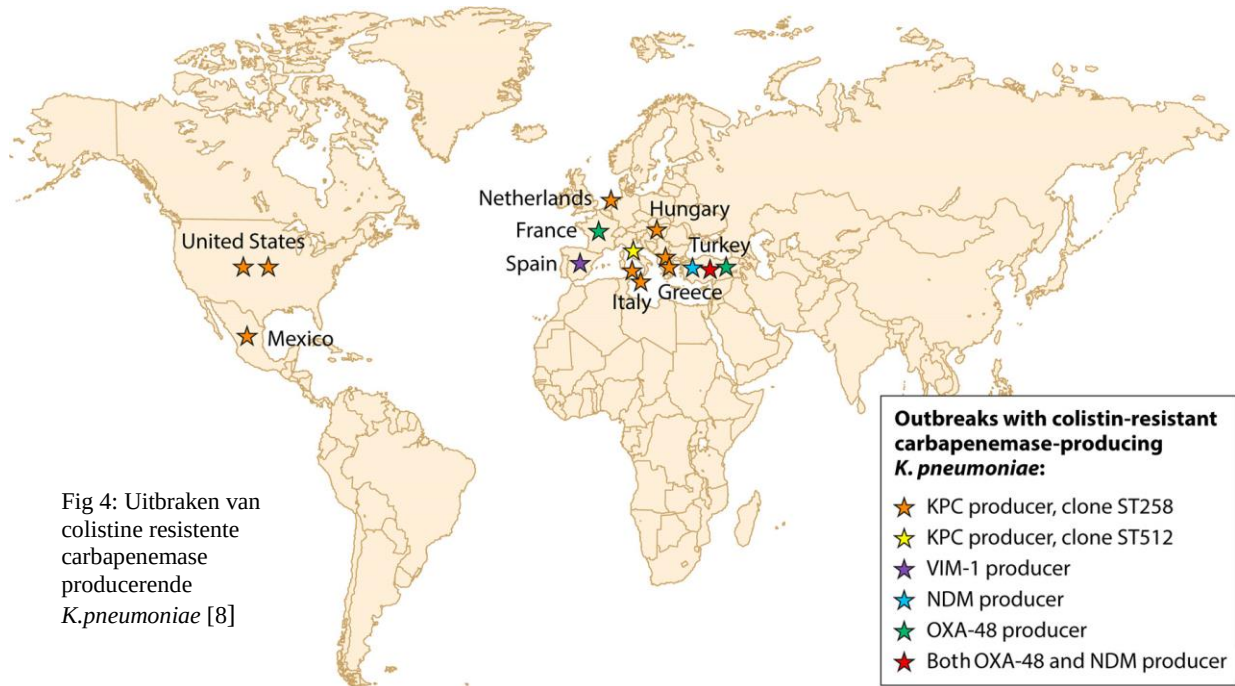
2) Wat is de epidemiologie van mcr-1?

Algemeen

In de SENTRY studie van 2014-2015 werden 526 *E. coli* en 480 *K. pneumoniae* isolaten uit 183 ziekenhuizen over heel de wereld verzameld. 0.4% van de *E. coli* en 4.4% van de *K. pneumoniae* isolaten waren resistent voor colistine. Van de colistine resistente isolaten bezat 4.9% het mcr-I gen. Dit waren allemaal *E. coli* stammen. Bij de carbapenemase producerende isolaten werd er geen Mcr-I terug gevonden. [43]

In de SENTRY studie van 2006-2009 werd er een lager percentage resistentie gevonden (<0.1-1.5%). Toch vond men hier al een stijgende trend onder de *K. pneumoniae* van 1.2% in 2006 tot 1.8% in 2009. [44]

K. pneumoniae is in het algemeen meer onderzocht. Dit komt omdat de pathogeen nosocomiale infecties veroorzaakt en verschillende resistentiemechanismen ontwikkeld heeft tegen verschillende breed spectrum antibiotica. Er is een stijgende trend voor colistine resistentie, vooral in de carbapenemase producerende *K. pneumoniae*. Deze isolaten hebben al tot uitbraken geleid in Noord Amerika en Europa. (Fig 4.) [8]



Bij de carbapenem resistente isolaten die in 2014-2015 naar het NRC gestuurd zijn waren 12,7% van de *K. pneumoniae* en 1,3% van de *E. coli* isolaten resistent voor colistine. Hierbij werd er bij 2 *E. coli* isolaten de aanwezigheid van mcr-I aangetoond. Alle *K. pneumoniae* isolaten waren negatief voor mcr-I. Ook hier werd er een stijging gezien in colistine resistentie van 8% in 2014 naar 14% in 2015. Dit was vooral te wijten aan een stijging bij de *K. pneumoniae* isolaten (14% naar 33%). [45]

Bij boerderijdieren ligt het percentage colistine resistente isolaten in het algemeen hoger dan bij de humane isolaten. In een review van Rhouma el al. over colistine gebruik in varkens rapporteert men resistentie van 1% tot 35% in gezonde en zieke varkens respectievelijk. Colistine wordt dan ook veel gebruikt in landbouwbedrijven, zowel voor de behandeling van infectie, als de preventie en als groei promotor. Colistine wordt oraal toegediend samen met het eten, wat tot variabele concentraties in het GI-stelsel kan leiden en zo optimale omstandigheden geeft voor de ontwikkeling van resistentie. [46]

Mcr-1

McrI is al veel langer aanwezig dan dat het ondekt is. In China is aangetoond in isolaten uit de jaren 1980. In Europa is de oudste melding uit *E. coli* afkomstig van kalveren in 2005. Het eerste mcr-I pos isolaat van mensen is een *Shigella sonnei* uit Vietnam in 2008. [13]

Mcr-I is teruggevonden op alle continenten. (Fig 3.) Er zijn verschillende meldingen geweest over isolaten die mcr-I bevatten. Het is teruggevonden in verschillende genera van de *Enterobacteriaceae*, alhoewel de meest voorkomende *E. coli* is. *Salmonella*, *Klebsiella* en *Enterobacter* spp. komen sporadisch voor. Mcr-I komt voor op verschillende plasmide backbone's met verschillende grootte. Enkele van deze plasmide kunnen ook andere resistentiegenen dragen. Ze worden zowel in mensen, dieren, voedsel als de omgeving gevonden. (Fig 5.) [7,8]

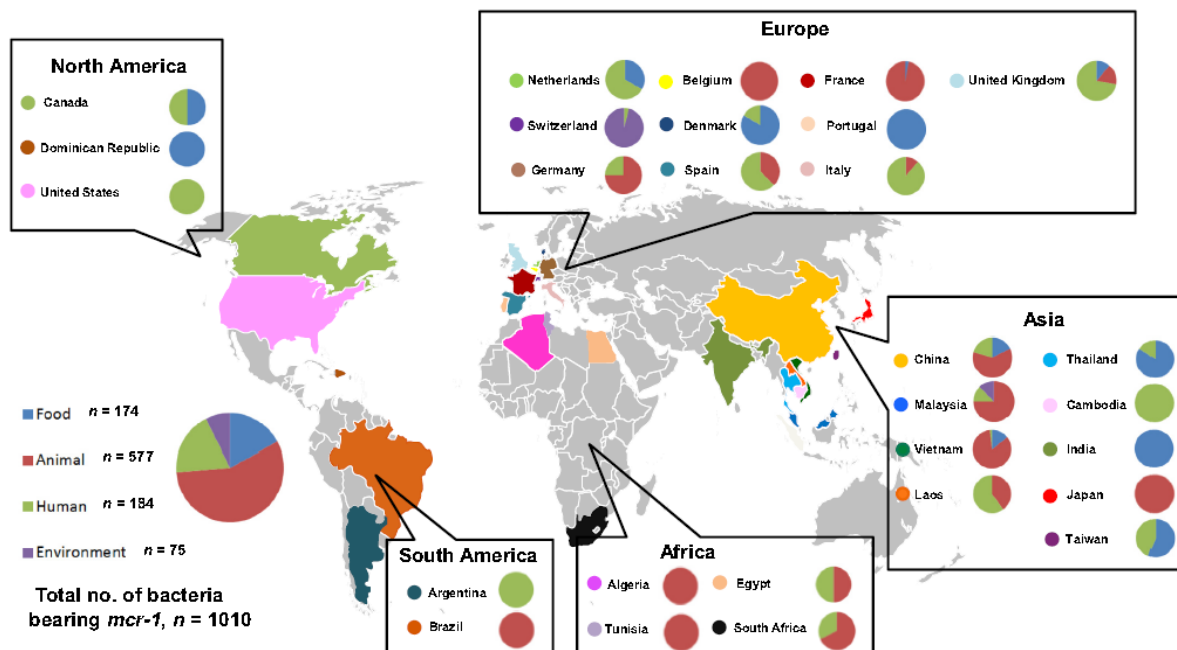


Fig 5: Globale distributie van mcr-1 in isolaten van de omgeving, voedsel, dieren en mensen. [7]

De meeste artikels gaan over boerderijdieren (varkens, kippen, koeien, ...) [46], maar mcr-I komt ook voor bij huisdieren (katten en honden). Lei et al. heeft 566 *Enterobacteriaceae* van honden en katten onderzocht. 14% was resistent voor colistine, hiervan bevatte 62% mcr-I. Verder werd mcr-I ook teruggevonden bij eigenaars van huisdieren en in het voedsel van de dieren. [47]

AZ Groeninge

Sinds September 2016 hebben we alle stammen die op Vitek 2 een MIC ≥ 4 gaven bijgehouden. Deze stammen werden naar het NRC gestuurd ter controle en screening op de aanwezigheid van mcr-I. Tot nu toe zijn er 12 colistine resistente stammen, waarvan er 4 mcr-I positief zijn gevonden. Het gaat om 4 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 6 *E. coli* en 1 *E. aerogenes*. De 4 mcr-I positieve stammen zijn allemaal *E. coli*. In deze periode hebben we 4472 antibiogrammen van *Enterobacteriaceae*, 479 van *P. aeruginosa* en 29 van *A. baumannii* complex uitgevoerd.

Buiten de colistine resistentie hadden van de mcr-I positieve isolaten nog resistentie voor ampicilline en levofloxaciline. De andere mcr-I pos *E. coli* was enkel nog ampicilline resistent.

Bij de colistine resistente isolaten zonder mcr-I waren 2 (*K. pneumoniae*) ESBL positieve isolaten. De rest was of omni gevoelig of nog levofloxacin resistent.

Hieruit kunnen we afleiden dat de aanwezigheid van mcr-I voorkomt, maar toch nog zeldzaam is ($\pm 1/1000$). Er werd alleen mcr-I teruggevonden, geen mcr-2. Buiten de colistine resistentie waren de meeste isolaten vrij gevoelig.

Dit komt overeen met wat gevonden wordt in de rest van Europa. In Barcelona vindt men bij 15 van de 50 klinische colistine resistente *E. coli* mcr-I. De helft hiervan zijn geen MDR isolaten. [48] In Nederland vindt men bij 7 van de 178 colistine resistente gramnegatieve bacillen mcr-I. Dit waren allemaal *E. coli*. [49] In Zwitserland vindt men zowel in klinische als in dragerschapstudies bijna geen tot geen mcr-I positieve isolaten terug. [50,51]

Alle *Hafnia* spp. testen resistent op Vitek 2. Net zoals aangegeven door Jayol et al. [9]

Verder werden sinds 13/3/17 ook alle stammen met een MIC $> 0,5$ op Vitek 2 bijhouden voor controle van de MIC met Sensititer en Umic. Er werden 3 *P. aeruginosa* met een MIC van 2, 1 en 1 gevonden. Bij controle met de Sensititer werd een MIC van 2, 2 en 2 respectievelijk bekomen. 1 *C. farmeri* met MIC van 1 gevonden. Bij controle met Sensititer werd een MIC van 0.5 bekomen. Over deze periode werden er 390 *Enterobacteriaceae*, 101 *P. aeruginosa* en 1 *A. baumannii* getest.

Richtlijnen bij isolatie colistine resistente/mcr-1 positieve stam

Algemene maatregelen voor de verspreiding van mcr-I positieve en in het algemeen colistine resistente stammen te verminderen, zoals het verminderen van het gebruik bij dieren en bij selectieve decontaminatie van het GI-stelsel zijn vooral gericht op het verminderen van de selectie druk. [12,52] In het ziekenhuis worden standaard infectiecontrolemaatregelen (handhygiëne, schoonmaken kamers en medische hulpmiddelen) nageleefd. Zo wordt de verspreiding van bacteriën in het algemeen verminderd. Voor het nemen van extra maatregelen zoals isolatie van de patiënt wordt er in de Europese richtlijnen gekeken naar het gehele resistentie patroon van de kiem. [52] Het Amerikaanse CDC raadt de standaard en extra maatregelen aan bij patiënten met mcr-I positieve stammen. [53] Onderzoek is vooral uitgevoerd naar MDR stammen die mcr-I bevatten. Deze patiënten moeten zeker geïsoleerd worden. [12,13] Het isoleren van patiënten met alleen mcr-I kan besproken worden. [12]

Het bepalen van de MIC moet altijd gebeuren voor de start van een behandeling met colistine. De MIC bepaling moet gebeuren met een BMD. [52] Screening voor colistine resistentie wordt aangeraden bij MDR gramnegatieve [13] en in het algemeen bij alle gramnegatieve [52]. Bij de colistine resistente stammen moet de aanwezigheid van mcr-I nagegaan worden met behulp van PCR. [52, 53]

3) Welke flowchart gaan we in het AZ Groeninge gebruiken?

We gaan na wat de beste en meest haalbare manier van werken is om te implementeren in de routine. Voor we aan deze studie begonnen werd de MIC voor colistine routinematig mee bepaald met de AST-N236 kaart op Vitek 2. Kiemen met een verworven resistentie (MIC ≥ 4) worden gevlagd. Voor deze stammen werd er ter controle een E-test en pre-diffusie test van colistine ingezet. De stam wordt daarna samen met alle informatie van de gevoeligheidsbepalingen opgestuurd naar het NRC. De gevoeligheid voor colistine wordt niet standaard gerapporteerd naar de artsen. Voor de gevallen waar er toch colistine moet gerapporteerd worden, gaan we na welke methoden we in de praktijk best kunnen gebruiken die betrouwbare data genereert. Bij isolaten met een MIC ≥ 4 mg/l kan er dan nagegaan worden of het mcr-I de onderliggende oorzaak is.

Conform de aanbevelingen van de jwg hebben we de Sensititer als referentiemethode gebruikt. De huidige gangbare methode Vitek 2 wordt hiermee vergeleken. Verder worden de E-test, disk diffusie en pre-diffusie meegenomen. Dit zijn eenvoudig uit te voeren testen die vlot beschikbaar. Ook de Rapid Polymyxine NP test werd geëvalueerd. Deze kan een plaats hebben als fenotypische sneltest voor de detectie van colistine resistentie. Daarnaast wordt ook een andere commerciële BMD methode, de Umic, meegenomen. Het voordeel van deze methode is de individueel beschikbare strips per antibiotica.

Beschrijving en werkwijze

De Sensititer EURGNCOL platen zijn onderverdeeld in drie identieke velden. Elk veld bevat volgende welletjes: colistine 0.25 μ g/ml – 8 μ g/ml, piperacillin/tazobactam 2/4 μ g/ml – 32/4 μ g/ml, ceftolozane/tazobactam 0.25/4 μ g/ml – 8/4 μ g/ml, ceftazidime/avibactam 1/4 μ g/ml – 16/4 μ g/ml, meropenem 0.12 μ g/ml – 16 μ g/ml en een positieve controle. 10 μ l van een 0.5 McF bacteriële suspensie in steriel water wordt overgebracht in de cation adjusted Muller Hinton broth met TES buffer. Van hieruit wordt elke wel gevuld. Vanuit de positieve controle wordt er een TSH geënt om te controleren of er met een correct en zuiver inoculum gewerkt werd. Aflezen gebeurt na 18-24u incubatie op 34-36°C. De laagste concentratie die visueel de groei inhibeert is de MIC.

We maken gebruik van de AST-N236 kaarten voor Vitek 2. De kaarten bevatten colistine in een concentratie van 4, 16 en 32 μ g/ml waarmee er resultaten van 0.5-16 μ g/ml gerapporteerd worden. Er wordt een bacteriële suspensie van 0.5-0.63 McF gemaakt die door het toestel nog verder verdund wordt.

De E-test bevat een concentratie gradiënt van 0.16-256 μ g/ml. De strip wordt op een MHE bodem geplaatst die massief geënt is met een bacteriële suspensie van 0.5 McF in 0.45% saline. Na incubatie van 26-20u op 33-37°C wordt de MIC afgelezen op de plaats waar de ellips de strip snijdt.

Voor disk diffusie wordt er gebruik gemaakt van colistine neo-sensitabs van Rosco met een lading van 10 μ g. De neo-sensitab wordt op een MHE agar die massief geënt is met een bacteriële suspensie van 0.5 McF geplaatst. Na incubatie van 16-18u op 35°C wordt de diameter gemeten.

Voor pre-diffusie worden dezelfde neo-sensitabs gebruikt als bij disk-diffusie. De methode 2+18 wordt gebruikt. De neo-sensitab wordt op een MHE geplaatst en 2u geïncubeerd op 37°C. Daarna wordt het schijfje verwijderd en de plaat nog 18u verder geïncubeerd op kamertemperatuur. Vervolgens wordt de plaat massief geënt met een bacteriële suspensie van 0.5 McF en overnacht geïncubeerd op 35-37°C. Nadien wordt de diameter gemeten.

De rapid polymyxin NP is een sneltest die gebaseerd is op de detectie van groei in aanwezigheid van 2 μ g/ml colistine. Groei wordt gedetecteerd als fermentatie van glucose en daardoor verzuring van het medium met de kleuromslag van fenolrood van oranje naar geel. Naast de test wel bevat de strip ook een negatieve en positieve controle wel. Aflezen gebeurt na 2-3u incubatie op 34-38°C.

De Umic strips voor colistine bevatten een controle wel en colistine 0.06 μ g/ml – 64 μ g/ml. Vanuit een suspensie van 0.5 McF in 0.9% NaCl wordt er een 1:200 verdunning gemaakt in Mueller Hinton II broth. Hiervan wordt er 100 μ l in elke wel van de strip gebracht. Aflezen gebeurt na 18-24u incubatie op 35-37°C in een vochtige atmosfeer.

Alle testen werden conform de voorschriften van de fabrikant ingezet.

Fase 1

In een eerste fase wordt er een evaluatie van accuraatheid ten opzichte van de Sensititer als referentiemethode en van de reproduceerbaarheid uitgevoerd. Op basis van de CLSI M52 en Cumitech 31A hebben we besloten 30 isolaten waarvan er 15 gevoelig en 15 resistent te testen voor accuraatheid. De CA en EA moeten min 90% en de VME en ME moeten <3% zijn. Voor de reproduceerbaarheid testen we 5 isolaten 5x waarvan er min 2 resistent zijn en de EA/CA min 95% moet zijn.

Wij gebruiken voor de vergelijking de breekpunten van de jwg. Voor de interpretatie van disk diffusie gebruiken we de oude waarden van de CLSI. We gebruiken deze niet alleen voor PSAE maar extrapoleren deze verder naar de andere groepen. Voor pre-diffusie maken we gebruik van breekpunten opgeven door Rosco. (Tabel 2.)

	Interpretatie zone diameters voor pre-diffusie (Rosco)		
	S	I	R
<i>Enterobacteriaceae</i>	≥ 15	-	< 15
<i>Pseudomonas</i> spp.	≥ 15	14-11	≤ 10
<i>Acinetobacter</i> spp.	≥ 20	19-16	≤ 15

Tabel 2: Interpretatie zone diameters voor pre-diffusie (Rosco)

Resultaten

De resultaten van de kwaliteitscontrole uitgevoerd met *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 en *E. coli* NCTC 13846 liggen binnen de gepubliceerde waarden. (Bijlage 1 en Bijlage 2)

Bij vergelijking met de Sensititer bekomt men voor Vitek 2 een EA van 93,8% en een CA van 96,8%. Voor de E-test wordt een EA van 87,5% en een CA van 100% bekomen. Voor de pre-diffusie en disk diffusie bekomt men respectievelijk een CA van 100% en 75%.

De VME bij de Vitek 2 wordt bekomen met de *E. coli* NCTC 13846. Deze heeft een MIC waarde rond het breekpunt. Na hertesten kan worden vastgesteld dat de Vitek 2 systematisch een te lage MIC waarde van 2 rapporteert.

Bij Disk diffusie zijn er 8 klinische isolaten die als vals gevoelig gerapporteerd zouden worden.

	EA	CA	# ME	# VME
Vitek 2	93,8%	96,8%	0/16	1/16
E-test	87,5%	100%	0/16	0/16
Pre-diffusie	-	100%	0/16	0/16
Disk diffusie	-	75%	0/16	8/16

Tabel 3: Resultaten vergelijking Vitek 2, E-test, pre-diffusie en disk diffusie ten opzichte van Sensititer.

Voor de Rapid Polymyxin NP test bekomt men een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 92,3%. De totale accuraatheid 96,4%. Het vals resistente isolaat was licht positief met de NP test.

		Rapid Polymyxin NP test	
		R	S
Sensititer	R	15	0
	S	1	12

Tabel 4: Resultaten vergelijking Rapid Polymyxin NP test ten opzichte van Sensititer.

De categorische herhaalbaarheid is voor alle methoden behalve de E-test 100%. Bij de E-test bekomt men 1 keer een MIC van 2 i.p.v. 4 wat een verschil in interpretatie geeft. De essentiële herhaalbaarheid van de Vitek 2, Sensititer en E-test is 100%.

Conclusie

Een beperking van deze evaluatiestudie is het kleine aantal stammen dat gebruikt werd. Het was moeilijk om aan een voldoende aantal resistente isolaten te geraken, vooral deze met een MIC rond het breekpunt. Verder werden ook vooral *Enterobacteriaceae* gebruikt, waar het ook interessant is om *P. aeruginosa* en *A. baumannii* isolaten mee te testen.

De Vitek 2 heeft een goede EA en CA overeenkomst met de Sensititer. Er werd wel één isolaat als vals gevoelig gerapporteerd. Door het lage aantal resistente isolaten geeft dit direct een VME van 6,3%. Dit is iets hoger dan de artikels die een goede overeenkomst aantonen (VME < 1%). [30,32,33,34] Maar wel beduidend lager dan de studies die een slechte overeenkomst (> 20%) hadden. [28,35]

De correlatie tussen de MIC waarde van de E-test en Sensititer zijn laag. Dit komt ook overeen met andere recente studies [24] De categorische overeenkomst is wel goed, in tegenspraak met andere studies. [23,30] Men kan deze methode dus wel gebruiken voor categorisatie van *Enterobacteriaceae*. Hoewel dit een goede methode zou zijn voor de detectie van heteroresistentie [16] is dit hier niet gedetecteerd.

Disk diffusie kan niet gebruikt worden om resistentie voor colistine aan te tonen. Zoals verwacht geeft deze methode veel vals gevoelige resultaten.

Pre-diffusie lijkt een potentieel te bezitten voor de correcte categorisatie van isolaten. Dit moet bevestigd worden met een groter aantal isolaten.

De Rapid Polymyxin NP test sensitiviteit en specificiteit zijn vergelijkbaar met deze uit de literatuur [37] Het vals resistente isolaat gaf een zwak positief resultaat maar dit mag volgens de bijsluiters als positief beschouwd worden. De NP test kan wel enkel gebruikt worden bij *Enterobacteriaceae*.

Bij de Sensititer werden soms skipped wells vast gesteld bij het aflezen. Volgens de bijsluiters mag men bij 1 skipped well het resultaat toch aflezen. We hebben deze isolaten echter allemaal hertest. Hier gaf de Sensititer telkens een gevoeliger en meer correct resultaat dan bij de aanwezigheid van de skipped wells. Resultaten met skipped wells, ook al is het maar 1, worden best niet afgelezen. Matuschek et al. komt tot dezelfde bevinding. [24]

Fase 2

In een volgende fase wordt de Vitek 2 verder geëvalueerd ten opzichte van de Sensititer. Hierbij maken we gebruik van een groter aantal stammen onderverdeeld in de volgende groepen: *A. baumannii* complex. (25), *P. aeruginosa* (30) en *Enterobacteriaceae* (40). Als resistente stammen gebruiken we de stalen die bij de epidemiologiestudie verzameld werden. Een deel hiervan werd ook al gebruikt in fase 1. De andere stalen werden at radom verzameld uit de klinische stalen. Omdat *Acinetobacter* spp. niet zo vaak voorkomen hebben we hier gebruik gemaakt van een bestaande collectie van klinische en QC stalen. Bij deze evaluatie werd ook de Umic meegenomen.

Resultaten

De resultaten voor de controlestammen (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 en *E. coli* NCTC 13846) liggen binnen de vooropgestelde waarden. (Bijlage 1 en Bijlage 3)

Vergelijking Vitek 2 met Sensititer

Bij *A. baumannii* wordt een EA van 84.0% en een CA van 96.0% gevonden. Eén van de 2 resistente isolaten werd als vals gevoelig gerapporteerd door de Vitek 2. Bij hertesten bleef het resultaat hetzelfde. Discordante MIC waarden gaven een lagere MIC met Vitek 2 dan met Sensititer.

Bij *P. aeruginosa* wordt een EA van 41.9% en een CA van 100% gevonden. De MIC waarden lagen lager bij Vitek 2 ten op zichte van de Sensititer.

Bij de *Enterobacteriaceae* wordt een EA van 97.5% en een CA van 97.6% gevonden. De categorische afwijking is dezelfde NCTC 13846 stam als in fase 1.

Vergelijking Umic met Sensititer

Bij *A. baumannii* wordt een EA van 96.0% en CA van 100% gevonden en bij *P. aeruginosa* wordt een EA en een CA van 100% gevonden. De twee methoden komen hier vrij goed overeen.

Bij de *Enterobacteriaceae* wordt een EA van 92.5% en CA van 97.5% gevonden. De VME wordt veroorzaakt een klinisch mcr-I positief isolaat. Ook bij de QC resultaten was te zien dat voor *E. coli* NCTC 13846 soms een gevoelig resultaat bekomen werd.

	Vitek-Sensititer				Umic-Sensititer			
	EA	CA	# ME	# VME	EA	CA	# ME	#VME
<i>A. baumannii</i>	84.0%	96.0%	0/23	1/2	96.0%	100%	0/23	0/2
<i>P. aeruginosa</i>	41.9%	100%	0/31	0/0	100%	100%	0/31	0/0
<i>Enterobacteriaceae</i>	97.5%	97.6%	0/27	1/15	92.5%	97.5%	0/27	1/15

Tabel 5: Resultaten vergelijking Vitek 2 en Umic ten opzichte van Sensititer.

De essentiële en categorische herhaalbaarheid van de 3 methoden ligt tussen de 96 en 100%. Bij de Vitek 2 is er een *P. aeruginosa* die een MIC waarde van meer dan 1 dilutie verschil geeft. Bij de Umic geeft *E. coli* NCTC 13846 MIC waarde rond het breekpunt (2-4).

Conclusie

De gevoeligheidsbepaling van colistine met Vitek 2 is geen FDA gevalideerde methode en zou dus niet in de routine gebruikt mogen worden. De methode is intern geëvalueerd door Biomereux. Ze vermelden een EA van 96,1% en een CA van 97,3% met 5,4% VME. Er is geen info beschikbaar over het aantal stammen dat gebruikt werd en de hoeveelheid resistente isolaten die hier bij waren. [54]

Het eerder klein aantal isolaten dat getest werd bij *P. aeruginosa* en *A. baumannii* complex en in het bijzonder het zo goed als ontbreken van resistente isolaten zorgt ervoor dat de inschatting van de VME moeilijk is. Er werden geen ME gedetecteerd. Ook in andere studies worden er geen ME gevonden. [28,32,33,34] Een studie met bijna alleen resistente isolaten vermeld 2 ME. [30] Voor klinische isolaten kan er dus best BMD met de Sensititer uitgevoerd worden.

Voor de *Enterobacteriaceae* zijn er geen grote verschillen tussen Vitek 2, Sensititer en Umic. MIC waarde van $\leq 0,5$ mg/l op Vitek 2 mogen als gevoelig geïnterpreteerd worden. Bij een verhoogde MIC ($> 0,5$ mg/l) kan voor de veiligheid best een microdilutie uitgevoerd worden. De voorkeur gaat hier uit naar de Sensititer.

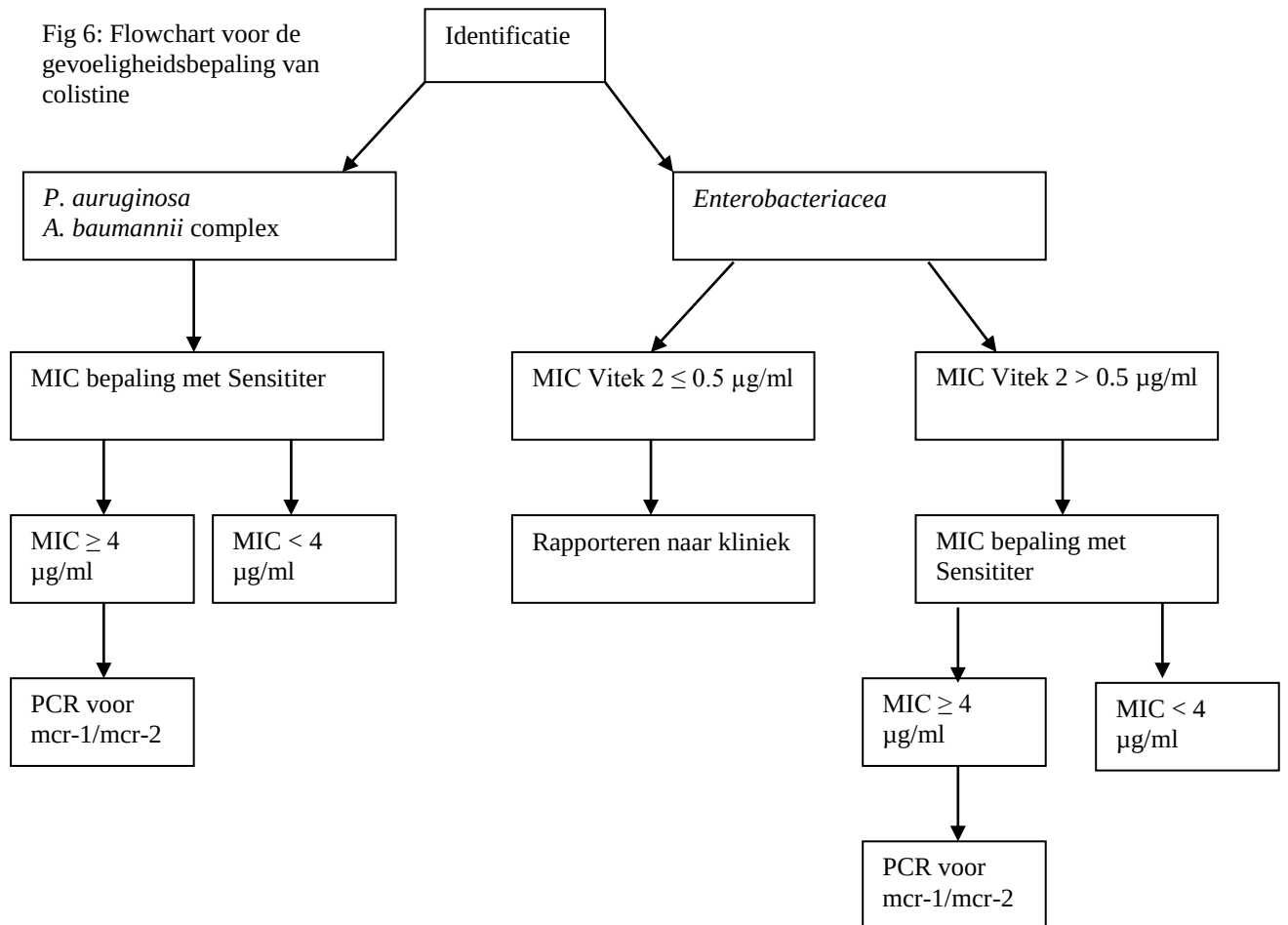
In de praktijk wordt de gevoeligheid voor colistine systematisch verder uitgevoerd met de Vitek 2. Bij isolaten waar de gevoeligheid voor colistine naar de kliniek gerapporteerd moet worden, wordt volgende flowchart gevolgd. (Fig 6.)

Bij *A. baumannii* complex en *P. aeruginosa* wordt een MIC bepaling gedaan met Sensititer.

Bij *Enterobacteriaceae* wordt een MIC $\leq 0,5$ mg/l op Vitek 2 gerapporteerd. Bij een MIC $> 0,5$ confirmeert men de MIC waarde met de Sensititer.

Bij isolaten met een MIC ≥ 4 mg/l wordt een PCR voor de detectie van mcr-I en mcr-2 uitgevoerd.

Fig 6: Flowchart voor de gevoeligheidsbepaling van colistine



COMMENTS

TO DO/ACTIONS

BIJLAGEN

Bijlage 1: Referentie waarden voor QC stammen.

	EUCAST	CLSI	Sensititer	Vitek 2	E-test	Pre-diffusie
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.25-2	0.2-2 (11-17mm)	0.25-2	≤ 0.5-1	0.125-0.5	22-28 mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.5-4	0.5-4 (11-17 mm)	0.5-4	≤ 0.5-2	0.5-4	17-23 mm
<i>E. coli</i> NCTC 13846	2-8	-	-	-	-	-

Bijlage 2: Resultaten fase I.

Resultaten controle stammen

Stam	Diameter disk diffusie (mm)	Diameter pre-diffusie (mm)	MIC E-test	MIC Vitek 2	MIC Sensititer	Resultaat RP-test
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16	27	0.125	≤ 0.5	0.5	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	16	21	0.5	≤ 0.5	2	/
<i>E. coli</i> NCTC 13846	13	8	3	2	4	+
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	/	/	/	/	/	+

Resultaten accuraatheid

Kiem	Nr.	Ø Disk diffusie (mm)	Ø Pre-diffusie (mm)	MIC E-test	MIC Vitek 2	MIC Sensititer	RP-test
MOMO	1	9	0	> 256	≥ 16	> 8	+
KLPN	2	11	0	8	≥ 16	8	+
KLPN	3	9	0	32	≥ 16	> 8	+
KLPN	4	16	26	0.125	≤ 0.5	Opn ¹ : 0.5	-
ENAE	5	16	24	0.125	≤ 0.5	0.5	-
HAAL	6	12	0	4	8	8	+
ESCO	7	11	0	4	4	4	+
CIWE	8	16	27	0.25	≤ 0.5	0.5	-
ESCO	9	17	28	0.125	≤ 0.5	≤ 0.25	-
ESCO	10	16	26	0.125	≤ 0.5	0.5	-
ENAE	11	9	0	24	4	>8	+
ENAE	12	15	26	0.125	≤ 0.5	1	-
ESCO	13	10	0	6	8	8	+
PRMI	14	9	0	> 256	≥16	>8	+
PSAE	15	15	21	0.75	2	2	/
ESCO	16	11	0	4	8	4	+
CIKO	17	15	25	0.064	≤ 0.5	≤ 0.25	-
ACBC	18	16	23	0.094	≤ 0.5	1	/
ENKO	19	16	23	0.125	≤ 0.5	0.5	+ (licht)
PSAE	20	16	15	0.5	≤ 0.5	Opn: 2	/
ESCO	21	11	0	4	4	8	+
KLOX	22	9	0	24	≥ 16	> 8	+
KLOX	23	15	27	0.125	≤ 0.5	0.5	-
HAAL	24	11	0	4	8	8	+
KLPN	25	15	25	0.125	≤ 0.5	Opn: 1	-
KLPN	26	9	0	16	≥ 16	> 8	+
ESCO	27	12	0	3	4	4	+
ESCO	28	16	27	0.125	≤ 0.5	Opn: 0.5	-
SEMA	29	9	0	128	≥ 16	> 8	+
KLPN	30	15	26	0.125	≤ 0.5	0.5	-

Resultaten herhaalbaarheid

Isolaat	dag	Ø disk diffusie (mm)	Ø pre-diffusie (mm)	MIC E-test	MIC Vitek 2	MIC Sensititer	RP-test
1 ESCO ATCC	1: 15/3	16	27	0.125	≤ 0.5	0.5	-
	2: 21/3	17	26	0.125	≤ 0.5	Opn: 0.5	-

25922	3: 28/3	16	23	0.19	≤ 0.5	0.5	-
	4: 4/4	16	27	0.125	≤ 0.5	0.5	-
	5: 6/4	16	25	0.125	≤ 0.5	Opn: 0.5	-
2 ESCO NCTC 13846	1: 15/3	13	8	3	2	4	+
	2: 22/3	13	11	3	2	4	+
	3: 29/3	13	9	3	2	4	+
	4: 4/4	12	10	2	2	4	+
	5: 6/4	13	6	3	2	4	+
3.1 PSAE ATCC 27853	1: 15/3	16	21	0.5	≤ 0.5	2	/
	2: 23/3	16	21	0.5	≤ 0.5	2	/
	3: 30/3	16	24	0.38	≤ 0.5	2	/
	4: 6/4	14	21	0.38	≤ 0.5	2	/
	5: 7/4	16	23	0.38	≤ 0.5	2	/
3.2 PRMI ATCC 12453	1: 15/3	/	/	/	/	/	+
	2: 23/3	/	/	/	/	/	+
	3: 30/3	/	/	/	/	/	+
	4: 6/4	/	/	/	/	/	+
	5: 7/4	/	/	/	/	/	+
4 KLPN V1703- 22128	1: 30/3	15	26	0.125	≤ 0.5	0.5	-
	2: 4/4	16	26	0.125	≤ 0.5	0.5	-
	3: 4/4	17	25	0.125	≤ 0.5	Opn: 0.5	-
	4: 5/4	14	25	0.125	≤ 0.5	0.5	-
	5: 5/4	14	23	0.125	≤ 0.5	Opn: 0.5	-
5 KLPN V1702- 24519	1: 30/3	9	0	16	≥ 16	> 8	+
	2: 5/4	9	0	12	≥ 16	> 8	+
	3: 5/4	9	0	16	≥ 16	> 8	+
	4: 6/4	9	0	16	≥ 16	> 8	+
	5: 6/4	9	0	16	≥ 16	> 8	+

Bijlage 3: Resultaten fase 2.

Resultaten QC stammen

Isolaat	vitek	sensititer	umic
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	2
	≤ 0,5	2	1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	≤ 0,5	0,5	0,5
	≤ 0,5	0,5	1
	≤ 0,5	0,5	0,25
	≤ 0,5	0,5	0,25
	≤ 0,5	0,5	0,25
	≤ 0,5	0,5	0,25
	≤ 0,5	0,5	0,25
	≤ 0,5	0,5	0,25
	≤ 0,5	0,5	0,25
<i>E. coli</i> NCTC 13846	2	4	2
	2	4	2
	2	4	4
	2	4	2
	2	4	2
	2	4	4
	2	8	4
	2	4	4
	2	4	4

Resultaten accuraatheid

Isolaat	Vitek 2	Sensititer	Umic	Opmerking
ACBC 1	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 2	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 3	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 4	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 5	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 6	≤ 0,5	1	0,25	
ACBC 7	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 8	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 9	≤ 0,5	0,5	0,25	
ACBC 10	≤ 0,5	0,5	0,5	
ACBC 11	≤ 0,5	> 8	8	Pre-diffusie = 0; E-test = 6; Herhaling Vitek van discordant resultaat (≤ 0,5)
ACBC 12	≤ 0,5	2	1	
ACBC 13	≤ 0,5	2	1	
ACBC 14	≤ 0,5	2	1	
ACBC 15	≥ 16	> 8	> 64	
ACBC 16	≤ 0,5	0,5	1	

ACBC 17	≤ 0,5	0,5	0,5	
ACBC 18	≤ 0,5	0,5	0,25	
ACBC 19	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 20	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 21	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 22	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 23	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 24	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 25	≤ 0,5	1	0,5	
ACBC 26	2	2	2	Pre-diffusie = 21; E-test = 0,38
PSAE 1	2	2	2	
PSAE 2	≤ 0,5	2	2	Skipt wel ID = PSAE
PSAE 3	≤ 0,5	1	1	Pre-diffusie = 24; E-test = 0,5; Herhaling Sensititer van discordant resultaat (4)
PSAE 4	1	2	2	
PSAE 5	≤ 0,5	1	1	
PSAE 6	≤ 0,5	0,5	0,5	
PSAE 7	≤ 0,5	0,5	1	
PSAE 8	≤ 0,5	2	2	
PSAE 9	≤ 0,5	2	1	
PSAE 10	≤ 0,5	2	1	
PSAE 11	≤ 0,5	2	1	
PSAE 12	≤ 0,5	2	2	
PSAE 13	≤ 0,5	2	1	Skipt wel ID = PSAE + STEP
PSAE 14	≤ 0,5	1	0,5	
PSAE 15	≤ 0,5	2	1	
PSAE 16	≤ 0,5	2	2	
PSAE 17	≤ 0,5	2	1	
PSAE 18	≤ 0,5	1	1	
PSAE 19	≤ 0,5	1	0,5	
PSAE 20	≤ 0,5	2	1	
PSAE 21	≤ 0,5	2	2	
PSAE 22	≤ 0,5	2	2	
PSAE 23	≤ 0,5	2	2	
PSAE 24	≤ 0,5	1	1	
PSAE 26	≤ 0,5	2	1	
PSAE 27	≤ 0,5	1	0,5	
PSAE 28	≤ 0,5	0,5	0,5	
PSAE 29	≤ 0,5	2	1	
PSAE 30	≤ 0,5	0,5	0,5	
PSAE 31	≤ 0,5	2	2	
ENT 1	≤ 0,5	0,5	0,5	
ENT 2	≥ 16	> 8	32	
ENT 3	8	8	8	
ENT 4	≥ 16	8	16	Pre-diffusie = 0; E-test = 12; Herhaling vitek en umic discordant resultaat (≤ 0,5 en 0,25)
ENT 5	4	> 8	32	
ENT 6	8	4	4	MCR-1 pos
ENT 7	≥ 16	> 8	32	
ENT 8	≥ 16	> 8	16	

ENT 9	8	4	4	MCR-1 pos
ENT 10	4	4	2	MCR-1 pos
ENT 11	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 12	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 13	≤ 0,5	0,5	0,125	
ENT 14	≤ 0,5	≤ 0,25	0,25	
ENT 15	≤ 0,5	0,5	0,125	
ENT 16	8	> 8	32	
ENT 17	≤ 0,5	≤ 0,25	1	
ENT 18	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 19	8	4	4	MCR-1 pos
ENT 20	8	8	16	
ENT 21	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 22	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 23	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 24	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 25	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 26	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 27	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 28	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 29	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 30	≤ 0,5	0,5	0,5	
ENT 31	≤ 0,5	0,5	0,5	
ENT 32	≤ 0,5	≤ 0,25	0,25	
ENT 34	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 35	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 36	≤ 0,5	0,5	0,25	
ENT 37	≤ 0,5	0,5	0,5	
ENT 38	≤ 0,5	≤ 0,25	0,5	
ENT 39	≤ 0,5	0,5	0,5	
ENT 40	≥ 16	> 8	32	
ENT 41	≥ 16	8	8	

Resultaten herhaalbaarheid

Isolaat	Vitek 2	Sensititer	Umic
ACBC1	≤ 0,5	1	0,5
	≤ 0,5	1	1
	≤ 0,5	1	0,5
	≤ 0,5	1	0,5
	≤ 0,5	1	0,5
PSAE 1	2	2	2
	≤ 0,5	2	2
	≤ 0,5	2	2
	≤ 0,5	2	2
	≤ 0,5	2	2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1
	≤ 0,5	2	1

<i>E. coli</i> ATCC 25922	≤ 0,5	0,5	0,5
	≤ 0,5	0,5	1
	≤ 0,5	0,5	0,25
	≤ 0,5	0,5	0,25
	≤ 0,5	0,5	0,25
<i>E. coli</i> NCTC 13846	2	4	2
	2	4	2
	2	4	4
	2	4	2
	2	4	2