

CAT Critically Appraised Topic

Referral strategy for repeat isolates: a first evidence-based approach

Author: Silvie Nickmans
Supervisor: Dr. De Beenhouwer
Date: 20/03/2012

CLINICAL BOTTOM LINE

De komst van de volledig geautomatiseerde methodes voor simultane identificatie en gevoeligheidsbepalingen van micro-organismen betekenden een immense evolutie in de microbiologie. Ondertussen zijn er meerdere toestellen commercieel beschikbaar :VITEK®2 (bioMérieux , Marcy l'Etoile, France), BD Phoenix™ (BD, Franklin Lakes, NJ USA), MicroScan® (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) die geautomatiseerde gevoeligheidsbepalingen en identificatie mogelijk maken.

Wanneer bij herhaling een gelijkaardige kiem geïsoleerd wordt uit eenzelfde staaltype bij dezelfde patiënt op zeer korte termijn (vb. met een tijdsinterval van 2 dagen), is het niet ondenkbaar dat deze secundaire isolatie wel eens identiek zou kunnen zijn aan de primaire isolatie, zeker zo dit morfologisch en enzymatisch kan geconfirmeerd worden.

Met de term 'identiek' bedoelen we uniform zowel naar identificatie toe als wat betreft gevoeligheidskarakteristieken. Dit scenario noemen we verder logischerwijze een **repetitieve isolatie**. Uiteraard is het mogelijk om voor elke nieuwe isolatie een volledige geautomatiseerde identificatie (ID) en gevoeligheidsbepaling (AST) uit te voeren, maar wanneer men streeft naar een hoogkwalitatief kosten-effectief laboratorium dat zijn turn around times (TAT) tracht te minimaliseren, kan het interessant zijn een strategie toe te passen waarin het aantal volledig geautomatiseerde ID en AST analyses kan gereduceerd worden door middel van een verwijzingsprincipe, zonder aan kwaliteit in te boeten.

Zodoende wordt de TAT significant gereduceerd, het laboratoriumpersoneel ervaart een lagere workload en dus komt er tijd vrij voor andere taken. Niet in het minste zal men tevens aan de economische aspecten tegemoet komen. In de literatuur vinden we eerder weinig terug omtrent zulke verwijzingsstrategieën, Garcia's Clinical Microbiology Procedures Handbook alsook de CLSI (M100-S20 document) bieden ieder wel een - eerder vage - richtlijn omtrent deze repetitieve isolaties, erbij vermeldend dat ieder laboratorium op basis van eigen ervaringen en specifieke omstandigheden individueel een werkstrategie dient uit te werken. Deze guidelines (cfr. infra) zijn louter gestoeld op expert opinions, eerder dan op daadwerkelijke evidence-based fundamenteën. In het licht van deze bevindingen stel ik graag deze prospectieve studie voor, in de hoop dat het een fundament kan zijn voor laboratoria te velde , die tevens de work-up van repetitieve isolaties in vraag stelde.

Het is uiteraard mogelijk om op elk relevant isolaat een geautomatiseerde analyse uit te voeren, maar in tijden waar kosten-efficiëntie en een minimale turn-around-time met kwaliteitsbehoud meer dan ooit de streefdoelen horen te zijn, is het uw overweging meer dan waard om een eventuele verwijzing van identieke stalen binnen de toegelaten criteria te implementeren, of op zijn minst deze CAT met open aandacht door te nemen.

Hedentendage beschikt men voor identificatie en gevoeligheidsbepaling van geïsoleerde micro-organismen uit klinische stalen over meerdere geautomatiseerde “walk-away” instrumenten, die snelle en accurate resultaten beloven. Wanneer herhaaldelijk een morfologisch gelijkaardig micro-organisme geïsoleerd wordt uit eenzelfde staaltype bij dezelfde patiënt binnen een korte tijdsspanne, is het waarschijnlijk zo dat het hier om dezelfde kiem gaat als bij de eerste isolatie. De nood aan een volledig herhaalde identificatie en gevoeligheidsbepaling kan dan in vraag gesteld worden : men zou kunnen verwijzen naar de resultaten van de recente primaire analyse.

Voordelen van deze methode zijn onder andere een snellere generatie van afgewerkte resultaten naar de clinicus toe (reductie TAT) , inperking van de workload voor de medische laboratoriumtechnologen (MLT), en niet in het minste kosteneffectiviteit.

De vooropgestelde werkstrategie is dus de volgende : volledige identificatie en gevoeligheidsbepaling van een isolatie wordt niet herhaald wanneer de patiënt in kwestie reeds een positieve cultuur had afkomstig van hetzelfde type staal minder dan 1 week geleden, op voorwaarde dat er morfologische en eventueel enzymatische evidentie is dat het om dezelfde kiem gaat.

Richtlijnen met betrekking tot zulke recurrenente isolaties uit de literatuur zijn onder andere terug te vinden bij Garcia et al: zij beschrijven in hun *Clinical Microbiology Procedures Handbook* onderstaande adviezen omtrent zulke verwijzingsprocedures.

I. Guidelines Garcia et. al (Clinical Microbiology Procedures Handbook 3rd edition, Chapter 3.3.2.12)

In Garcia's guidelines adviseert men wat betreft herhaalde isolaties van eenzelfde organisme het volgende:

zij achten het onnodig om een volledige identificatie en gevoeligheidsbepaling uit te voeren voor een kiem, wanneer de patiënt in kwestie reeds een positieve cultuur had afkomstig van dezelfde staalbron in de laatste **7 dagen**, waarvan de identiteit eveneens strookt met de nieuwe positieve cultuur. De **presumptieve identiteit** van de cultuur wordt in dit stadium beoordeeld **op basis van morfologische kenmerken** (tabel 3.3.2-1) **en snelle enzymatische tests** (vb. indol, oxidase)

Een goede algemene regel is volgens hen de identificatie d'office te herhalen na een termijn van 7 dagen, ook zo de morfologie gelijkaardig is aan en de presumptieve identificatie overeenkomt met het primaire isolaat.

Uitzondering op deze gegeneraliseerde richtlijn bestaat voor niet-hemolytische stafylokokken, waarbij voor elke nieuwe isolatie zeker een coagulase-test zou moeten worden herhaald. Wat betreft beleid voor herhaling van gevoeligheidsbepalingen geldt als Garcia's algemene regel een verwijzingstermijn van 7 dagen voor oxacilline-gevoelige stafylokokken en de meeste gram-negatieve staven, 4 dagen voor *P. aeruginosa* en 30 dagen voor vancomycine-resistente enterokokken. “Zo de prevalentie ESBL's significant is in de regio in kwestie, kunnen tevens bijkomende surveillances geïndiceerd zijn”, vermelden zij tenslotte.

2. Guidelines CLSI 2010 (M100-S20)

Ook de CLSI wijdt een hoofdstuk aan richtlijnen omtrent dit verwijzingsprincipe:

Het CLSI M 100-S20 document (2010) wijst erop dat - zo men een verwijzingsprocedure hanteert - men rekening dient te houden met eventuele antibioticatherapie en mogelijks daaraan gelinkte resistentie-ontwikkeling. Isolaten die initieel gevoelig zijn kunnen resistent of intermediair gevoelig worden na initiatie van therapie. Dit laatste kan volgens hun schrijven namelijk reeds gebeuren binnen 3 à 4 dagen, en werd vooral beschreven bij *Enterobacter species*, *Citrobacter species*, *Serratia species* voor wat betreft 3^e generatie cefalosporines, en bij *P. aeruginosa* zelfs met alle relevante antibiotica. De CLSI wijst er in dit M 100-S 20 document daarom op dat onder bepaalde omstandigheden het raadzaam is om consecutieve isolaten te hertesten om recent ontwikkelde resistentiepatronen te detecteren , zelfs vroeger dan het tijdsinterval van 3 à 4 dagen zoals reeds hoger vermeld. De beslissing om dit al dan niet uit te voeren is afhankelijk van de specifieke situatie en de ernst van de patiëntstatus. Laboratoriumrichtlijnen in verband met diligentie omtrent herhaalde isolaties worden idealiter bepaald intern na overleg met de medische staf, zo adviseert de CLSI verder. Evidence-based data die bepaalde strategieën numeriek al dan niet rechtvaardigen ontbreken ook hier.

Workflow labo microbiologie OLV Aalst

In het Onze-Lieve-Vrouw ziekenhuis te Aalst hanteert men in het laboratorium ook een verwijzingsprocedure ietwat gelijkend op deze beschreven in bovenstaande guidelines. De invoering ervan gebeurde gebaseerd op bovenvermelde expert opinions, zonder retrospectieve noch prospectieve evaluatie. De vooropgestelde verwijzingstermijn bedraagt 7 dagen, ook voor *P. aeruginosa*. Wanneer bij herhaling binnen een tijdsspanne van 7 dagen een gelijkaardige kiem geïsoleerd wordt uit eenzelfde staalsoort van eenzelfde patiënt, en de presumptieve identificatie overeenkomt met de identificatie van het primaire staal wordt dit tweede staal niet opnieuw volledig uitgewerkt maar wordt er gerefereerd naar de identiteit en gevoeligheidsbepaling van het geïsoleerde micro-organisme uit het vorige staal. Uitzondering op deze verwijzingsregel is dat voor beta-hemolytische stafylokokken bij elke nieuwe isolatie coagulase- & DNase-test herhaald worden, alsook een beperkt antibiogram (oxacilline, ciprofloxacine, cefoxitine) Uitzondering op deze verwijzingsregel is bijvoorbeeld volgende situatie: zo een patiënt onder ceftazidime-therapie staat omwille van een purulent respiratoir staal met massaal geïsoleerde ceftazidime-gevoelige *P. aeruginosa*, en 3 dagen later ontvangt men weerom een respiratoir staal van diezelfde patiënt met nog steeds massieve isolatie van *P. aeruginosa*, is het raadzaam om dit isolaat te onderwerpen aan nieuwe gevoeligheidsbepaling: de logica doet een resistentie-ontwikkeling vermoeden dus nieuwe antibiogrambepalingen zijn noodzakelijk.

Voor onze prospectieve studie richten we ons op de groep van de gram-negatieven, hetgeen de overheersende gram-negatieve focus in alle verdere aspecten van deze CAT verklaart.

Workflow Repeat isolates in OLVZ Aalst

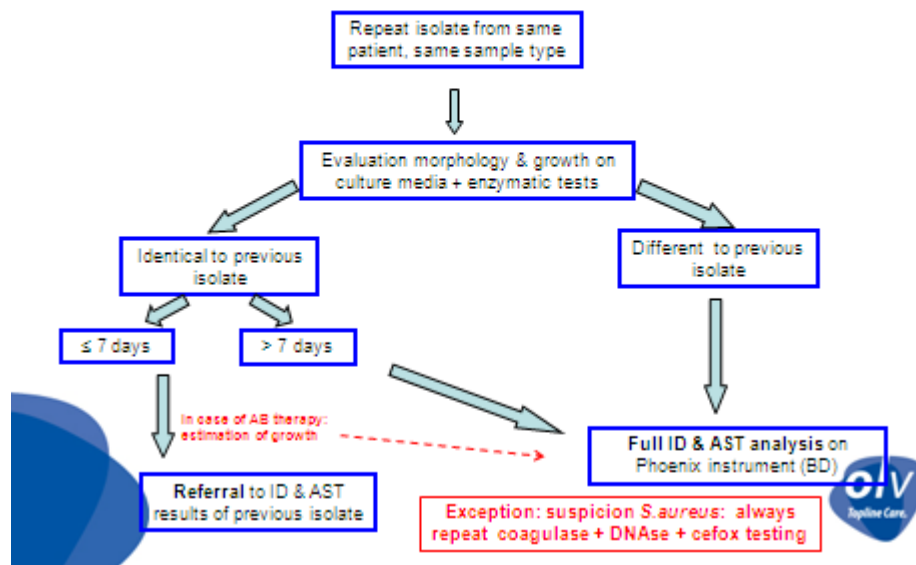


Fig. 1 Workflowdiagram huidige situatie

QUESTION(S)

- 1) Is deze werkmethode bruikbaar, met andere woorden wat zijn zijn performantiekarakteristieken?
- 2) Is er een effect van antibioticadruk?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "repeat isolations, duplicate isolates, referral strategy microbiology"
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>), Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/hta.htm>)
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), American Diabetes Association (ADA; <http://www.diabetes.org/home.jsp>), National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC; <http://diabetes.niddk.nih.gov/>), Westgard QC (<http://www.westgard.com>), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; <http://www.cms.hhs.gov/clia/>)
- 5) UpToDate Online version 20.2

1. *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*

- CLSI M100-S20: Performance standards for microbial susceptibility testing ; Twentieth informational supplement. Vol 30 n°1.
- Garcia et al. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Volume 2, Chapter 5.17 Evaluating Antimicrobial Test Systems. P 5.17.1-5.17.10
- Garcia et al. Clinical Microbiology Procedures Handbook Volume 1 , Chapter 3.3.2
- U.S. Food and Drug Administration. Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry and FDA. Issued March 5, 2007. Rockville, MD
- BSAC. Temocillin, rationale for the BSAC clinical breakpoints, version 1,0, 2007.

2. *Reviews*

- U.S. Food and Drug Administration. 1991. Review criteria for Assessment of Antimicrobial Susceptibility Devices, revised version Washington. D.C.

3. *Original Articles*

- Andrews JM, Jevons G, Walker R, Ashby J, Fraiese AP. Temocillin susceptibility by BSAC methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; **60**: 185-187.
- Rodriguez-Villalobos H, Cardentey-Reyes A, Thiroux C, Nonhoff C, Struelens MJ. Comparison of four commercial methods for determining temocillin susceptibility of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; **63**: 832-834.
- R. Leclercq et al. EUCAST Expert rules (version 2.0): Table 1: Intrinsic Resistances in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Oct 21 Epub ahead of print

4. *Reference Works, Handbooks and Databases*

- Sanford Guide to Antimicrobial Therapy, 2010-2011. Belgian/Luxembourg Edition

5. *Posters, “grey literature”, presentations:*

- K.G. Snow et al. Evaluation of the Becton Dickinson Phoenix and bioMérieux VITEK Legacy Automated Microbiology Identification and Antimicrobial Susceptibility Systems. (as presented at the 106th General Meeting of the ASM, Orlando, FL, 2006)

I. Initiële evaluatie van primaire cultuurbodems

Het correct aflezen van groei op de primaire cultuurbodems is een determinerende fase binnen de verwijzingsprocedure. Bij deze eerste fase worden de kolonies geëvalueerd en kwantitatief beschreven, zo nodig geacht wordt zal een Gramkleuring worden uitgevoerd ter differentiatie. In tabel 2 zijn enkele gram-negatieve voorbeelden met hun bijhorende kenmerken opgelijst.

Belangrijke aandachtspunten bij de initiële aflezing van de culturen zijn.:

- Morfologie: groeikenmerken op de verschillende voedingsbodems
- Selectieve groei of inhibitie op de verschillende selectieve primaire media
- Evaluatie van het hemolyse-patroon zo aanwezig.
- Fermentatie van suikers of polyolen aanwezig in de cultuurbodems met kleurreactie van de kolonies tot gevolg (bv. lactose, mannitol)
- Pigmentproductie :
 - carotenoïdpigment bij *Streptococcus agalactiae*
 - pyoverdine-pigment bij *Pseudomonas aeruginosa*
- Geur kan sterk indicatief zijn voor de aanwezigheid van een bepaald genus:
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Proteus species*

Deze vaardigheid is uiteraard persoons- en ervaringsafhankelijk.

TABEL 1: Kolonie morfologie op primaire media: enkele gram-negatieve voorbeelden.

Organisme	Morfologie		
	Bloedagar	Chocolade	McConkey
<i>E. coli</i>	Grijs, mucoïede, Plat-convex, niet-zwermer, soms beta-hemolyse	Idem bloedagar	Roze – donker centraal
<i>Proteus sp.</i>	Plat, grijs, zwermer	Idem bloedagar	Kleurloos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Plat, grijsgroen , randen uitlopend, metaalglans , mogelijk mucoïd	Idem bloedagar	Kleurloos

2. Preliminare identificatie en aanvullende snelle tests van repetitieve isolaties.

Voor gram-negatieve micro-organismen kan in bepaalde gevallen reeds een presumptieve identificatie worden gesteld aan de hand van enerzijds de morfologie en anderzijds enkele snelle enzymatische testmethodes zoals oxidase of indol(spot)test.

Snelle identificatieprocedures zoals de katalase, oxidase, of indol(spot)test voor klinisch relevante kolonies kunnen eenvoudig uitgevoerd worden op de gegroeide kolonies waardoor men in bepaalde gevallen reeds een presumptieve identiteit kan vermoeden, cfr. tabel 2.

In tabel 2 vindt men een praktisch overzicht van dergelijke directieve methoden bij identificatie van gram-negatieve kolonies, als er reeds een genus vermoeden is op basis van morfologie & gramkleuring, zoals beschreven in de Clinical Microbiology Procedures Handbook van Garcia et al. De meeste gram-negatieve enterische bacillen groeien goed op de selectieve MacConkey voedingsbodem (met uitzondering van de HACEK groep). Deze MacConkey voedingsbodem bevat ondermeer kristalviolet & galzouten ter suppressie van gram-positieve micro-organismen, met lactose als indicator ter differentiatie van lactose-positieve micro-organismen (rooskleurig) , en lactose-negatieve micro-organismen die kleurloze kolonies vormen.

GRAM-NEGATIEVE KIEM	PRESUMPTIEVE IDENTIFICATIE	ADDITIONELE TEST VOOR DEFINITIEVE ID
<i>E. COLI</i>	INDOL-POSITIEF (98%) OXIDASE-NEGATIEF BETA-GLUCURONIDASE +	MEESTAL LACTOSE + (95%)
<i>P. MIRABILIS</i>	ZWERMING INDOL -	ZO AMPI S : GEEN VERDERE IDENTIFICATIE NODIG
<i>P. VULGARIS</i>	ZWERMING INDOL + (98%)	GEEN VERDERE TEST VOOR DEFINITIEVE IDENTIFICATIE
<i>P. AERUGINOSA</i>	OXIDASE + (99%) TYPISCHE GEUR PYOVERDINE INDOL -	GEUR EN/OF BLAUWGROEN PIGMENT ZIJN DOORSLAGGEVEND

TABEL 2: SNELLE CONVENTIONELE METHODEN TER PRESUMPTIEVE IDENTIFICATIE VAN GRAM-NEGATIEVE KOLONIES ZO GENUS VERMOEDEN OP BASIS VAN MORFOLOGIE/GRAM

3. Prospectieve studieopzet: verwijzingsprocedure bij gram-negatieve isolaten.

Per 15 februari 2011 startten we een prospectieve studie waarbij alle consecutieve gram-negatieve isolaten die volgens de routine-procedure normaliter zouden verwezen worden op basis van morfologie en eventuele enzymatische tests naar de voorafgaande resultaten van identificatie en antibiogramresultaten, ditmaal echter wél onderworpen werden aan uitgebreide geautomatiseerde identificatie en gevoeligheidsbepalingen. De staalbronnen waren van urinaire, respiratoire of andere varia-origine.

Alle gram-negatieve isolaten uit deze types staalbronnen die minder dan 7 dagen geleden een gelijkaardig (naar morfologie en enzymatische testen) resultaat vertoonden afkomstig van eenzelfde staalbron, werden in het kader van de prospectieve studie opnieuw onderworpen aan volledige uitwerking naar identiteit en gevoeligheidsbepalingen aan de hand van de geautomatiseerde Phoenix (BD) technologie. Voor urinaire isolaten werden BD Phoenix® UNMIC/ID-85 panels gebruikt voor identificatie én antibiogrambepaling, voor een gram-negatieve isolatie uit een varia-staal gebruikte men een BD Phoenix® NMIC/ID-84-panel.

3.1 Methodologie

3.1.1 Doel studie

Het doel van deze prospectieve studie betrof de evaluatie en validatie van de werkmethode die de verwijzing van identiteit en antibiogram voor een herhaalde isolatie toelaat indien deze voldoet aan duidelijk afgelijnde condities: zo de isolatie afkomstig is van dezelfde patiënt, hetzelfde staaltipe betreft, de morfologie en (beperkte) enzymatische karakteristieken stroken met de identiteit die bij de 1^e geautomatiseerde uitwerking bekomen werd, én dit gebeurde < 7 dagen geleden.

Wanneer de isolatie voldoet aan de vooropgestelde condities, is het dan noodzakelijk om deze secundaire isolatie opnieuw te onderwerpen aan geautomatiseerde analyses? Of is het te rechtvaardigen om als resultaat van deze secundaire isolatie te verwijzen naar de identificatie en de gevoeligheidsbepalingen van de primaire isolatie, op voorwaarde dat men de condities respecteert?

3.1.2 Inclusiecriteria studiestalen:

1. **Type kiem:** aërobe Gram-negatieve staven
2. **Staaltypes:** respiratoire, urinaire en variastalen
3. **Recente** (<7 dagen) isolatie bij dezelfde patiënt
4. 2^e isolatie is afkomstig van dezelfde staalbron als de 1^e isolatie (zelfde **staalbron**)
5. Morfologie en korte enzymatische testen zijn **compatibel** met de identiteit van de 1^e uitwerking.

3.1.3 Werkwijze

Vanaf 15 februari 2011 werden alle consecutieve gram-negatieve isolaten die bij herhaling geïsoleerd werden en voldeden aan de vooropgestelde criteria onderworpen aan een Phoenix-analyse geautomatiseerde identificatie en antibiogrambepaling met behulp van het Phoenix systeem (BD Diagnostic systems, Sparks, Md.)

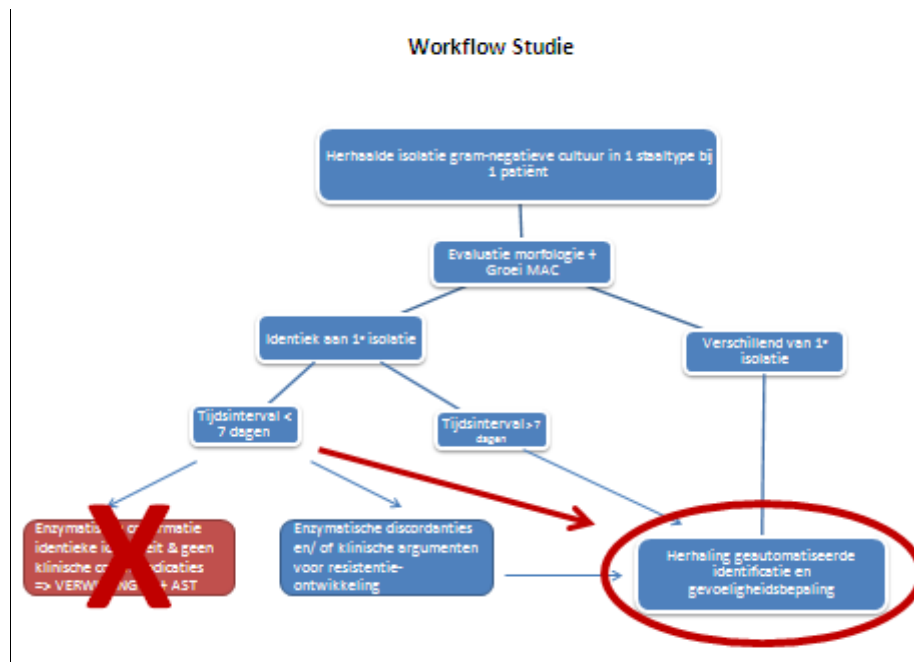


Fig. 2 Workflowdiagram prospectieve studie

- Zowel identiteit (ID) als gevoeligheidskarakteristieken (AST) werden vergeleken.
- De micro-organismen die qua identiteit niet strookten met de vorige uitwerking werden gecontroleerd aan de hand van een nieuwe Phoenix-analyse..
- De antibiotica die per staalsoort en per micro-organisme vergeleken zouden worden, werden op voorhand vastgelegd rekening houdend met intrinsieke resistenties.
- Een categorieke vergelijkingsprocedure werd toegepast (S, I, R) in de vergelijking van de gevoeligheidsresultaten, en de resultaten werden gecatalogeerd als zijnde in agreement, minor error, major error, very major error cfr. Tabel 3.

Resultaat	Interpretatie	Categorieke afwijking
Agreement	Identieke resultaten	Ø
Very Major Error (VME)	Repeat test gevoelig i.t.t. I ^e resistent getest	S i.p.v. R
Major Error (ME)	Repeat test resistent i.t.t. I ^e gevoelig getest	R i.p.v. S
Minor Error (MinE)	Repeat test R/S met I ^e test I, of viceversa	I i.p.v. R of S , hetzij R of S i.p.v I

Tabel 3: Categorieke vergelijking: Consensus interpretatie

3.1.4 Gehanteerde criteria

- De resultaten van de primaire analyse werden als 'referentiewaarden' beschouwd.
- Eventuele antibioticatherapie ten tijde van de staalafname werd genoteerd.

3.1.4.1. Identificatie

Voor de agreementvergelijking van de identificatie adviseert de U.S. Food and Drug Administration (FDA) voor vergelijking van gelijkaardige testsystemen een ondergrens van 90% voor validatie van de (nieuwe) methode. Deze limiet werd intern verhoogd tot 95% voor onze prospectieve studie.

3.1.4.2. Gevoeligheidsbepalingen

De FDA guidelines voor vergelijking van testsystemen fungeerden als criteria voor de vergelijking van de gevoeligheidsbepalingen:

- Major errors < 3%
- Very major errors <1.5%

Belangrijk is voor ogen te houden dat het hier gaat om een evaluatie van de toegepaste verwijzingsprocedure , en niet om een evaluatie van de performantie en herhaalbaarheid van het Phoenix-instrument. Gezien het belang van de initiële evaluatie en presumptieve identificatie is de rol van de MLT in deze fase zeer belangrijk.

De resultaten van de I^e isolaten worden steeds als referentiestandaard gebruikt in de veronderstelling dat deze resultaten uiteraard correct zijn. De secundair gegenereerde resultaten worden dan getoetst aan de 'referentiestandaard', zijnde de primaire resultaten.

3.1.5 Procedure

- Vergelijking van de resultaten naar identificatie en gevoeligheidsbepalingen van beide isolaten.
- Aantal stalen: min. 200. (= 100 vergelijkingen met herhaalde identificaties & gevoeligheidsbepalingen)
- Discordanties in identiteit worden gecontroleerd door zowel de primaire als de secundaire stalen opnieuw te analyseren.
- Beoogde doeleinden:
 - **ID:** Match van minimum 95% identificaties.
 - **AST:** Categorieke resultaten worden vergeleken.

3.1.6 Gevoeligheidsbepalingen: inclusie antibiotica

Per micro-organisme worden de relevante antibiotica ingecalculleerd rekening houdende met de intrinsieke resistenties voor inclusive voor de vergelijking van de gevoeligheidsbepalingen.

Urinestalen: 15 antibiotica

15 antibiotica te vergelijken zo geen intrinsieke resistentie cfr. tabel 6.

1. *E.coli*: 15 antibiotica
2. *Klebsiella species*: ampicilline-resistent: 14 antibiotica
3. *Proteus mirabilis* : nitrofurantoïne-resistent : 14 antibiotica
- 3b. *Proteus non-mirabilis*: nitrofurantoïne , ampi én cefuroxime resistent: 12 antibiotica
- 4a. *Citrobacter koseri* : ampicilline-resistent: 14 antibiotica
- 4b: *Citrobacter freundii*: ampi + amoxyclav resistent: 13 antibiotica
5. *Hafnia alvei*: amp + amoxyclav resistent: 13 antibiotica
6. *Serratia marcescens*: ampi, amoxyclav, cefuroxime-resistent: 12 antibiotica
7. *Morganella morganii*: ampi, amoxyclav,cefuroxime, nitrofurantoïne- resistent: 11 antibiotica
8. *Providentia species*: ampi, amoxyclav, nitrofurantoïne-resistent: 12 antibiotica
9. *Acinetobacter sp.*: ampi, amoxyclav,cefuroxime ceftriaxone-resistent: 11 antibiotica.
10. *Pseudomonas aeruginosa*: ampi, amoxyclav, cefuroxime, ceftriaxone-resistent: 11 antibiotica

Variastalen + Respiratoire stalen : 11 antibiotica

11 antibiotica te vergelijken zo geen intrinsieke resistentie cfr tabel 18.

1. *E.coli*: 11 antibiotica
2. *Klebsiella species*: ampicilline-resistent: 10 antibiotica
3. *Proteus mirabilis* : nitrofurantoïne-resistent : 10 antibiotica
- 3b. *Proteus non-mirabilis*: nitrofurantoïne , ampi én cefuroxime resistent: 8 antibiotica
- 4°. *Citrobacter koseri* : ampicilline-resistent: 10 antibiotica
- 4b: *Citrobacter freundii*: ampi + amoxyclav resistent: 9 antibiotica
5. *Hafnia alvei*: amp + amoxyclav resistent: 9 antibiotica
6. *Serratia marcescens*: ampi, amoxyclav, cefuroxime-resistent: 8 antibiotica
7. *Morganella morganii*: ampi, amoxyclav,cefuroxime, resistent: 8 antibiotica
8. *Providentia species*: ampi, amoxyclav -resistent: 10 antibiotica
9. *Acinetobacter sp.*: ampi, amoxyclav,cefuroxime ceftriaxone-resistent: 7 antibiotica.
10. *Pseudomonas aeruginosa*: ampi, amoxyclav, cefuroxime, ceftriaxone: 7 antibiotica
11. *Stenotrophomonas maltophilia*: ampi, amoxyclav,ceforux, ceftriax, cefepi, cefta, mero,piptazo, amika, aztreonam: TMP/SXL als enige te vergelijken!

3.1.7 Interpretatie resultaten

Onze prospectieve studie heeft 2 duidelijke outcome variabelen: enerzijds de identiteit van het micro-organisme, anderzijds zijn gevoeligheidspatroon. Deze zullen zoals reeds hoger vermeld op 2 verschillende manieren geëvalueerd en geïnterpreteerd worden. Voor de correlatie van de gevoeligheidsbepalingen zullen we ons baseren op categorieke (dis)agreements. Dit veronderstelt agreement van interpretatieresultaten (S,I,R) tussen een nieuwe te testen analysemethode ten opzichte van een standaard referentiemethode. In onze prospectieve studie projecteren we deze 'nieuwe analyse' als zijnde de herhaalde Phoenix-analyse (i.e. de resultaten die normaliter niet gegenereerd worden maar 'vervangen' worden door verwijzing naar voorgaande uitwerking), en als standaard referentiemethode beschouwen we de primair gegenereerde susceptibiliteitsresultaten.

1. Voor de correlatie van de identificatie is het evident dat we werken met een **percentage agreement** die de accuraatheid van de identificatie-verwijzing weerspiegelt. De FDA neemt als criterium voor agreement bij de evaluatie tussen 2 testsystemen een agreement van minstens 90%, wij stellen in ons studieprotocol voor de verwijzingsprocedure een satisfiërende agreement van **minstens 95%** voorop.
2. Voor de evaluatie van de gevoeligheidsbepalingen binnen de verwijzingsprocedure baseren we onze methode op de **categorieke vergelijkingsprocedure** zoals die in de Garcia et al : Clinical Microbiology Procedures Handbook, (chapter 5.17: Evaluating Antimicrobial Test Systems) beschreven staat voor de evaluatie tussen 2 verschillende testsystemen, die we ditmaal toepassen op de evaluatie van de repetitieve testresultaten. We vergelijken de resultaten voor dit tweede isolaat gegenereerd door het Phoenix instrument met diens eigen bekomen resultaten bij de 1^e analyse. We hanteren de criteria zoals de richtlijnen van de Food and Drug Administration (FDA) deze aangeven voor evaluatie van nieuwe susceptibiliteitstoestellen wat betreft major errors ($\leq 3\%$) en very major errors ($\leq 1.5\%$) cfr. infra, dit betreft dus een kwalitatieve evaluatie van de verwijzingsprocedure. Om de performantiedata zo optimaal mogelijk in perspectief te plaatsen, werd per staalsoort en per micro-organisme rekening gehouden met intrinsieke resistentie en plausibiliteit van de antibiotica naar behandeling toe. Welke antibiotica gerapporteerd worden per micro-organisme is afhankelijk van een aantal factoren: van de eerste- en 2^e lijns therapie (cfr. Sanford guide to Antimicrobial Therapy) voor de bekomen identiteit, het gevoeligheidsprofiel van het geïsoleerde micro-organisme, en de infectie-site. Sommige antibiotica worden niet aangeraden voor therapie van infectie door een bepaalde kiem onafhankelijk van het in vitro-resultaat (vb. ampicilline voor *Pseudomonas aeruginosa*). Major errors en very major errors binnen deze irrelevante antibiotica zijn dan ook niet significant en worden in onze studie buiten beschouwing gelaten. De relevante antibiotica die wél ingecalculeerd werden voor deze studie, werden per staalsoort en per kiem op voorhand vastgelegd rekening houdend met bovenstaande criteria en zijn terug te vinden in tabel 6 (urinaire isolaten) en tabel 18 (varia isolaten).

Noot:

Voor ESBL-positieve micro-organismen (8 stalen) werden steeds de ruwe MIC-data gecategoriseerd volgens EUCAST-criteria, en werden minor errors, major errors en very major errors in de beta-lactamantibiotica geregistreerd en opgenomen in deze prospectieve studie, ook al werden betalactam-antibiogramresultaten in bepaalde gevallen -onafhankelijk van de MIC-waarde- als zijnde resistent gerapporteerd. Elke ESBL-positieve kiem testte bij de repetitieve isolatie-uitwerking opnieuw positief voor ESBL.

4. Resultaten prospectieve studie

4.1. Verwijzing betreffende identificatie

Van de 100 vergeleken primaire isolaten waren er 43 afkomstig uit urinaire stalen en 57 uit varia-stalen, met een verdeling volgens onderstaande tabel 4.

Micro-organisme	Urine	Varia	Totaal
<i>E.scherichia coli</i>	20	24	44
<i>Proteus species</i>	8	3	11
<i>Klebsiella species</i>	8	3	11
<i>Enterobacter species</i>	2	9	11
<i>Citrobacter species</i>	1	0	1
<i>Morganella morganii</i>	0	2	2
<i>Hafnia alvei</i>	0	1	1
<i>Serratia marcescens</i>	0	1	1
<i>Providentia stuartii</i>	0	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	9	13
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	3	3
<i>Acinetobacter species</i>	0	1	1
TOTAAL	43	57	100

Tabel 4: Distributie studie-isolaten.

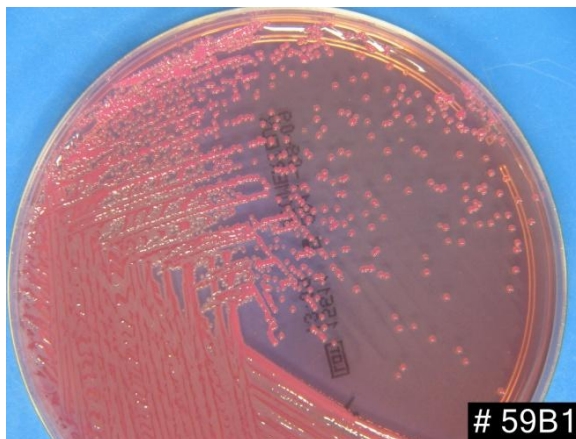
Voor elk isolaat dat voldeed aan de verwijzingscriteria, werd een nieuwe Phoenix analyse uitgevoerd met de desbetreffende panels cfr. supra, daar waar normaliter een verwijzing naar identificatie en antibiogram van het voorafgaande gram-negatief isolaat zou gebeuren zoals de verwijzingsprocedure voorschrijft. Bij deze herhaalde geautomatiseerde analyse werden zowel de agreement van identificatie als van de gevoeligheidskarakteristieken onderworpen aan een evaluatie. Wanneer we de agreement van identificatie evalueren tussen de repetitieve analyse en de primaire resultaten bemerken we 3 identiteitsdiscordanties op 100 herhaalde analyses, hetgeen een agreement van 97% impliceert. Deze 97% voldoet ruimschoots aan de door FDA (>90%) en door onszelf (>95%) vooropgestelde criteria.

Bespreking discordanties

N°	Datum afname	Staalbron	Identificatie	Therapie?	Acties	Oorzaak?
59B	31/03	TRA	<i>K. oxytoca</i>	Neen	herhaling PHX	Overschrijding verwijstermijn
59A	09/04	TRA	<i>C. farmeri</i>	Neen		
55B	23/03	TRA	<i>S. maltophilia</i>	Neen	herhaling PHX + oxidasetest	geen oxydase jonge kolonies morfologie!
55A	28/03	BRA	<i>P. aeruginosa</i>	Neen		
100B	09/05	TRA	<i>E. coli</i>	JA (Tazocin)	herhaling PHX	Morfologie?
100A	12/05	TRA	<i>E. cloacae</i>	JA (Tazocin)		

Tabel 5 Discordanties identificatie.

1. Wanneer we de oorzaak van de misidentificatie trachten achterhalen, blijkt dat in het 1e geval de **verwijzingstermijn niet gerespecteerd** werd (9 dagen overschrijdt de 7 dagen-termijn). Dit tweede isolaat zou dus normaliter niet verwezen mogen worden.



Afb.1. *K. oxytoca*

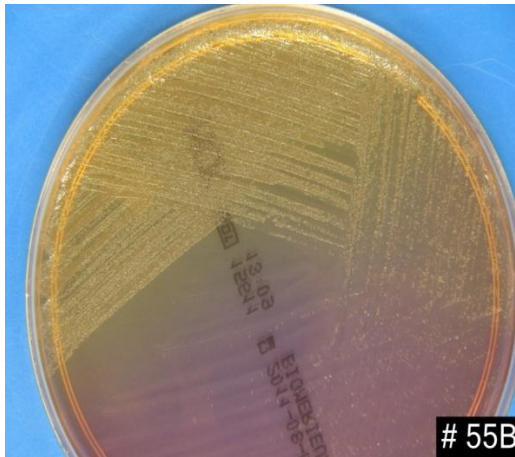


Afb. 2. *C. farmeri*

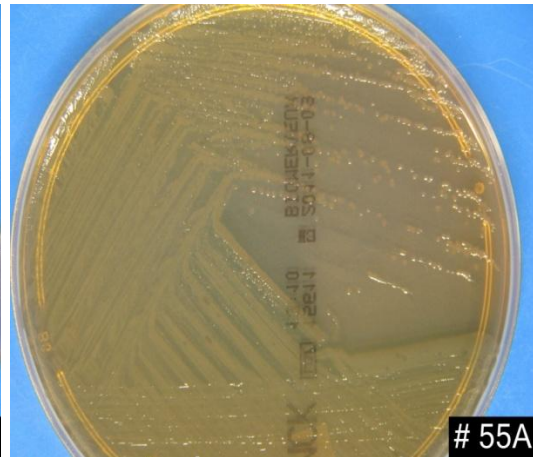
2. Bij de tweede discordantie voerde men **geen oxidase-test** uit op de lactose-negatieve kolonies, hetgeen snel directief zou zijn geweest in de richting van *Pseudomonas aeruginosa*. Ook zijn er naast de oxidase-test nog andere typische verschillen in groeikarakteristieken op de MacConkey en bloedagar (5% schapebloed) aanwezig die belangrijke aanknopingspunten zijn bij een presumptieve identificatie: de *P. aeruginosa* kolonies zijn groter, hebben een gekartelde rand, vertonen reeds de groene bodemverkleuring ten gevolge van het geproduceerde pyoverdine, tevens is ook de typische fruitige geur aanwezig. Echter, deze typerende eigenschappen zijn minder sterk aanwezig wanneer het **jonge kolonies** betreft (< 18uur incubatieduur). Dit staal bleek inderdaad pas laat geënt te zijn de avond voordien (om 20u) zodat de platen reeds na 14 uur incubatie werden afgelezen, hetgeen wellicht de verklaring is voor de misidentificatie: de jonge (nog) kleine lactose-negatieve *Pseudomonas aeruginosa* kolonies kregen een referentie naar de vorige uitwerking van *S. maltophilia* 5 dagen voordien.

Garcia et al vermelden in hoofdstuk 3.3.2 bij de procedure omtrent aflezen van bacteriële groei op primaire cultuurmedia dat, zo de kolonies te klein zijn om hun karakteristieken te determineren en de incubatie minder dan 18u bedroeg (toepasselijk op deze situatie), men ze moet beschouwen als te jong om te evalueren **“too young**

to evaluate", en idealiter de (her)evaluatie later op diezelfde dag gebeurt. Een aanvullende oxidase-test was in deze situatie echter een belangrijk bijkomend gegeven geweest. De kolonies van *Stenotrophomonas maltophilia* zijn opvallend kleiner, mankeren de typerende *Pseudomonas*-geur en zijn uiteraard oxidase-negatief. De uitvoering van oxidase-test op lactose-negatieve kolonies gebeurt niet routinematig zo er geen verdenking is op *P. aeruginosa* op basis van andere kenmerken (cfr. supra). Om deze inschattingfout in de toekomst te vermijden kan ingevoerd worden in de workflow van de verwijzingsprocedure dat **bij niet-zwermende lactose-negatieve kolonies altijd een oxidasetest wordt uitgevoerd**, zelfs wanneer men kan verwijzen naar een ander lactose-negatief micro-organisme zoals bij deze discordantie het geval was.



Afb. 3 *S. maltophilia*



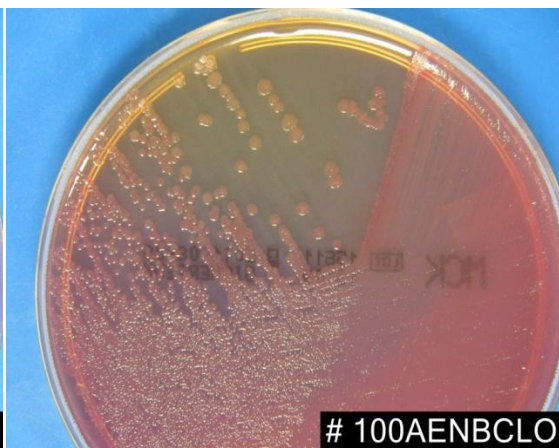
Afb. 4. *P. aeruginosa*

3. De derde discordantie betrof een primaire isolatie van *E. coli*, waar drie dagen later naar gerefereerd werd toen opnieuw een isolatie werd bekomen van een kiem met **gelijkaardige morfologie**. Bij evaluatie van de verwijzing bleek dit echter om *E. cloacae* te gaan. Deze laatste misidentificatie had kunnen voorkomen worden zo men op de nieuwe isolatie een indolspottest had uitgevoerd. Ook naar morfologie toe is het onderscheid tussen deze twee micro-organismen niet helemaal onopmerkelijk (cfr. afb. 5 en 6). Deze 3 discordanties in rekening brengend, bekomt men het effectieve eindresultaat van 97% agreement wat betreft identificatie. Zoals reeds eerder aangehaald voldoet deze waarde nog steeds aan het vooropgestelde minimum van 95%, en valt zelfs ruim boven het FDA criterium van > 90 % .

4.



Afb. 5 *E. coli*



Afb. 6 *E. cloacae*

BESLUIT: Wat betreft identificatie behaalt de verwijzingsprocedure een agreement van 97% en beantwoordt dus ruimschoots aan de vooropgestelde criteria van >90% (FDA) en >= 95% (labo microbiologie, OLV Aalst)

4.2 Verwijzing van gevoeligheidsbepalingen (AST)

Deze evaluatie is uiteraard complexer dan wat betreft enkel en alleen de identificatie. Als richtlijn baseren we ons zoals reeds hoger vermeld op de procedure voor evaluatie van antimicrobiële susceptibiliteitssystemen zoals beschreven in de Practical guidelines, Garcia et al, hoofdstuk 5.17 .

We hanteren de categorieke vergelijkingsprocedure, berustend op de interpretaties S (gevoelig), I (intermediair), en R (resistent). Voor elk micro-organisme alsook per staaltipe wordt rekening gehouden met de klinisch relevante antibiotica alsook met eventueel aanwezige intrinsieke resistenties. In overleg met de klinisch biologen kwamen we tot een consensus omtrent welke antibiotica per micro-organisme en per staaltipe klinisch relevant waren om te includeren, hetgeen leidde tot onderstaande schema's voor de isolaten in hun respectieve staaltipes.

4.2 A. Urinaire isolaten:

KIEM	AM PICIL LIN	AMO XCL AV	CEF URO X	CEF TRI AX	CEF TAZI DIM	CEF EPI M	PIP TAZ O	TEM OCI LL	MER ONE M	AMI KAC IN	CIP ROX IN	NIT ROF UR	TMP SXL	FOS FOM	AZT REO NAM	# AB
<i>E. coli</i>																15
<i>Proteus mirabilis</i>																14
<i>Klebsiella sp.</i>																14
<i>E. aerogenes</i>																13
<i>Citrobacter koseri</i>																14
<i>P. aeruginos</i>																10



Intrinsieke resistentie,
niet geïncordeerd



Inclusie voor studie

Tabel 6: Geïncordeerde antibiotica per micro-organisme uit urinaire stalen.

I. *Escherichia coli*

Van de 43 urinaire isolaten, werden er 20 als *E. coli* geïdentificeerd.

Zoals in bovenstaande tabel 6 vermeld en conform de vooropgestelde consensus, worden in deze studie voor een urinair *E. coli* isolaat 15 antibiotica vergeleken. Dit komt neer op 20 x 15= 300 herhaalde gevoeligheidsbepalingen. Uit de gegevenstabel extraheren we volgende resultaten:

Error	Ratio	%
Minor	4/300	1.3
Major	2/300	0.7
Very Major	1/300	0.3

Tabel 7

De major errors gebeurden tweemaal bij de cefuroxime-gevoeligheidsbepaling.

1 very major error trad op bij de bepaling voor temocilline & werd met behulp van E-testen geconfirmeerd (MIC temocilline 1^e isolaat 32 µg/ml, 2^e isolaat 8 µg/ml)

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverval	Therapie
Minor	amoxclav	>8	R	8	I	minstens 1	geen info
Minor	ampicillin	4	I	>8	R	minstens 2	geen info
Minor	ampicillin	≤2	S	8	I	minstens 2	Amoxclav
Minor	amoxclav	4	S	8	I	1	Amoxclav
Major	cefurox	8	S	>8	R	minstens 1	Ø
Major	cefurox	4	S	>8	R	minstens 2	Moxifloxacin
Very Major	temocillin	32	R	8	S	2	geen info

Tabel 8.

2. *Proteus mirabilis*

In 8 van de 43 isolaten betrof het *P. mirabilis* isolaten. *Proteus species* zijn intrinsiek resistent aan nitrofurantoinen en deze worden dus niet geïncubeerd in de evaluatie.

Er worden dus 14 antibiotica vergeleken voor 8 isolaten, dus 112 testen.

De minor errors traden op bij amoxicilline/clavulaat en amikacine.

Error	Ratio	%
Minor	2/112	1.8
Major	0/112	0
Very Major	0/112	0

Tabel 9.

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverval	Therapie
Minor	amikacin	8	S	16	I	1	Ø
Minor	amoxclav	8	I	>8	R	minstens 1	geen info

Tabel 10.

In de vergelijking van de verwijspprocedure voor de urinaire *Proteus mirabilis* isolaten traden noch major noch very major errors op.

3. *Klebsiella species*

Omwille van de intrinsieke ampicilline-resistentie worden voor de 8 urinaire *Klebsiella* isolaten per micro-organisme 14 antibiotica vergeleken. (weerom 112 individuele testen). 1 minor error voor aztreonam werd genoteerd. Er trad 1 VME op, betreffende de gevoeligheidsbepaling van nitrofurantoïne; er was geen aanwezigheid van antibioticadruk.

Error	Ratio	%
Minor	1/112	0.9
Major	0/112	0
Very Major	1/112	0.9

Tabel 11.

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverschil	Therapie
Minor	Aztreonam	8	R	2	I	2	Ø
Very major	Nitrofur	>64	R	32	S	min. 1	Ø

Tabel 12.

4. *Enterobacter aerogenes* & *Citrobacter koseri*

De 2 urinaire *Enterobacter aerogenes* en de enige *Citrobacter koseri* stammen die in deze subgroep zaten, vertoonden geen minor errors of very major errors. Wel trad er 1 major error op betreffende nitrofurantoïne (eveneens zonder antibioticadruk).

Error	Ratio	%*
Minor	0/40	0
Major	1/40	2.5
Very Major	0/40	0

Tabel 13.*

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverschil	Therapie
Major	Nitrofur	64	S	>64	R	minstens 1	Ø

Tabel 14.*

5. *P. aeruginosa*

Omwille van multiple intrinsieke resistenties (cfr. tabel) worden voor de 4 *P. aeruginosa* isolaten 10 susceptibiliteitsresultaten vergeleken per kiem, wat resulteert in 40 individuele testen. De minor errors traden op bij aztreonam en ciprofloxacin, de major errors kwamen voor bij ciprofloxacin en piperacilline/tazobactam.

Error	Ratio	%*
Minor	2/40	5.0
Major	2/40	5.0
Very Major	0/40	0

Tabel 15. *

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverschil	Therapie
Minor	aztreonam	8	I	<=I	S	minstens 3	Ø
Minor	cipro	>I	R	I	I	minstens 1	cefepime
Major	piptazo	16	S	>16	R	minstens 1	cefepime
Major	cipro	<= 0.125	S	>I	R	minstens 2	Ø

Tabel 16.

*: Percentage berekend op laag aantal is uiteraard relatief te interpreteren

Conclusie urinaire resultaten

Binnen de groep van 43 urinaire isolaten, waren er géén discordanties naar identificatie toe. Wat betreft agreement naar antibiogramresultaten, kunnen we sommeren zoals in onderstaande tabel weergegeven wordt, dat er bij 1.24 % van de gevoeligheidsbepalingen minor errors optraden, wat betreft major errors gaat het om 1.07 % van de uitgevoerde bepalingen, en het aantal very major errors komt niet hoger dan 0.16%. De VME zijn het meest significante errortype, en kunnen een grote impact hebben op therapie en prognose, zeker wanneer het antibioticum in kwestie het gekozen therapeutikum is of de infectie ernstig. De very major errors (VME) traden op bij de analyses van temocilline en furadantine, 2 antibiotica waarvoor de EUCAST breakpoints geen intermediaire waarden bezitten, waardoor de kans op ME en VME uiteraard dadelijk groter wordt dan bij andere antibiotica.

Tabel 17 : Urinaire isolaten : categorieke disagreements per kiem

AANTAL	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	<i>PROTEUS MIRABILIS</i>	<i>KLEBSIELLA SP.</i>	<i>ENTEROBACTER + CITROBACTER SP.</i>	<i>P. AERUGINOSA</i>	TOT AAL	%
ISOLATEN	20	8	8	3	4	43	
AB / KIEM	15	14	14	13 RESP. 14	10		
GETESTE AB	300	112	112	40	40	604	
MINOR	4	2	1	0	2	9	1,49%
ME	2	0	0	1	2	5	0.82%
VME	1	0	1	0	0	2	0,33%

Tabel 17.

Transpositie naar verwijzingsprocedure

Een Major Error in de repetitieve meting impliceert een Very major error in de rapportering: 2^e analyse S in plaats van R gemeten = very major error, maar wanneer enkel de 1^{ste} rapportering gebeurt wordt dit R in plaats van S als rapportering, dus een Major Error in de rapportering.

Wat betreft de rapportering voor de urinaire verwijzingen bekomt men dus

- **1.49% minor errors**
- **0.33% major errors**
- **0.82% very major errors**

4.2.B. Varia isolaten

	AM PICI LLIN	AMO XYC LAV	CEF URO XIM	CEF TRI AX	CEF TAZI DIM	CEF EPI ME	PIP TAZ O	MER OPE NEM	AMI KAC IN	CIP ROX IN	AZT REO NAM	TMP /SXL	Aantal antibiotica vergeleken per kiem
<i>E. coli</i>													11
<i>P. mirabilis</i>													11
<i>P. vulgaris</i>													10
<i>Klebsiella sp.</i>													10
<i>Enterobacter sp.</i>													9
<i>M. morganii</i>													8
<i>H. alvei</i>													9
<i>S. marcescens</i>													8
<i>P. stuartii</i>													9
<i>P. aeruginosa</i>													7
<i>Acinetobacter sp.</i>													7
<i>S. maltophilia</i>													1

Tabel 18. Geïnccludeerde antibiotica per micro-organisme uit variastalen



Intrinsieke resistentie,
niet geïnccludeerd



Inclusie voor studie

In totaal waren 57 van de 100 isolaten opgenomen in de studie afkomstig uit varia-stalen. Bij de identiteitsvergelijking echter bleken 3 discordanties te bestaan, die we uiteraard niet zomaar kunnen meenemen in de vergelijking (omdat men dan spreekwoordelijke appels met peren zou vergelijken). Deze 3 discordanties bevinden zich in de groep van de varia-isolaten. Uiteindelijk includeren we 54 isolaten voor de evaluatie van de verwijzing van gevoeligheidsbepalingen in deze subgroep.

6. Escherichia coli

In 23 van de 54 geïnccludeerde varia-isolaten ging het om *Escherichia coli*. Volgens de vooropgestelde consensus zijn er 11 antibiotica bij herhaling te evalueren per isolaat *E. coli*, hetgeen leidt tot 253 vergelijkingen. De minor errors betroffen amoxy/clavulanaat en

ceftriaxone, de major errors traden op bij ampicilline, amoxy/clavulanaat, cefuroxime, ciprofloxacin en amikacin.

De very major error betrof piperacilline/tazobactam onder gelijknamige therapie.

Error	Ratio	%
Minor	2/253	0.8
Major	5/253	1.9
Very Major	1/253	0.4

Tabel 19.

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverschil	Therapie
Minor	amoxclav	>8	R	8	I	minstens 1	geen info
Minor	ceftriax	4	R	2	I	1	amoxclav
Major	amoxclav	4	S	>8	R	minstens 2	amoxclav
Major	cefurox	≤2	S	>8	R	minstens 3	amoxclav
Major	ampicillin	≤2	S	>8	R	minstens 3	pip/tazo
Major	amikacin	≤4	S	>8	R	minstens 3	pip/tazo
Major	cipro	≤0.125	S	>1	R	minstens 3	pip/tazo
Very major	piptazo	>16	R	≤4	S	minstens 3	pip/tazo

Tabel 20.

7. *Proteus mirabilis*

3 varia isolaten waren *Proteus mirabilis*- stammen, waarbij volgens de vooropgestelde consensus ook de categorieke resultaten van 11 antibiotica gecontroleerd worden.

Error	Ratio	%*
Minor	0/33	0
Major	2/33	6.1
Very Major	0/33	0

Tabel 21.*

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverschil	Therapie
Major	ampicillin	≤2	S	>8	R	minstens 3	Ø
Major	amoxclav	≤2	S	>8	R	minstens 3	Ø

Tabel 22.

De 2 major errors traden op binnen eenzelfde verwijzingsprocedure, en betroffen ampicilline en amoxycilline-clavulanaat. Bij controle van de data van deze verwijzing bleek dat de stalen afkomstig waren van een **verschillende lokalisatie van de staalbron**: het 1^e isolaat was afkomstig van een sternumwonder, de 2^e isolatie was afkomstig van een puscollectie uit een liewonde. Deze verwijzing **voldoet m.a.w. niet aan de vooropgestelde criteria** en wordt dus **niet ingecalculerd in de resultaten**. Deze 2 major disagreements

benadrukken het belang van het correct respecteren van de inclusiecriteria, in dit geval van de **gelijkaardige staalbron**.

8. *Klebsiella species*

Voor de 2 *Klebsiella* isolaten die geïncubeerd werden in deze subgroep (1 isolaat werd geëxcludeerd wegens discordante identificatie) werden telkens 10 antibiotica vergeleken:

Error	Ratio	%*
Minor	0/20	0
Major	0/20	0
Very Major	0/20	0

Tabel 23.

1 *Klebsiella oxytoca* isolaat werd bij herhaalde Phoenixanalyse niet bevestigd in zijn identiteit,: *Citrobacter farmeri* was de identificatie van de herhaalde analyse.

9. *Enterobacter species*

9 *Enterobacter species* waarvan 8 *E. aerogenes* en 1 *E. cloacae* isolaat afkomstig van varia-isolaten werden geïncubeerd in de studie. In deze subgroep vinden we 1 minor disagreement betreffende cefepime.

Error	Ratio	%
Minor	1/81	1.2
Major	0/81	0
Very Major	0/81	0

Tabel 24.*

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverschil	Therapie
Minor	cefepime	2	1	≤1	S	minstens 1	Meropenem

Tabel 25.

10. *M. morganii*, *P. stuartii*, *H. alvei*, *S. marcescens*

Uit de geïncludeerde variastalen isoleerden we 2 *M. morganii*, 1 *P. stuartii*, 1 *H. alvei* en 1 *S. marcescens*. Rekening houdend met hun respectievelijke intrinsieke resistentie cfr. supra weerhouden we binnen deze subgroep 42 antibiotica ter vergelijking:

Error	Ratio	%*
Minor	1/42	2.4
Major	0/42	0
Very Major	0/42	0

Tabel 26.*

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverschil	Therapie
Minor	piptazo	16	I	<=4	S	minstens 2	Meropenem

Tabel 27.

1 minor error valt te bemerken bij *H. alvei* binnen deze subgroep, aangaande piperacilline/tazobactam.

11. *Pseudomonas aeruginosa*

Voor de 9 *P. aeruginosa* isolaten in deze subgroep werden telkens 7 antibiotica vergeleken.

Error	Ratio	%*
Minor	2/63	3.2
Major	2/63	3.2
Very Major	0/63	0

Tabel 28. *:

Disagreement	AB	1 ^e isolaat		Repetitief		Dilutieverschil	Therapie
Minor	cipro	0.5	S	I	I	I	cefepime
Minor	piptazo	<=4	S	16	I	minstens 3	cefepime
Major	cefta	I	S	16	R	4	cefepime
Major	cefepi	<=1	S	>32	R	minstens 4	cefepime

Tabel 29.

De minor errors traden op bij ciprofloxacin en piperacilline/tazobactam. Binnen eenzelfde vergelijkend antibiogram bevonden zich 2 ME, aangaande ceftazidime & cefepime. De patiënt in kwestie stond onder cefepime-therapie ten tijde van de 2^e isolatie die de resistentie-ontwikkeling vertoonde. Deze laatste situatie is een situatie waarop de microbioloog kan én moet reageren; onder cefepime-therapie nog steeds isolatie van *P. aeruginosa* met behoud van inflammatoir bloedbeeld: voor deze specifieke setting zou de verwijzingsregel als het ware overruled worden door de microbioloog omdat er klinische en labo-indicaties zijn die resistentie-ontwikkeling doen vermoeden.

12. *Acinetobacter species* & *S. maltophilia*

4 non-fermenterende gram-negatieve isolaten werden geïncubeerd uit varia-stalen:

1 *Acinetobacter species*, en 3 *Stenotrophomonas maltophilia* stammen.

1 *S. maltophilia* isolaat wordt geëxcludeerd van de gevoeligheidsvergelijkingen omwille van discordantie bij identificatie.

Binnen deze non-fermenter subgroep vergelijken we 9 antibiotica:

Error	Ratio	%*
Minor	0/9	0
Major	0/9	0
Very Major	0/9	0

Tabel 30*.

*: Percentage berekend op laag aantal is uiteraard relatief te interpreteren

Tabel 30 : Varia isolaten : categorieke disagreements per kiem

	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Enterob. sp.</i>	<i>P. aer</i>	<i>S. Mal.</i>	<i>P. stuarti</i>	<i>M. morganii</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>H. alvei</i>	<i>Acinetobacter species</i>	TOT AAL	%
# isolaten	23	2	2	9	9	2	1	2	1	1	1	53	
# AB per kiem	11	11	10	9	7	1	9	8	8	9	7		
# geteste AB	253	22	20	81	63	2	9	16	8	9	7	490	
# minor error	2	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	6	1.22%
# major error	5	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	7	1.42%
# very major error	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,20%

Tabel 30.

Globale evaluatie vergelijking gevoeligheidsresultaten.

	<i>E. coli</i>	<i>P.mir.</i>	<i>Kleb.sp.</i>	<i>Entb./Cit.sp.</i>	<i>P. aer</i>	St. mal.	<i>P.stuarti</i>	<i>M.morg</i>	<i>S. marc.</i>	<i>H. alvei</i>	<i>Aci.sp.</i>	TOTAAL	%
# isolaten	43	10	10	12	13	2	1	2	1	1	1	96	
# geteste AB	553	134	132	121	103	2	9	16	8	9	7	1094	
# minor error	6	2	1	1	4	0	0	0	0	1	0	15	1.37
# major error	7	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	12	1.09
# very major error	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.27

Tabel 31.

CONCLUSIE AST VERWIJZINGSPROCEDURE

Zowel in de afzonderlijke subpopulaties ‘urinaire isolaten’ enerzijds en ‘varia-isolaten’ anderzijds, als in de globale evaluatie besluiten we dat aan de vooropgestelde criteria ruimschoots beantwoord wordt: uit bovenstaande tabellen omtrent de globale evaluatie kunnen volgende conclusies gededuceerd worden: het aantal minor errors bedraagt 1.37%, het aantal major errors 1.09% en het aantal very major errors 0.27%.

Getransponeerd naar de verwijzingsrapportering besluiten we ook hier:

Een major error in de repetitieve meting impliceert een very major error in de rapportering: 2^e analyse S in plaats van R gemeten = very major error, maar wanneer enkel de 1^{ste} rapportering gebeurt wordt dit R in plaats van S als rapportering, dus een Major Error in de rapportering.

Wat betreft de rapportering voor alle verwijzingen samen bekomt men dus

- **1.37 % minor errors**
- **0.27 % major errors**
- **1.09 % very major errors**

Volgens deze berekende data voldoet onze verwijzingsmethode, mits de vooropgestelde voorwaarden gerespecteerd worden, ruim aan de vooropgestelde criteria van categorieke disagreements zijnde ME ≤ 3%, VME ≤ 1.5%.

4.3 Disagreements per antibioticum

Om te evalueren of er evidentie is dat bepaalde antibiotica meer onderhevig zouden zijn voor disagreements binnen deze verwijzingsprocedure, wordt er per antibioticum bekeken of en hoeveel (dis)agreements er optraden.

In het globale overzicht zijn er dus 1094 antibiotica-resultaten geïnccludeerd voor de evaluatie van de verwijzingsprocedure die alle voldeden aan de vooropgestelde criteria. Van deze 1094 antibiotica-resultaten waren er 1064 in categorieke agreement. 30 resultaten echter vertoonden nonconformiteit, wat impliceert dat er voor onze verwijzingsprocedure 1,37% minor errors optraden, 0.27 % major errors en 1.09 % very major errors cfr. supra. Deze resultaten zijn bevredigend en vallen binnen de vooropgestelde criteria voor een gunstige validatie van de verwijzingsprocedure.

Wanneer men de tabel gedetailleerd beschouwt per antibioticum, blijken de meeste minor errors op te treden bij amoxicilline/clavulaanzuur (4/15 = 26.6%), en de meeste major errors eveneens bij cefuroxime (3/12= 25%).

Deze betalactam-antibiotica zijn in onze studie het meest geneigd om resistentie te ontwikkelen op korte termijn, onafhankelijk van eventuele antibioticatherapie.

TOTAL: (dis)agreements per antibiotic																
	AMOXICIL LIN	AMOX CLAV ULANIC ACID	CEFUR OXIME	CEFTRIA XONE	CEFTAZI DIME	CEFTRO PIME	PIPTAZO	TEMOCIL LIN	AZTREO NAM	MEROPE NEM	AMIKACI NE	CIPROFLO XACIN	TMP - SMX	FOSFO MYCINE	NITROFU RANTOIN	TOT AL
AGREEMENT	50/51	59/64	74/77	79/80	93/94	92/94	90/94	38/39	92/94	94/94	92/94	90/94	45/45	43/43	33/35	1064/1094 97.
MINOR ERROR	2	4	0	1	0	1	2	0	2	0	1	2	0	0	0	15 1.37
MAJOR ERROR	1	1	3	0	1	1	1	0	0	0	1	2	0	0	1	12 1.09
VERY MAJOR ERROR	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3 0.27
TOTAL	53	64	77	80	94	94	94	39	94	94	94	94	45	43	35	1094

Tabel 32.

5. Is er een significante invloed van antibioticatherapie?

Therapie	Ø	Antibiotica	Geen info	TOTAAL
n =	47	42	7	96
Aantal AB	569	426	99	1094
Minor Err	0.52%	1.87%	4.04%	1.37%
Major Err	0.52%	1.41%	3.03%	1.09%
Very Major	0,17%	0,23%	1,01%	0.27%

Tabel 33.

42 geïncludeerde patiënten kregen antibiotica toegediend ten tijde van de 2^e afname of in de daaraan voorafgaande week (n=42).

47 patiënten kregen ten tijde van de tweede afname (nog) geen antibiotica (n=47).

In 7 gevallen beschikten we niet over informatie omtrent eventuele antibioticatherapie.

In de groep isolaten afkomstig van patiënten die onder antibioticatherapie stonden ten tijde van de afname van het secundaire staal of in de 7 daaraan voorafgaande dagen (n=42) werden in totaal 426 gevoeligheidsbepalingen vergeleken. **1.87 % minor errors** traden op (8/426), simultaan met **1.41% major errors** (6/426), en **0.23% (1/426) very major errors**.

In de groep isolaten van patiënten zonder antibioticatherapie (n=47) werden 569 herhaalde gevoeligheidsbepalingen categoriek vergeleken. In deze groep traden **0.52% (3/569) minor errors** op, **0.52% (3/569) major errors** en **0.17% (1/569) VME**.

N =?	Antibiotica	Minor Err	Major Err	Very Major Error
42	JA	1.87%	1.41%	0.23%
47	NEEN	0.52%	0.52%	0.17%

Tabel 33.

We transponeren deze gegenereerde metingsresultaten opnieuw naar de verwijzingsprocedure waarin een gemeten major error een very major error wordt:

Primaire analyse	Repetitieve analyse (die in praktijk niet gebeurt)	Metingserror	Rapportering (=verwijzing naar 1 ^e analyse)	Rapporteringerror
R	S	VME	R i.p.v. S	Major error
S	R	ME	S i.p.v. R	Very Major Error

Tabel 34. Interpretatie errors.

(vb. 1^e meting S, 2^e meting R (dus 'major error') : in verwijzingspraktijk wordt de 2^e meting niet uitgevoerd maar wordt deze als S in plaats van R

Voor de rapportering betekenen bovenstaande gemeten gegevens dus dat er zowel

Deze data beschouwend, concluderen we dat de error rate in de subgroep staalverwijzingen zonder antibiotica-invloed duidelijk lager ligt dan in de subgroep stalen die wel blootgesteld werden aan antibiotica. Het percentage major errors in de volledige antibiotica-subgroep overstijgt echter niet het vooropgestelde maximumcriterium van 3%.

Het statistische significantieniveau werd nagegaan aan de hand van McNemar-testing ($p < 0.01$). Er is procentueel gezien duidelijk een invloed van antibiotica-gebruik op de error rate te vermoeden, maar dit is niet significant genoeg om de verwijzingsprocedure te verwerpen of aan te passen.

CONCLUSIE INVLOED ANTIBIOTICATHERAPIE

Het aantal categorieke disagreements in de subgroep zonder invloed van antibioticatherapie is lager over de hele lijn (zowel de minor errors, de ME en de VME).

Met behulp van de McNemar-test werd statistische significantie nagegaan van de invloed van antibioticatherapie op het voorkomen van disagreements in onze studie: de bekomen p-waarde bedroeg $p < 0.01$ waardoor we kunnen aannemen dat dit verschil statistisch significant is (en dus geen 'random event'). Hoewel er dus statistisch significant meer categorieke disagreements optraden in de subgroep waar antibioticatherapie plaatsvond met hogere error rates tot gevolg, vielen ook in deze subgroep de bekomen resultaten ruim binnen de vooropgestelde criteria.

Voor de **major errors** zijn hier van belang, aangezien dit een belangrijke parameter is die resistentie-ontwikkeling signaleert. Naar rapportering worden deze gemeten major errors dan ook als very major errors beschouwd. 1.40% gemeten major errors in deze subgroep (= 1.40% very major errors voor de rapportering) valt nog steeds ruimschoots binnen de acceptatiecriteria voor de rapportering, namelijk $\leq 1.5\%$.

Op basis van deze gegevens concluderen we dat het **onnodig is om routinematig 'verwijsbare' stalen afgenomen onder antibioticatherapie te hertesten.**

Mogelijke uitzonderingen zijn specifieke vraagstelling vanuit de kliniek, vermoeden van relevante resistentie-ontwikkeling op basis van insufficiënte therapierespons. In onze verwijzingsprocedure zullen we dan ook niet routinematig rekening houden met eventuele antibioticatherapie, tenzij op specifieke vraag of klinische verdenking van resistentie-ontwikkeling.

To do/ACTIONS

- 1) Presentatie studieresultaten op BD User's Day meeting op 08/12/2011 (Lindner hotel , Antwerpen)
- 2) Aanpassing procedure zo Maldi-TOF geïmplementeerd.
- 3) Multicenter evaluatie van de verwijzingsprocedure: Bilulu-project