

# CAT: Optimalisatie van antimicrobiële gevoeligheidsbepaling van anaerobe bacteriën

Samen Grenzen Verleggen

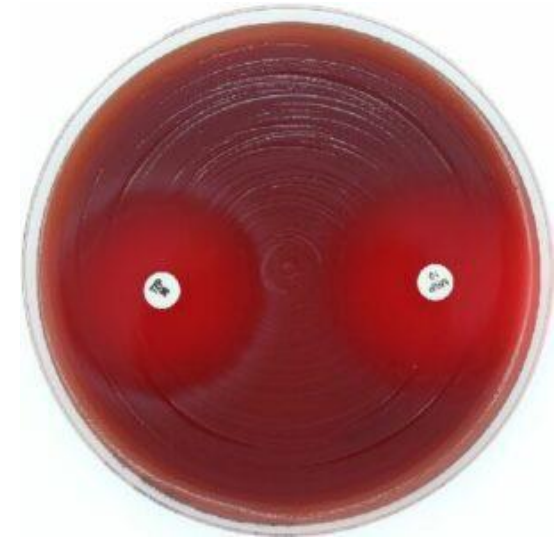
# Hoe gevoeligheidsbepaling anaerobe bacteriën optimaliseren?



Brucella agar  
MIC bepaling

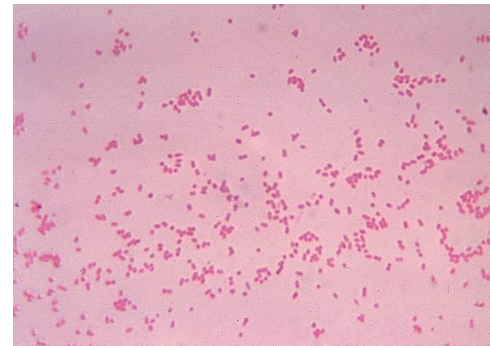
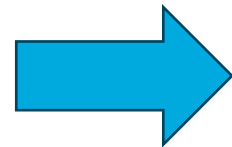
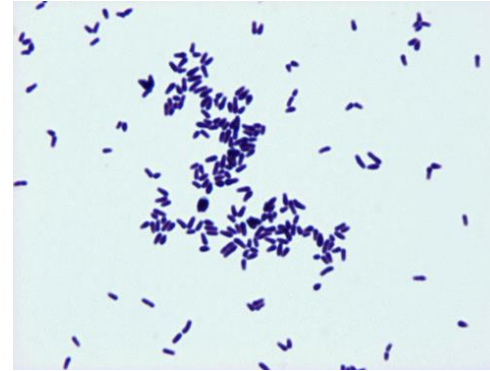
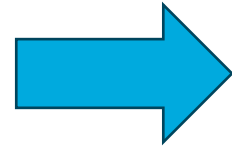


Fastidious anaerobe agar (FAA)  
Disk diffusiemethode



# Introductie: wat zijn anaerobe kiemen?

Anaerobe kiemen onderverdeling



- *Cutibacterium spp.*
- *Clostridium spp.*

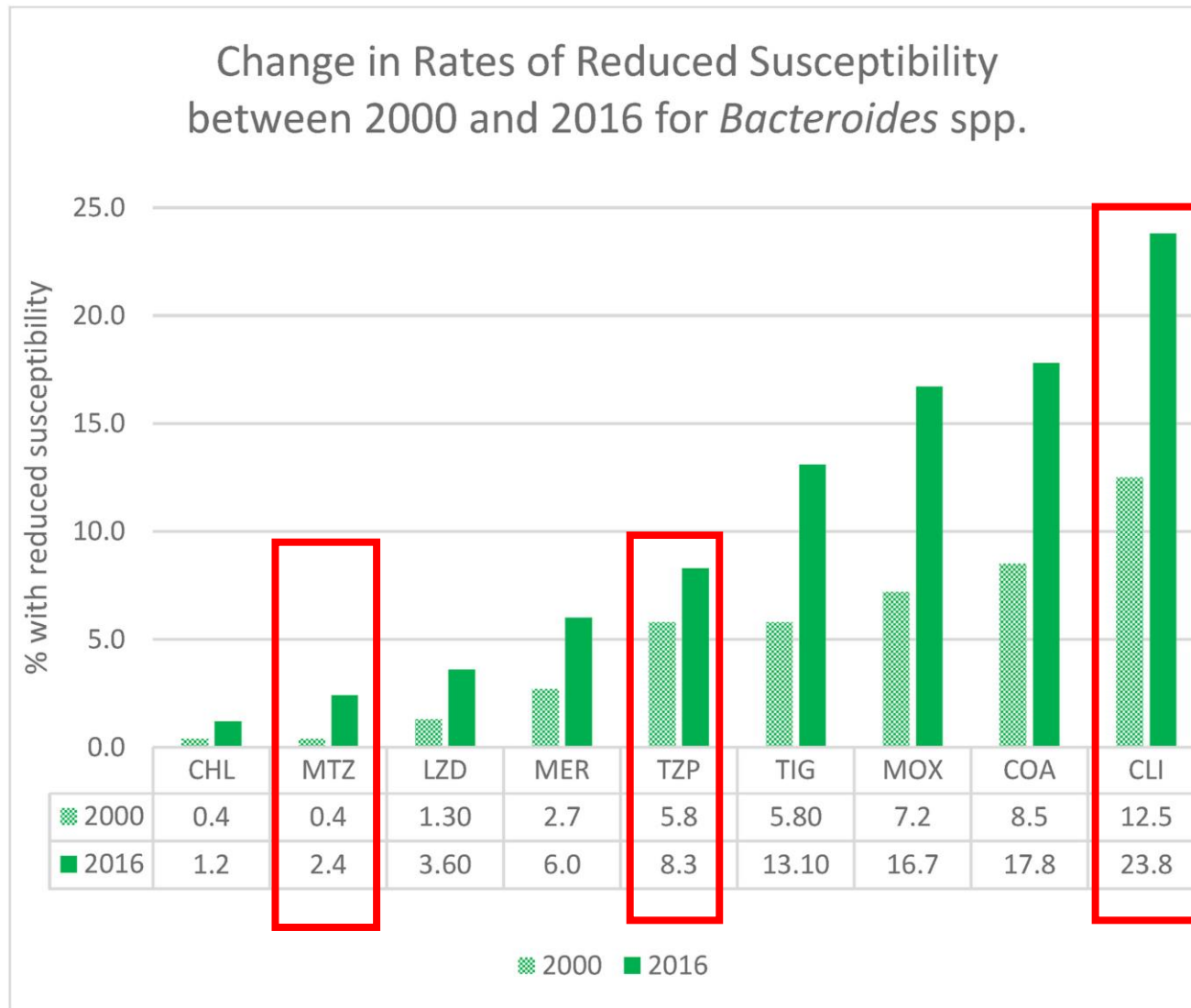
- *Bacteroides spp.*
- *Prevotella spp.*
- *Fusobacterium spp.*
- *Veillonella spp.*



UZ  
LEUVEN



# Introductie: resistentiecijfers

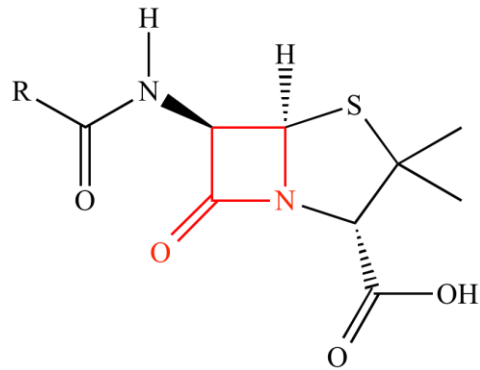


UZ  
LEUVEN

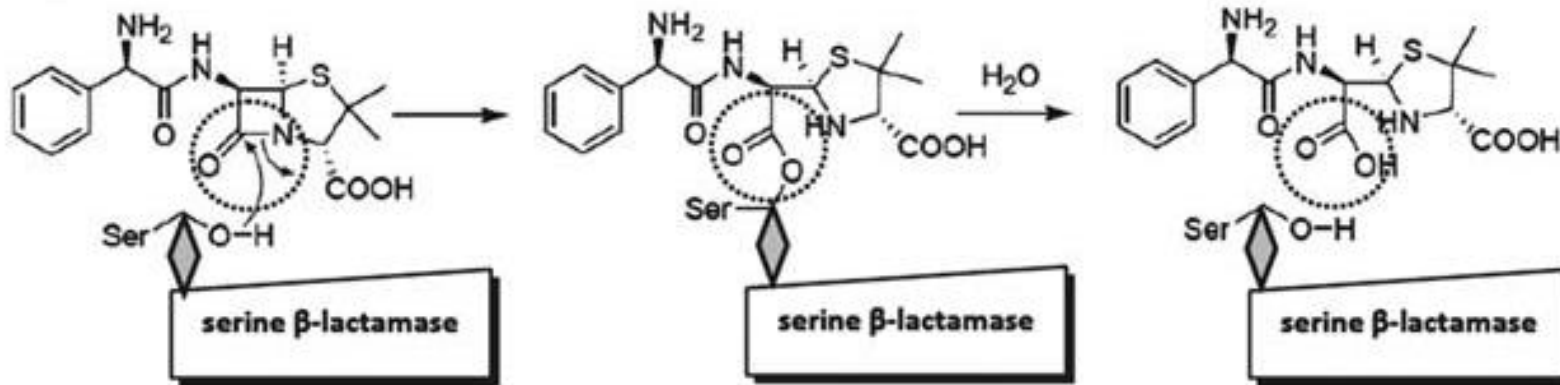
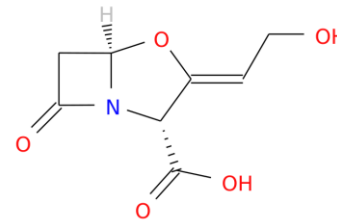


# Introductie: resistentiemechanismen

$\beta$ -lactam antibiotica



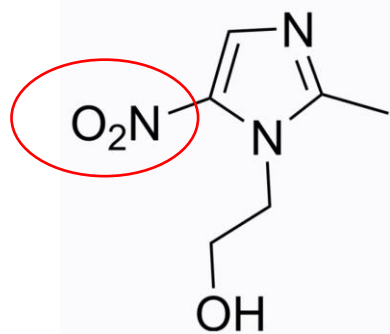
Clavulaanzuur



# Introductie: resistentiemechanismen

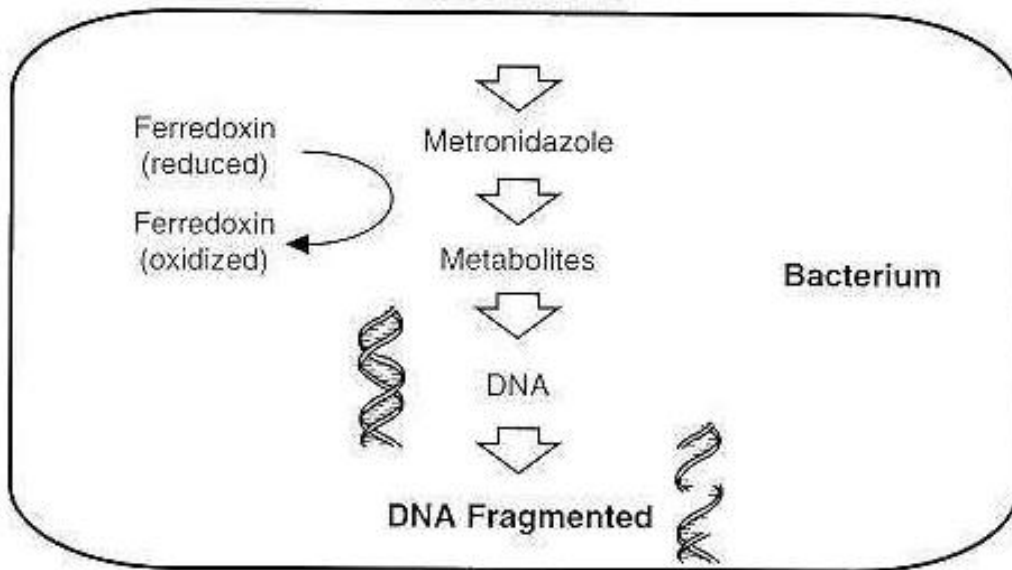


Metronidazole



Resistentiemechanisme:

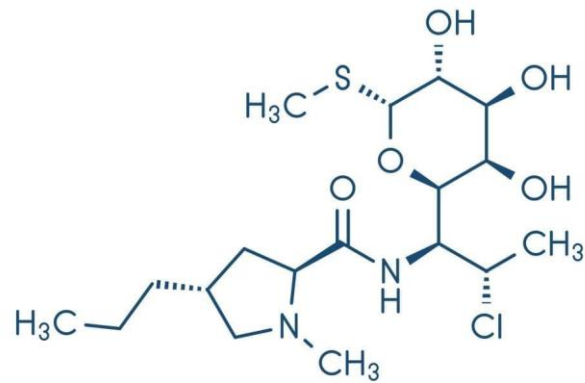
Inactivatie van prodrug via nitroimidazole-reductase



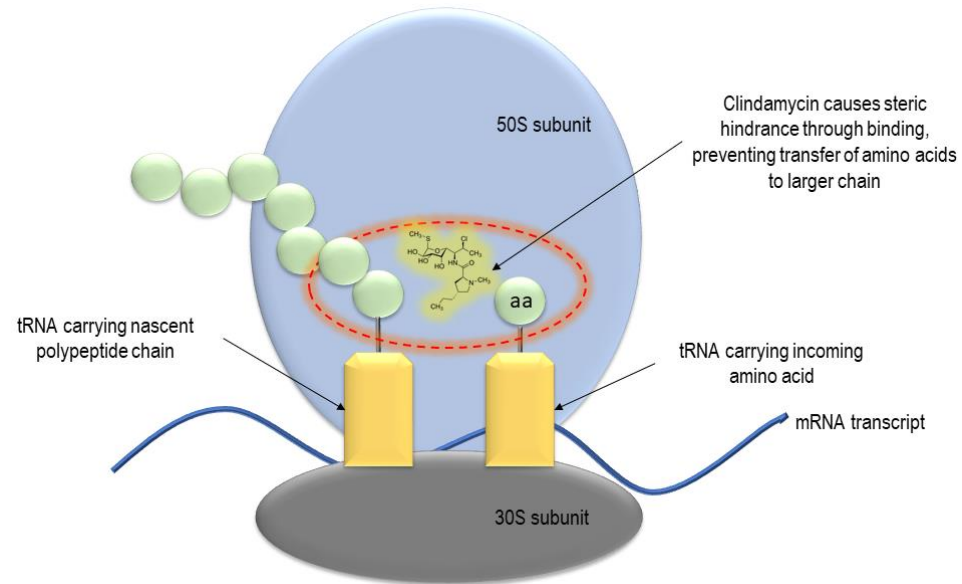
UZ  
LEUVEN



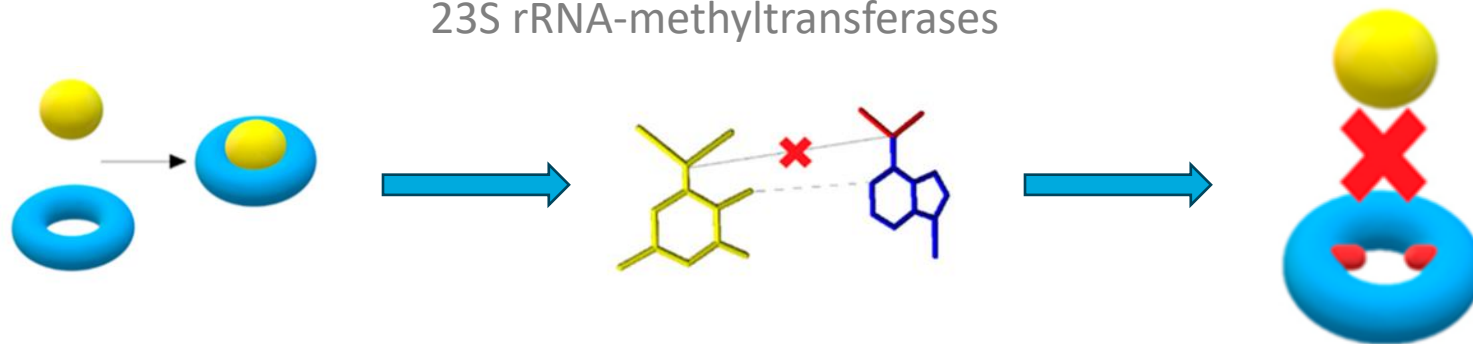
# Introductie: resistentiemechanismen



clindamycin



23S rRNA-methyltransferases



# Introductie: richtlijnen CLSI

Table 2J. MIC Breakpoints for Anaerobes

## Testing Conditions

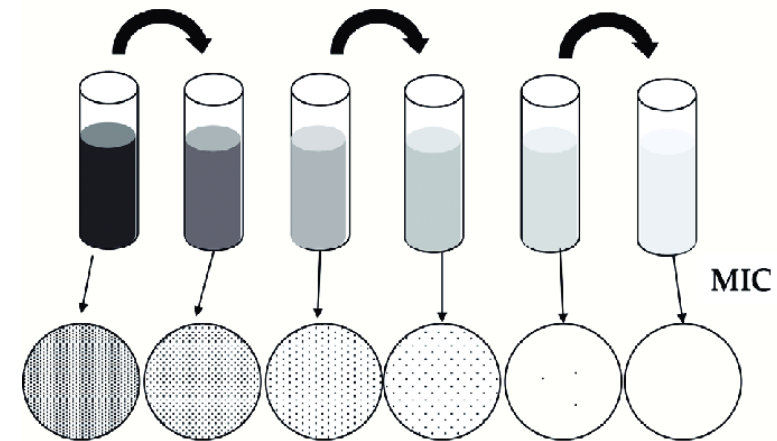
**Medium:** Agar dilution (for all anaerobes): Brucella agar supplemented with hemin (5 µg/mL), vitamin K<sub>1</sub> (1 µg/mL), and laked sheep blood (5% v/v)  
Broth microdilution (for *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* only): Brucella broth supplemented with hemin (5 µg/mL), vitamin K<sub>1</sub> (1 µg/mL), and LHB (5% v/v)

**Inoculum:** Broth culture method or colony suspension, equivalent to 0.5 McFarland suspension  
Agar: 10<sup>5</sup> CFU per spot  
Broth: 10<sup>6</sup> CFU/mL

**Incubation:** 36°C ± 1°C, anaerobically  
Broth microdilution: 46–48 hours  
Agar dilution: 42–48 hours



Serial dilution (Bacteria+NPs)



Bacteria growth (CFU) in Petri dishes

- 1 tabel voor interpretatie van alle anaerobe kiemen o.b.v. MIC breekpunten



# Introductie: richtlijnen EUCAST

## MIC determination (agar dilution)

**Medium:** Fastidious Anaerobe Agar + 5% defibrinated horse blood (FAA-HB)

**Inoculum:**  $10^5$  CFU/spot

**Incubation:** Anaerobic environment, 35-37°C, 42-48h

**Reading:** Unless otherwise stated, read MICs at the lowest concentration of the agent where a noticeable difference is seen in visible growth between the test and control plate.

**Quality control:** *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 and *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

For control of the inhibitor component of beta-lactam inhibitor combinations, see EUCAST QC Tables.

See disk diffusion methodology for how to monitor the anaerobic atmosphere with *Clostridium perfringens* DSM 25589.



- *Bacteroides* spp.
- *Prevotella* spp.
- *Fusobacterium necrophorum*.
- *Cutibacterium* spp.
- *Clostridium perfringens*



## Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)

**Medium:** Fastidious Anaerobe Agar + 5% defibrinated horse blood (FAA-HB). The plates should be dried prior to inoculation (at 20-25°C overnight or at 35°C, with the lid removed, for 15 min).

**Inoculum:** McFarland 1.0

**Incubation:** Anaerobic environment, 35-37°C, 18±2h

**Reading:** Unless otherwise stated, read zone edges as the point showing no growth viewed from the front of the plate with the lid removed and with reflected light. See pictures below and the EUCAST Reading Guide for disk diffusion of anaerobic bacteria for further information.

**Quality control:** *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 and *Clostridium perfringens* ATCC 13124. For control of the inhibitor component of beta-lactam inhibitor combination disks, see EUCAST QC Tables.

*Clostridium perfringens* DSM 25589 with a metronidazole 5 µg disk to monitor the anaerobic atmosphere.



# Introductie: richtlijnen EUCAST



WAT VOOR OVERIGE  
ANAEROBE KIEMEN?



EUCAST guidance on  
**When there are no breakpoints in breakpoint tables?**



**Table 2. Antimicrobial agents relevant for the treatment of anaerobic bacteria with guidance for bacteria lacking breakpoints in standard EUCAST breakpoint tables.**



**Tabel met MIC-waarden**



UZ  
LEUVEN



# CAT vragen



1

**Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?**

2

Kunnen we in het laboratorium overschakelen naar de EUCAST disk diffusie methode voor alle klinisch belangrijke anaeroben? Zijn er disk diffusie breekpunten beschikbaar voor alle kiemen die we op dit moment testen?

3

Wat is het verschil in kostprijs tussen het uitvoeren van disk diffusie volgens EUCAST en gradiënt diffusie?



# Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

## Selectie FAA-HB voedingsbodem



### Liofilchem®

#### TYPICAL FORMULA\* (Per Litre of Purified Water)

Peptone Mix	23.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Soluble Starch	1.0 g
Sodium Bicarbonate	0.4 g
Glucose	1.0 g
Sodium Pyruvate	1.0 g
Cysteine HCl monohydrate	0.5 g
Haemin	0.01 g
Vitamin K	0.001g
L-Arginine	1.0 g
Soluble Pyrophosphate	0.25 g
Sodium Succinate	0.5 g
Agar	12.0 g
<u>Defibrinated Horse Blood</u>	50.0 ml

Final pH 7.2 ± 0.2 at 25°C

\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

#### QUALITY CONTROL

**Appearance of Medium:** Opaque, ruby red.

The agar depth must be 4.0 ± 0.5 mm.

**biotrading**   
an analyt**ic**hem company

#### FAA

A primary isolation medium capable of growing most clinically significant anaerobes.

Peptone mix 23.0; Sodium chloride 5.0; Soluble starch 1.0; Agar 12.0; Sodium bicarbonate 0.4; Glucose 1.0; Sodium pyruvate 1.0; Cysteine HCl monohydrate 0.5; Haemin 0.01; Vitamin K 0.001; L-Arginine 1.0; Soluble pyrophosphate 0.25; Sodium succinate 0.5; Sheep blood 60.0 ml

Nationaal Antibiotica Commissie (NAC) lab:  
goede resultaten

Geen regulatie agar diepte





UZ  
LEUVEN



# Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

## Selectie FAA-HB antimicrobiële schijfjes

The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers—EUCAST evaluations in 2014 and 2017

J. Åhman  , [E. Matuschek](#), [G. Kahlmeter](#)

- Mueller-Hinton agar (met bloed)
- Vergelijking 9 producenten (geen Rosco NeoSensitabs)
- Aerobe kiemen
- Beste schijfjes: Oxoid, BD, Mast

**Gebruiken in validatiestudie**

**BIO-RAD**

Nationaal Antibiotica Commissie (NAC):  
goede resultaten

 **UZ  
LEUVEN**



# Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

## Validatie methode



✓ 15-15-15-minuten regel

🕒 16-20 uur

- *Bacteroides fragilis* ATCC 25285
- *Clostridium perfringens* ATCC 13124

# Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

## Validatie methode

### *Bacteroides fragilis* ATCC 25285

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)		Disk content (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	
	Target <sup>1</sup>	Range <sup>2</sup>		Target <sup>1</sup>	Range <sup>2</sup>
Amoxicillin-clavulanic acid <sup>3,4</sup>	0.125	0.06-0.25	2-1	26	23-29
Ampicillin-sulbactam <sup>4,5</sup>	0.25	0.125-0.5	10-10	31	28-34
Clindamycin	1	0.5-2	2	25	22-28
Ertapenem	0.125	0.06-0.25	10	36	33-39
Imipenem	0.06	0.03-0.125	10	41	38-44
Meropenem	0.06-0.125	0.03-0.25	10	35-36	32-39
Metronidazole	0.5	0.25-1	5	32-33	29-36
Piperacillin-tazobactam <sup>4,6</sup>	0.25	0.125-0.5	30-6	32	29-35

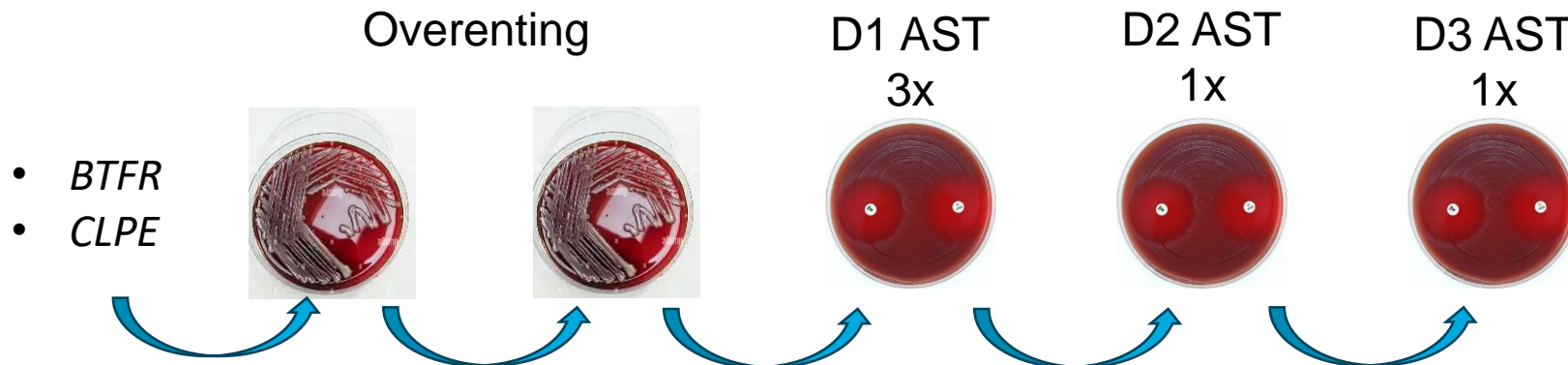
### *Clostridium perfringens* ATCC 13124

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)		Disk content (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	
	Target <sup>1</sup>	Range <sup>2</sup>		Target <sup>1</sup>	Range <sup>2</sup>
Amoxicillin	0.016-0.03	0.008-0.06	-	-	-
Amoxicillin-clavulanic acid <sup>3,4</sup>	0.016-0.03	0.008-0.06	2-1	31	28-34
Ampicillin	0.016-0.03	0.008-0.06	2	32	29-35
Ampicillin-sulbactam <sup>4,5</sup>	0.016-0.03	0.008-0.06	10-10	35	32-38
Benzylpenicillin	0.06	0.03-0.125	1 unit	25	22-28
Cefotaxime	-	-	5	30	27-33
Ceftriaxone	IP	IP	30	34	31-37
Clindamycin	0.06	0.03-0.125	2	23	20-26
Ertapenem	IP	IP	10	34	31-37
Imipenem	IP	IP	10	34	31-37
Linezolid	4	2-8	10	24	21-27
Meropenem	0.008	0.004-0.016	10	36	33-39
Metronidazole	2	1-4	5	23	20-26
Piperacillin-tazobactam <sup>4,6</sup>	0.03-0.06	0.016-0.125	30-6	32	29-35
Vancomycin	1	0.5-2	5	17	14-20

# Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

## Resultaten diskdiffusiemethode

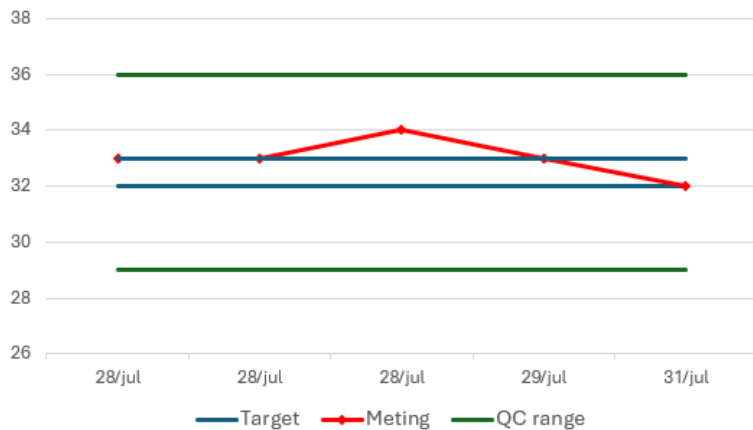
Kiem	Antibioticum	Oxoid/ Liofilchem	Bio-Rad/ Liofilchem	Oxoid/ BioTrading	Bio-Rad/ Biotrading
BTFR	Amoxiclav	5/5	5/5	4/5	3/5
	Meropenem	5/5	5/5	5/5	5/5
	Metronidazole	5/5	5/5	0/5	0/5
CLPE	Benzylopenicilline	5/5	5/5	3/5	1/5
	Clindamycine	5/5	2/5	0/5	0/5
	Metronidazole	5/5	3/5	0/5	0/5



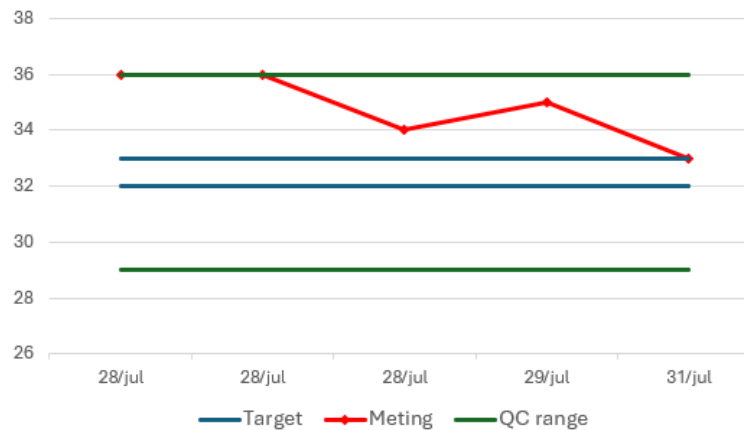
# Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

## Resultaten diskdiffusiemethode

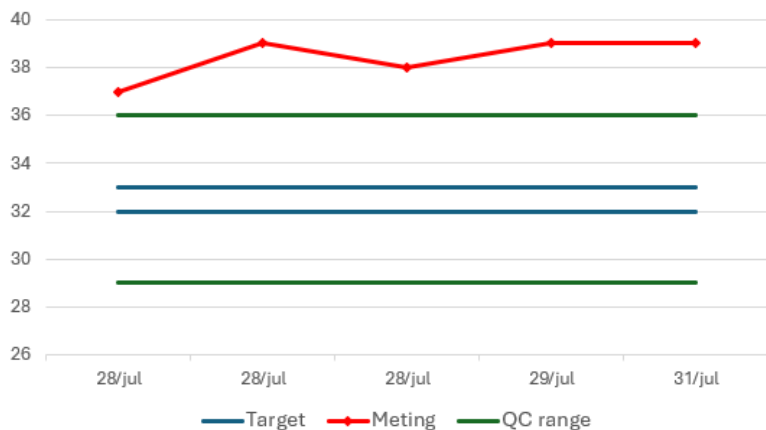
A. BTFR: Zonediameter Metro (Oxoid) op FAA-HB (Liofilchem)



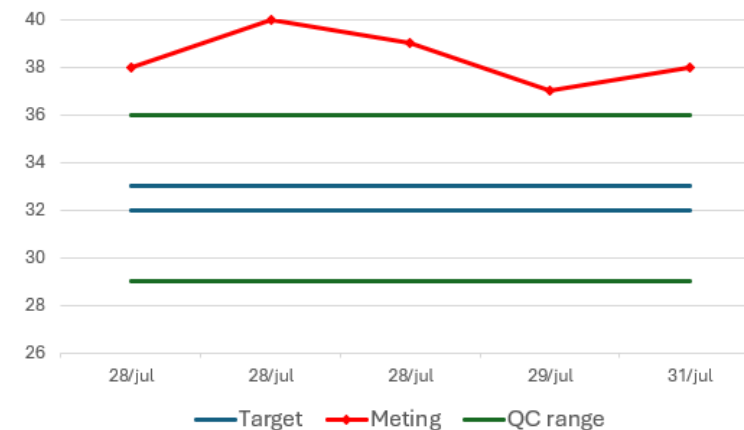
B. BTFR: Zonediameter Metro (Bio-Rad) op FAA-HB (Liofilchem)



C. BTFR: Zonediameter Metro (Oxoid) op FAA-HB (BioTrading)



D. BTFR: Zonediameter Metro (Bio-Rad) op FAA-HB (Bio-Trading)



# CAT vragen



1

Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

2

**Kunnen we in het laboratorium overschakelen naar de EUCAST disk diffusie methode voor alle klinisch belangrijke anaeroben? Zijn er disk diffusie breekpunten beschikbaar voor alle kiemen die we op dit moment testen?**

3

Wat is het verschil in kostprijs tussen het uitvoeren van disk diffusie volgens EUCAST en gradiënt diffusie?



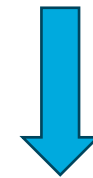
# Overschakeling mogelijk naar EUCAST disk diffusie methode voor alle klinisch belangrijke anaeroben? Disk diffusie voor alle anaeroben?

## Interpretatie gevoeligheidsbepaling bij anaeroben

	74%					26%	
	Bacteroides spp. (diskdiffusie)	Prevotella spp. (diskdiffusie)	Fusobacterium necrophorum (diskdiffusie)	Clostridium spp. <sup>3</sup> (diskdiffusie)	C. acnes (diskdiffusie)	Overige Gramnegatieven (E-testen)	Overige Grampositieven <sup>3</sup> (E-testen)
Penicilline	/	S ≥ 20 <sup>1</sup>	S ≥ 25 <sup>1</sup>	S ≥ 15 <sup>1</sup>	S ≥ 24 <sup>1</sup>	/	S ≤ 0.5
		R < 20 <sup>1</sup>	R < 25 <sup>1</sup>	R < 15 <sup>1</sup>	R < 24 <sup>1</sup>		R > 0.5
Amoxiclav <sup>3</sup>	S ≥ 14	S ≥ 24 <sup>1</sup>	S ≥ 23 <sup>1</sup>	/	/	S ≤ 0.5	/
	R < 14	R < 24 <sup>1</sup>	R < 23 <sup>1</sup>			R > 0.5	
Meropenem	S ≥ 28	/	/	/	/	/	/
	R < 28						
Clindamycine <sup>4</sup>	/	S ≥ 31 <sup>2</sup>	S ≥ 30 <sup>2</sup>	S ≥ 19 <sup>2</sup>	S ≥ 26 <sup>2</sup>	S ≤ 0.5	S ≤ 0.5
		R < 31 <sup>2</sup>	R < 30 <sup>2</sup>	R < 19 <sup>2</sup>	R < 26 <sup>2</sup>	R > 0.5	R > 0.5
Metronidazole	S ≥ 25	S ≥ 22	S ≥ 30	S ≥ 16	/	S ≤ 4	S ≤ 4*
	R < 25	R < 22	R < 30	R < 16		R > 4	R > 4
Rifampicine	/	/	/	/	S ≤ 0,06	/	/
					R > 0,06		

Zijn er **disk diffusie breekpunten** beschikbaar voor alle kiemen die we op dit moment testen?

**Neen!**



**Validatie van E-testen op FAA-HB agar noodzakelijk**



**UZ  
LEUVEN**



# Kunnen E-testen volgens EUCAST gevalideerd worden op een commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

## Validatie E-testen op FAA-HB agar

Kiem	Antibioticum	bioMérieux/ Liofilchem	bioMérieux/ BioTrading
BTFR	Amoxicilline/ clavulaanzuur	4/5	0/5
	Meropenem	5/5	5/5
	Metronidazole	5/5	0/5
CLPE	Benzylpenicilline	1/1	1/1
	Clindamycine	1/1	1/1
	Metronidazole	0/1	0/1



# CAT vragen



1

Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?

2

Kunnen we in het laboratorium overschakelen naar de EUCAST disk diffusie methode voor alle klinisch belangrijke anaeroben? Zijn er disk diffusie breekpunten beschikbaar voor alle kiemen die we op dit moment testen?

3

**Wat is het verschil in kostprijs tussen het uitvoeren van disk diffusie volgens EUCAST en gradiënt diffusie?**



# Wat is het verschil in kostprijs tussen het uitvoeren van disk diffusie volgens EUCAST en gradiënt diffusie?

## Kostenanalyse

### Huidige werkwijze

- 100% E-testen op Brucella agar
  - 2 platen nodig per gevoeligheidsbepaling
- Totale kostprijs: 11800 euro per jaar

### Toekomstige werkwijze

- 74% disk diffusiemethode op FAA-HB agar
  - 1 FAA-HB bodem nodig per gevoeligheidsbepaling
  - Kostprijs: 840 euro per jaar
- 26% E-testen op FAA-HB agar
  - 2 platen nodig per gevoeligheidsbepaling
  - Kostprijs: 3000 euro per jaar
- Totale kostprijs: 3840 euro per jaar

67% besparing

# Gevoeligheidsbepaling anaerobe bacteriën optimaliseren?



Brucella agar  
MIC bepaling



Ja! Maar...



- Verdere validatie E-testen
- Herschrijven procedures
- Externe QC en/of verdere validatie aan de hand van stammen met gekende gevoeligheid



Fastidious anaerobe agar  
Disk diffusiemethode



# Bedankt voor jullie aandacht!

Samen Grenzen Verleggen

Auteur: Apr. Maarten Uwents

Supervisor: Prof. apr. Klin.biol. Stefanie Desmet

Datum: 16 september 2025

# Vragen

## Verschil FAA-HB en Brucella agar

Kenmerk	FAA-HB agar	Brucella agar
<b>Bloedcomponent</b>	Paarden bloed	Rund bloed
<b>Gebruik volgens</b>	EUCAST	CLSI
<b>Toepassing</b>	Gevoeligheidsbepaling anaeroben	Gevoeligheidsbepaling anaeroben
<b>Bevat vaak</b>	Minder aanvullende groeifactoren	Vitamine K1, heem en andere
<b>Groei-ondersteuning</b>	Gericht op fastidieuze anaeroben	Breder spectrum anaeroben

