

CAT
Critically Appraised Topic**Optimalisatie van antimicrobiële gevoeligheidsbepaling van anaerobe bacteriën**

Auteur: Apr. Maarten Uwents
Supervisor: Prof. apr. klin. biol. Stefanie Desmet
Datum: 16 september 2025

SAMENVATTING

Deze 'Critically Appraised Topic' (CAT) richt zich op het optimaliseren van de antimicrobiële gevoeligheidsbepaling (AST) voor anaerobe bacteriën. Binnen UZ Leuven wordt de AST voor anaeroben momenteel uitgevoerd op Brucella-agar (in-house bereid) met behulp van Etesten (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrijk). Deze methode werd ingevoerd in 2017, op het moment dat het laboratorium overschakelde van Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) naar European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) klinische breekpunten. Op dat moment waren geen EUCAST QC ranges voor anaeroben ter beschikking en werden de CLSI QC ranges gebruikt voor de kwaliteitsborging van de gevoeligheidsbepaling van de anaeroben. Er werd toen in de EUCAST richtlijn verwezen naar de richtlijn van de methode voor praktische uitvoering van de MIC bepalingen. Sinds 2022 heeft EUCAST een disk diffusie methode ontwikkeld met gebruik van een andere bodem: Fastidious Anaerobe Agar with Horse blood (FAA-HB). Op dit moment zijn er commerciële FAA-HB voedingsbodems ter beschikking, waardoor ook implementatie van de disk diffusie methode ook in ons laboratorium mogelijk zou zijn. Deze CAT onderzoekt of de disk diffusie methode voor anaerobe kiemen conform de EUCAST-richtlijnen kan worden uitgevoerd in het labo en bereidt de praktische implementatie voor.

EUCAST beschrijft voor de anaerobe gevoeligheidsbepaling een gestandaardiseerde disk diffusie methode op Fastidious Anaerobe Agar met 5% paardenbloed (FAA-HB). Voor deze studie werden FAA-HB-bodems aangekocht bij twee leveranciers: BioTrading en Liofilchem. De samenstelling van beide bodems is vergelijkbaar, maar niet identiek. Daarnaast werden antimicrobiële schijfjes getest van twee verschillende producenten: Oxoid en Bio-Rad. Conform de EUCAST-richtlijnen werd de gevoeligheidsbepaling gecontroleerd met behulp van twee kwaliteitscontrole stammen (QC-stammen) : *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 en *Clostridium perfringens* ATCC 13124. Naast juistheid werd reproduceerbaarheid van de resultaten onderzocht.

In totaal werden vier combinaties getest, waarbij elke voedingsbodem (BioTrading FAA-HB en Liofilchem FAA-HB) werd gecombineerd met elk type antimicrobieel schijfje (Oxoid en Bio-Rad). Slechts één combinatie (Oxoid schijfjes op Liofilchem FAA-HB) voldeed volledig aan de EUCAST QC-criteria. Bij deze combinatie lagen alle gemeten inhibitiezones voor beide QC-stammen binnen de vastgestelde QC-grenzen. De drie overige combinaties vertoonden meerdere QC-overtredingen, waarbij op de BioTrading FAA-HB de meeste overtredingen plaatsvonden. Dit kan te wijten zijn aan het verschil in samenstelling aangezien deze bodem niet volledig voldoet aan de EUCAST normen en geen gereguleerde agardiepte heeft. Ook werden Etesten gevalideerd op de FAA-HB agar. De MIC resultaten van de twee QC stammen lagen binnen de vooropgestelde EUCAST QC ranges. Uit deze resultaten blijft dat de FAA-HB voedingsbodem van Liofilchem voldoet aan de normen. In het labo van UZ Leuven is het dus mogelijk om de antimicrobiële gevoeligheidsbepaling van anaerobe kiemen te optimaliseren. Na het afronden van de volledige validatie van Etesten op FAA bodem, zullen we kunnen overschakelen naar gevoeligheidsbepaling van anaeroben op Liofilchem FAA-HB agar met gebruik van Oxoid schijfjes voor de species met disk diffusie breekpunten, en Etesten voor de overige species.

KLINISCH EN DIAGNOSTISCH SCENARIO

Anaerobe kiemen maken een belangrijk deel uit van de normale humane microbiota, voornamelijk ter hoogte van het gastro-intestinale stelsel, de mondholte, de vrouwelijke genitaliën en de huid. Hoewel ze meestal onschadelijk zijn, kunnen ze als opportunistische pathogenen diverse infecties veroorzaken, vaak vanuit de plaats van hun normale kolonisatie. Voorbeelden hiervan zijn hersen- en tandabscessen, necrotiserende wekedeleninfecties en abdominale infecties. Ze kunnen ook leiden tot een bacteriëmie, diepe weefsel infecties en bot- en gewrichtsinfecties. Dergelijke infecties gaan vaak gepaard met een aanzienlijk hoge mortaliteit (1–3).

Door verbeterde identificatietechnieken worden regelmatig nieuwe anaerobe species beschreven die betrokken zijn bij ernstige humane infecties. De meest klinisch relevante gram-negatieve anaeroben omvatten de *Bacteroides fragilis*-groep, *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. en *Veillonella* spp. Voor gram-positieve staven zijn dit *Cutibacterium* spp., voornamelijk *C. acnes* dat vaak een rol speelt bij chronische bot- en gewrichtsinfecties en *Clostridium* spp., die verantwoordelijk zijn voor diverse ernstige infecties, waaronder gasgangreen. Bij de gram-positieve anaerobe kokken worden voornamelijk *Parvimonas micra* en *Fingoldia magna* het meest frequent geïsoleerd (1,3).

De technische uitdagingen bij het identificeren en kweken van anaerobe kiemen leidde er in het verleden vaak minder toe dat er routinematig antimicrobiële gevoeligheidsbepaling werd uitgevoerd. Anaerobe infecties werden lange tijd empirisch behandeld, zonder voorafgaande gevoeligheidsbepaling, wat in sommige gevallen leidde tot therapie falen en een toename van resistentie. Wereldwijd en voornamelijk in Europa en Azië, wordt al decennialang een stijging in antimicrobiële resistentie bij anaeroben gerapporteerd (3,4). Tot op heden wordt AST voor anaerobe bacteriën echter niet op een uniforme wijze uitgevoerd en is de wetenschappelijke literatuur hierover beperkt. Deze combinatie van factoren draagt bij aan een grote variatie in testresultaten, waardoor gegevens moeilijk vergelijkbaar zijn (3,4).

Antimicrobiële resistentie bij anaeroben is veelzijdig en wordt veroorzaakt door verschillende mechanismen, waaronder methylering van doelwitten, productie van β -lactamasen, actieve effluxpompen en veranderingen in porinestructuren (3,4). Hieronder worden de meest relevante antibiotica en resistentiemechanismen besproken voor de behandeling van anaerobe infecties.

β -lactam antibiotica behoren tot de eerste keuze antibiotica bij het behandelen van anaerobe infecties vanwege hun lage toxiciteit, bactericide werking en brede anaerobe spectrum, vooral wanneer ze worden gecombineerd met een β -lactamase inhibitor. Resistentie tegen β -lactam antibiotica wordt voornamelijk veroorzaakt door de productie van β -lactamasen. Binnen de anaerobe kiemen vormen *Bacteroides* en *Parabacteroides* species het grootste probleem door de hoge resistentiecijfers. Rond 1990 toonde een multicenter studie in 15 Europese landen een resistentieprevalentie bij *Bacteroides fragilis* van respectievelijk 1% voor amoxicilline-clavulaanzuur, 3% voor cefoxitine en 0,3%, voor imipenem. Deze data werd vergeleken met een multicenterstudie, uitgevoerd in 13 Europese landen in 2008-2009, waarbij deze resistentiecijfers zijn gestegen tot 10%, 17% en 1% voor dezelfde antibiotica. Carbapenemresistentie wordt voornamelijk veroorzaakt door Zn^{2+} -afhankelijke B-metallo-carbapenemases maar blijft ook relatief zeldzaam. Er wordt ook vaker resistentie gemeten tegen ertapenem dan imipenem of meropenem (3–5).

Metronidazole behoort tot de 5-nitroimidazoolgroep en speelt samen met β -lactam antibiotica een centrale rol in de behandeling van anaerobe infecties. Metronidazole is een prodrug dat na absorptie door passieve diffusie intracellulair wordt geactiveerd. De reductie van de nitro-groep leidt tot de vorming van een toxisch bactericide metaboliet. Resistentie tegen metronidazole blijft zeer ongewoon waarbij het resistentiemechanisme ook nog niet volledig werd uitgeklaard. Een van de meest belangrijke resistentiemechanismen werkt op de inactivatie van de prodrug via nitroimidazole-reductase. Door de zeldzame resistentie tegen metronidazole speelt dit oudere molecuul dat in 1960 werd ontdekt, nog een belangrijke rol in het behandelen van anaerobe infecties (3,4,6).

Clindamycine, een bacteriostatisch lincosamide met een breed anaeroob spectrum, werd vroeger vaak gebruikt als eerste lijn behandeling voor niet-ernstige anaerobe infecties. Door de sterk gestegen resistentie tegen clindamycine is het gebruik ervan in empirische setting bij ernstige infecties naar de achtergrond verschoven. Rond 1990 lag de prevalentie van resistentie tegen clindamycine bij *Bacteroides* en *Parabacteroides* species nog onder 10%, maar dit is sindsdien meer dan verdrievoudigd tot ongeveer 35%. Resistentie is voornamelijk gemedieerd door Erm-genen (erythromycin ribosome methylase), die coderen voor 23S rRNA-methyltransferases. Deze enzymen methyleren specifiek adenineresiduen in het 23S rRNA van de 50S ribosomale subeenheid. Door de methylering verandert de structuur van de bindingsplaats voor macroliden en lincosamiden waardoor de bindingsaffiniteit van clindamycine voor het ribosoom sterk afneemt. Door deze hoge resistentiegraad wordt clindamycine tegenwoordig minder vaak gebruikt voor de behandeling van anaerobe infecties (3,7,8).

Uit de voorgaande paragrafen blijkt dat de resistentie bij anaerobe kiemen wereldwijd toeneemt, wat de noodzaak benadrukt van gestandaardiseerde en betrouwbare antimicrobiële gevoeligheidsbepalingen. Alleen zo kan therapie falen effectief worden voorkomen en kan de optimale keuze van antibiotica bij anaerobe infecties worden gegarandeerd.

Agar dilutie, wat de gouden standaard methode is voor de gevoeligheidsbepaling van anaeroben, is een goede methode om te gebruiken in studieverband maar is niet praktisch voor routinematige testen. Methodes zoals commercieel beschikbare gradiënt strips worden vaak toegepast maar hun gebruik wordt gelimiteerd door de kost. De verschillen in testmethodologie en interpretatieve breekpunten dragen bij aan de inconsistentie van gevoeligheidsbepalingen en resistentiegegevens. Door de veranderende gevoeligheidsprofielen en de opkomst van nieuwe resistentiemechanismen, zijn voorspelbare patronen van antimicrobiële resistentie (AMR) echter afgenomen. Dit benadrukt de noodzaak van gestandaardiseerde, accurate en betaalbare routinematige gevoeligheidsbepalingen (2,9).

Voor de gevoeligheidsbepaling van anaerobe bacteriën maken we in UZ Leuven tot op heden gebruik van Brucella agar, aangezien dit door bioMérieux, de producent van onze Etesten de te gebruiken bodem is (10). Deze methode werd ingevoerd in 2017, op het moment dat het laboratorium overschakelde van CLSI naar EUCAST klinische breekpunten. Op dat moment waren geen EUCAST QC ranges voor anaeroben ter beschikking en werden de CLSI QC ranges gebruikt voor de kwaliteitsborging van de gevoeligheidsbepaling van de anaeroben. Sinds 2022 heeft EUCAST ook een disk diffusie methode ontwikkeld met gebruik van een andere bodem: Fastidious Anaerobe Agar with Horse blood (FAA-HB). Op dat moment pasten ze ook de richtlijn aan voor de MIC bepaling, met enkel nog vermelding van agar dilutie en geen vermelding meer van andere methoden. Over de jaren heen kwamen er meer species specifieke breekpunten ter beschikking, breekpunten voor meerdere antibiotica werden opgenomen in de tabel. Zo was er in 2022 nog geen breekpunt beschikbaar voor amoxicilline-clavulaanzuur voor *Bacteroides* spp, *Prevotella* spp en *Fusobacterium necrophorum* (11).

De FAA-HB agar is een specifieke voedingsbodem ontwikkeld voor cultivatie en gevoeligheidsbepaling van *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* en *Cutibacterium acnes* met de disk diffusie methode. Voor andere anaerobe bacteriën zijn momenteel enkel breekpunten op basis van de MIC-waarde beschikbaar. Ook voor deze groep kan deze FAA-HB agar gebruikt worden voor een gevoeligheidsbepaling op basis van MIC-breekpunten op voorwaarde dat hiervoor een succesvolle validatie wordt uitgevoerd (11,12).

Indien beide methoden (disk diffusie en MIC) op de FAA-HB bodem gevalideerd kunnen worden, kan deze methode geïmplementeerd worden in het laboratorium. De validatie verliep initieel moeizaam doordat het lange tijd duurde voordat er een commerciële FAA-HB bodem op de markt beschikbaar kwam. Eénmaal er commerciële voedingsbodems op de markt waren, werd bij een initiële validatiestudie geen correcte resultaten gevonden voor de kwaliteitscontrole stammen (12). In UZ Leuven worden jaarlijks ongeveer 466 gevoeligheidsbepalingen van anaerobe kiemen uitgevoerd. Ons laboratorium wil de huidige werkwijze herzien en nagaan of de EUCAST disk diffusie methode in de praktijk geïmplementeerd kan worden. De uitdaging blijft echter dat er nog geen zone-diameterbreekpunten zijn vastgesteld voor alle anaerobe species. Hierdoor is het ook noodzakelijk om Etesten op FAA-HB agar valideren voor de categorie 'overige anaeroben'.

Hoe/ waarom is men tot de vraagstelling gekomen? Wat is eventueel de huidige praktijk en waarom wordt die nu in vraag gesteld?

In 2017 werden in ons labo de Etesten geïntroduceerd op de Brucella agar voor de gevoeligheidsbepaling van anaeroben volgens de EUCAST richtlijnen. Voorheen werden Rosco Neo-Sensitabs gebruikt met interpretatie volgens CLSI criteria. Omdat op dat moment geen QC ranges van EUCAST beschikbaar waren voor anaerobe kiemen, werden de CLSI QC ranges gebruikt om op deze manier toch kwaliteit te waarborgen. Het ontbreken van specifieke richtlijnen over de methode voor gevoeligheidsbepaling van anaeroben en QC grenzen van EUCAST tot 2022, maakte het in het verleden moeilijk om volledig volgens EUCAST te werken. Dankzij de introductie van een EUCAST gestandaardiseerde disk diffusie methode voor anaeroben en de recente beschikbaarheid van commerciële FAA-HB bodems, zouden we in de praktijk volledig volgens EUCAST de gevoeligheidsbepaling van anaeroben moeten kunnen uitvoeren.

Bovendien waren we reeds op zoek naar een alternatief voor de huidige methode. De QC van anaerobe kiemen op Brucella agar met Etesten gebeurt tot op heden met *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) waarbij amoxicilline-clavulaanzuur, meropenem, clindamycine en metronidazole worden getest. Voor amoxicilline-clavulaanzuur en metronidazole faalt deze kwaliteitscontrole. De waargenomen MIC-waarden liggen hierbij vaak lager dan de QC grenzen, wat maakt dat het klinisch breekpunt van EUCAST mogelijks niet betrouwbaar gebruikt kan worden voor de interpretatie.

In UZ Leuven worden jaarlijks gemiddeld 466 gevoeligheidsbepalingen uitgevoerd voor anaerobe bacteriën (data 2020 tot 2023). Het gebruik van Etesten blijft een dure methode om een gevoeligheidsbepaling uit te voeren. Het is dus ook van belang om stil te staan bij de impact op de kostprijs van het uitvoeren van deze testen bij een transitie van methode.

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?

RELEVANTE EVIDENTIE/ REFERENTIES

EUCAST en CLSI hebben verschillende richtlijnen voor het uitvoeren van gevoeligheidsbepalingen van anaeroben. Waar EUCAST werkt met meer species specifiek breekpunten, maakt CLSI gebruik van één algemene tabel met MIC breekpunten voor alle anaerobe kiemen. Doordat CLSI geen disk diffusie aanbeveelt, ontbreken daar ook zonediameter breekpunten. Opvallend is dat de meeste EUCAST breekpunten voor anaerobe bacteriën lager liggen dan die van CLSI, wat resulteert in een striktere interpretatie van resistentie door EUCAST. Het verschil tussen beide richtlijnen leidt tot klinisch significante verschillen in resistentierapporteringen en vormt een belangrijke reden waarom resultaten van verschillende studies omtrent anaerobe gevoeligheidsbepaling vaak moeilijk rechtstreeks te vergelijken zijn (13,14).

Daarnaast zijn er gradiënt diffusie testen beschikbaar en antimicrobiële schijfjes om gevoeligheidsbepaling van anaeroben uit te voeren. De verschillen tussen deze methoden worden hieronder beschreven.

1. Richtlijnen EUCAST

EUCAST rapporteert klinische MIC-breekpunten voor anaeroben, bepaald met de agar dilutie methode en recenter ook een gestandaardiseerde methode om klinische breekpunten te kunnen interpreteren via de disk diffusie methode (9). EUCAST gebruikt voor zowel de MIC-bepaling als de disk diffusie methode de fastidious anaerobe agar met 5% mechanisch gedefibrineerd paarden bloed (FAA-HB). FAA-HB agar kreeg de voorkeur ten opzichte van Brucella agar doordat het over de hele lijn een zeer goede groei van anaeroben toonde door toevoeging van peptonen, die de groei verbeteren van bijvoorbeeld *Fusobacterium spp* (15). Brucella-agar leek aanvankelijk veelbelovend maar na grondigere analyse door EUCAST werd vastgesteld dat de onderlinge verschillen tussen producenten te groot waren, waardoor de reproduceerbaarheid en betrouwbaarheid in het gedrang kwamen. De FAA-HB agar platen worden gedroogd met het deksel verwijderd gedurende een volledige nacht op 20-25°C of op 35°C gedurende 15 minuten voor gebruik. Een suspensie van 1,0 McFarland wordt gebruikt met een incubatie periode van 18±2 uur in een anaerobe omgeving op 35-37°C. De zonediameter wordt afgelezen vanaf de bovenkant van de plaat, op de plaats waar geen groei meer zichtbaar is, met het deksel verwijderd en met gereflecteerd licht (9,11). Als kwaliteitscontrole (QC) raadt EUCAST aan om gebruik te maken van *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 en *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (11).

2. Richtlijnen CLSI

In de CLSI richtlijnen zijn enkel breekpunten op basis van MIC waarden opgenomen. De referentiemethode volgens CLSI betreft de agar dilutie (Wadsworth methode) en als alternatief de broth microdilutie methode voor *Bacteroides fragilis* en *Bacteroides thetaiotaomicron*. De agar dilutie methode is zeer geschikt voor surveillance en onderzoek, het wordt ook gezien als de standaard in vergelijking met andere methoden (16). Beide methoden maken gebruik van brucella agar of broth, bevattende 5 µg hemine en 1 µg/mL vitamine K1, gesupplementeerd met 5% schapebloed. Als inoculum wordt een suspensie gebruikt, equivalent met 0.5 McFarland. Voor de agar dilutie methode gaat dit over 10⁵ CFU/ spot en voor de broth microdilutie over 10⁶ CFU/ mL. De kiemen worden geïncubeerd in een anaeroob medium met 4-7% CO₂ op 36±1°C voor een tijdsspanne van 46-48u met de broth microdilutie methode en voor 42-48u met de agar dilutie methode. Als kwaliteitscontrole (QC) raadt CLSI aan om gebruik te maken van *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Clostridium difficile* ATCC 700057 en *Eggerthella lenta* ATCC 43055.

3. Richtlijnen producent Etesten (bioMérieux)

BioMérieux raadt aan om een gevoeligheidsbepaling uit te voeren op een Brucella agar, gesupplementeerd met 5% schapebloed, 5 µg hemine en 1 µg/mL vitamine K1, waarbij wordt verwezen naar CLSI. Er wordt een inoculum bereid van 1 McFarland in een Brucella broth of Mueller Hinton broth. Vervolgens worden de kiemen geïncubeerd voor 24-72u op een temperatuur van 35±2°C in een anaerobe omgeving. Voor de kwaliteitscontrole raadt bioMérieux aan om gebruik te maken van de stammen *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 en *Eubacterium lentum* ATCC 43055 en de CLSI QC rangs (10,17).

Tabel 1: Verschil in richtlijnen van gevoeligheidsbepalingen voor anaeroben volgens EUCAST en CLSI.

Richtlijnen: Gevoeligheids bepaling anaeroben	EUCAST: Agar dilutie	EUCAST: Disk diffusie	CLSI: Agar diluatie	CLSI: Broth microdilutie
Medium	FAA-HB		Brucella agar	
Inoculum	10 ⁵ CFU/spot	Suspensie 1.0 McFarland	Suspensie 0,5 McFarland	
Incubatie	Anaeroob (35-37°C), 42-48u	Anaeroob (35-37°C), 18± 2u	Anaeroob met 4-7% CO ₂ (35-37°C), 42- 48u	Anaeroob met 4-7% CO ₂ (35-38°C), 46- 48u.
Aflezings	MIC	zone diameter	MIC	
QC	ATCC <i>B. fragilis</i> en <i>C. perfringens</i>		ATCC <i>B. fragilis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>Clostridium difficile</i> en <i>Eggerthella lenta</i>	

BESPREKING**1. Vraag 1 Kan de disk diffusie methode volgens EUCAST uitgevoerd worden op commerciële FAA-HB bodem in UZ Leuven?**

Om dit te onderzoeken werd beslist om een marktonderzoek te doen naar beschikbare antibiotica paper disks en commerciële FAA bodems. Vervolgens werd een validatie uitgevoerd van deze beschikbare commerciële methoden op basis van de EUCAST kwaliteitscontrole stammen met een focus op juistheid en reproduceerbaarheid.

A. Marktonderzoek

Voor de gevoeligheidsbepaling van anaerobe bacteriën gebruiken we tot op heden Brucella agar gezien dit door bioMérieux, de producent van onze Etesten werd aangeraden. In de literatuur is er geen vergelijkende studie over commercieel beschikbare FAA bodems. Wel wordt in de EUCAST waarschuwingen vermeld dat de bodemdiepte van groot belang is. Deze moet namelijk 4 ± 0.5 mm zijn (18). Voor deze validatiestudie werden de bodems van Liofilchem, BioTrading en Thermo Scientific™ geëvalueerd.

- Liofilchem bodems werden gebruikt aangezien deze conform zijn aan de richtlijnen van EUCAST, wat ook staat vermeld in de technische fiche (19).
- De bodems van BioTrading werd gekozen doordat andere laboratoria in België goede resultaten bekomen met deze bodem. Echter voldoet deze bodem niet volledig aan de EUCAST richtlijnen. Zo wordt er 6% schapenbloed gebruikt in plaats van 5% paardenbloed en is de agardiepte niet strikt gereguleerd.
- De FAA-HB bodems van Thermo Scientific™ werden niet meegenomen in dit validatieproject doordat de diepte niet gereguleerd werd en hierdoor niet kunnen garanderen dat deze FAA-HB bodems voldoen aan de EUCAST richtlijnen. Ook hadden andere laboratoria in België minder goede resultaten bij het valideren van deze bodem (data NAC).

Momenteel bestaat er geen vergelijkende studie in de literatuur over de kwaliteit van antimicrobiële schijfjes op FAA-HB agar. Wel bestaan er vergelijkende studies op Mueller-Hinton (MH) agar met aerobe kiemen waar 9 producenten met elkaar worden vergeleken (20). Uit deze studie blijkt dat de beste producenten Oxoid, Mast en BD zijn. De keuze werd gemaakt om antimicrobiële schijfjes van Oxoid mee te nemen in de validatiestudie, samen met Bio-Rad doordat laboratoria in België goede resultaten bekomen met deze schijfjes. Schijfjes van de firma Rosco werden niet meegenomen in de vergelijkende studie. Dit doordat er geen beschikbaar schijfje van Rosco bestaat met metronidazole (5µg), wat de gebruikelijke concentratie is voor het testen van metronidazole bij anaeroben.

B. Validatie

- Selectie medium en antimicrobiële schijfjes:

FAA platen met 5% paardenbloed werden aangekocht bij Liofilchem, De platen werden bewaard bij 2-8°C, rekening houdende met de houdbaarheid van twee maanden. Daarnaast werden ook FAA-platen gebruikt van BioTrading. De bewaring van deze agar platen was ook conform de richtlijnen van de producent. Voor deze validatiestudie werden schijfjes van Oxoid en Bio-Rad gebruikt.

- Methode

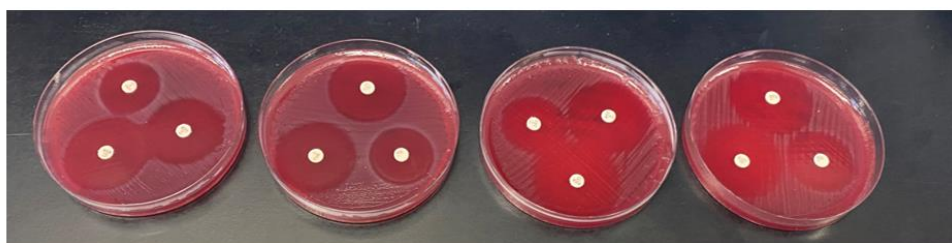
De antimicrobiële gevoeligheidsbepaling van anaerobe kiemen volgens EUCAST op FAA-HB is gevalideerd voor een incubatieperiode van 16-20u voor *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* en *Cutibacterium acnes*. Voor andere anaerobe kiemen of voor kiemen die langer moeten worden geïncubeerd dan 20u, kan dit niet gebruikt worden (21).

Voor gebruik werden de platen gedurende 15 minuten gedroogd bij 35°C met het deksel open om overtollig vocht te verwijderen. Vervolgens werd een suspensie gemaakt van 1 McFarland (0,9-1,1 McF) bereid van de QC stammen *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) en *Clostridium perfringens* (ATCC 13124). Met een steriele katoenen swab werd het inoculum gelijkmatig over het gehele oppervlakte van de plaat verdeeld, waarna 3 antimicrobiële schijfjes werden aangebracht. De platen werden geïncubeerd in een anaerobe omgeving bij 35°C-37°C gedurende 16-20u. Hierbij werd de 15-15-15-minuten regel toegepast waarbij de suspensie binnen 15 minuten gebruikt werd, schijfjes

binnen 15 minuten na inoculatie aangebracht werden en de platen binnen 15 minuten na het aanbrengen van de schijfjes geïncubeerd werden (22).

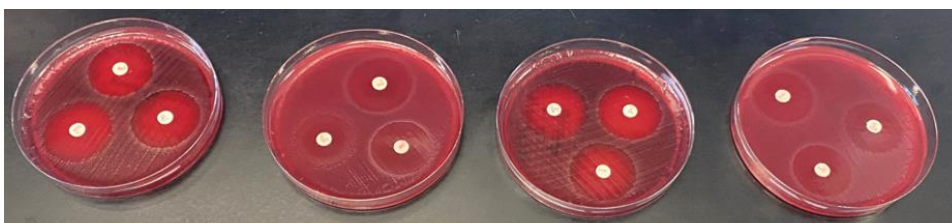
Omdat er in UZ Leuven momenteel geen gouden standaard methode wordt toegepast, worden de nieuwe methodes geëvalueerd op reproduceerbaarheid en juistheid. Hiervoor werd de gevoeligheidsbepaling vijf keer herhaald op FAA-HB platen, met gebruik van QC-stammen die de dag voordien waren overgeënt: driemaal op dag één, eenmaal op dag twee en eenmaal op dag drie.

De inhibitiezones konden eenvoudig worden afgelezen door het gereflecteerde licht (zie figuur 1 & 2). Toch was er duidelijk een verschil zichtbaar tussen de FAA bodem van Liofilchem en BioTrading. De zonediameters op de bodem van Liofilchem konden duidelijker worden geïnterpreteerd, de groei was beter en meer confluent. Op de bodem van BioTrading was er een fijnere en minder confluent groei zichtbaar. Dit bemoeilijkte de interpretatie van de zonediameters. Visueel kon er geen verschil gemaakt worden tussen de antimicrobiële schijfjes van Oxoid of Bio-Rad. De evaluatie van de zonediameters gebeurde volgens de EUCAST QC tables versie 15.0.



FAA-HB	Liofilchem		BioTrading	
Schijfjes	Oxoid	Bio-Rad	Oxoid	Bio-Rad
Kiem	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285			

Figuur 1: Inhibitiezone's na 16-20u incubatie van *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) op bodems van Liofilchem en BioTrading. Schijfjes werden gebruikt van Oxoid en Bio-Rad.



FAA-HB	BioTrading	Liofilchem	BioTrading	Liofilchem
Schijfjes	Bio-Rad		Oxoid	
Kiem	Clostridium perfringens ATCC 13124			

Figuur 2: Inhibitiezone's na 16-20u incubatie van *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) op bodems van Liofilchem en BioTrading. Schijfjes werden gebruikt van Oxoid en Bio-Rad.

C. Resultaten validatie disk diffusie methode

De resultaten per species en per antibioticum zijn te vinden in de bijlagen onderaan dit document. Hieronder is een samenvatting van de resultaten.

De combinatie van Oxoid-schijfjes met Liofilchem-bodems levert voor alle geteste antibiotica en kiemen consequent resultaten binnen de QC-grenzen op (aantal binnen range: 5/5), wat wijst op een betrouwbare en reproduceerbare gevoeligheidsbepaling. Deze combinatie toonde ook de kleinste afwijking ten opzichte van de target en kan in aanmerking komen voor de implementatie van de disk diffusie methode op FAA-HB agar.

Ook Bio-Rad met Liofilchem toont overwegend goede resultaten, al zijn er bij clindamycine en metronidazole voor *Clostridium perfringens* afwijkingen buiten het QC interval. Slechts 2 van de 5 resultaten voor clindamycine liggen binnen deze QC grenzen zoals ook voor 3 van de 5 resultaten voor metronidazole.

De BioTrading-bodems geven daarentegen opvallend vaker afwijkende resultaten. Voor *Bacteroides fragilis* valt geen enkel meetpunt binnen de QC-range voor het antibioticum metronidazole, ongeacht het gebruikte merk van de antimicrobiële schijfjes. Voor *Clostridium perfringens* liggen bij penicilline G, telkens slechts een beperkt aantal metingen binnen de QC-range. Geen enkele meting bevond zich binnen de QC grenzen voor clindamycine en metronidazole op de bodem van BioTrading. Op de bodem van BioTrading werden vaak te grote zonediameters gemeten.

Tabel 2: Overzicht van aantal metingen van kwaliteitscontrole stammen *Bacteroides fragilis* en *Clostridium perfringens*. met resultaat binnen de EUCAST QC ranges. Groen: alle resultaten binnen de QC ranges, oranje enkele resultaten binnen de QC ranges, rood: geen resultaten binnen de QC ranges. BTFR: *Bacteroides fragilis*. Antimicrobiële schijfjes: Oxoid en Bio-Rad; FAA bodems: Liofilchem en BioTrading.

Kiem	Antibioticum	Oxoid/ Liofilchem	Bio-Rad/ Liofilchem	Oxoid/ BioTrading	Bio-Rad/ Biotrading
BTFR	Amoxicilline/clavulaanzuur	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	Benzylpenicilline	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

Conclusie

De combinatie van antimicrobiële schijfjes van Oxoid met de FAA-HB bodem van Liofilchem voldeed consequent aan de kwaliteitscontrole van EUCAST voor alle geteste antibiotica bij beide QC-stammen. Deze combinatie lijkt geschikt voor het routinematig testen van antimicrobiële gevoeligheid bij anaerobe kiemen. De resterende combinaties, vooral met BioTrading-bodems, leiden systematisch tot grotere zone-diameters en regelmatige overschrijdingen van de QC-grenzen. Dit effect wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de mediumvariabiliteit en de agardiepte. Zorgvuldige aandacht voor mediumsamenstelling, agardiepte en inoculatietechniek zijn essentieel om reproduceerbare en betrouwbare resultaten te verkrijgen.

2. Vraag 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?

Voor anaerobe kiemen worden momenteel de MIC waarde aan de hand van E-test bepaald voor onderstaande antibiotica. Voor interpretatie wordt gebruik gemaakt van voornamelijk EUCAST breekpunten. Zie tabel 3.

Tabel 3: Klinische MIC breekpunten die momenteel in UZ Leuven worden gebruikt.

	Bacteroides spp.	Prevotella spp.	F. necrophorum	Clostridium spp. ²	C. acnes	Overige Gramnegatieven	Overige Grampositieven ³
Penicilline	/	S ≤ 0.5 R > 0.5	S ≤ 0.06 R > 0.06	S ≤ 0.5 R > 0.5	S ≤ 0.06 R > 0.06	/	S ≤ 0.5 ⁴ R > 0.5
Amoxiclav³	S ≤ 4 R > 4	S ≤ 4 R > 4	S ≤ 4 R > 4	/	/	S ≤ 4 ⁴ R > 4	/
Meropenem	S ≤ 1 R > 1	/	/	/	/	/	/
Clindamycine⁵	/	S ≤ 0.25 R > 0.25	S ≤ 0.25 R > 0.25	S ≤ 0.25 R > 0.25	S ≤ 0.25 R > 0.25	S ≤ 0.5 ⁴ R > 0.5	S ≤ 0.5 ⁴ R > 0.5
Metronidazole	S ≤ 4 R > 4	S ≤ 4 R > 4	S ≤ 0.5 R > 0.5	S ≤ 4 R > 4	/	S ≤ 4 ⁴ R > 4	S ≤ 4 ^{4*} R > 4
Rifampicine	/	/	/	/	S ≤ 0.06 R > 0.06 ¹	/	/

¹ Afgeleid van breekpunt rifampicine *Staphylococcus* species (EUCAST v12)

² In EUCAST v12 enkel breekpunten voor *Clostridium perfringens* ter beschikking, voor de overige *Clostridium* sp. gebruiken we ook de *C. perfringens* breekpunten

³ Breekpunten EUCAST v11

⁴ Antimicrobial susceptibility tests on groups of organisms or agents for which there are no EUCAST breakpoints. – Anaerobic bacteria.

⁵ Clindamycine E-test moet niet uitgevoerd worden bij hemoculturen.

* Bij Actinomyces, geen metronidazole inzetten, steeds 'R' rapporteren bij metronidazole

EUCAST heeft breekpunten voor de disk diffusie methode voor *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Cutibacterium acnes* en *Clostridium perfringens*. Voor de overige anaerobe gramnegatieven en grampositieven kan het EUCAST guidance document gebruikt worden 'When there are no breakpoints in breakpoint tables?'. Voor deze anaerobe bacteriën, wordt de gevoeligheid bepaald via een MIC bepaling waarna deze vergeleken kan worden met de opgegeven MIC waarde in de tabel. EUCAST adviseert hierbij niet om S-, I- of R-interpretatie te geven. In plaats daarvan wordt aangeraden om een commentaar toe te voegen om een therapie aan te bevelen of af te raden.

In UZ Leuven worden jaarlijks gemiddeld 466 gevoeligheidsbepalingen uitgevoerd voor anaerobe bacteriën. De disk diffusie methode kan toegepast worden op *Bacteroides spp.* (36%), *Clostridium perfringens* (8%), *Cutibacterium acnes* (22%), *Prevotella spp.* (2,5%) en *Fusobacterium necrophorum* (0,5%). Er werd beslist om alle *Clostridium spp.* te interpreteren volgens de disk diffusie breekpunten van *C. perfringens* aangezien deze MIC-breekpunten nauw bij de breekpunten van 'overige anaerobe kiemen' ligt voor de geteste antibiotica. Dit betekent dat 74% van de anaerobe gevoeligheidsbepalingen via de disk diffusie methode uitgevoerd kunnen worden in plaats van met Etesten.

Etesten zullen nog steeds noodzakelijk zijn voor de overige anaerobe bacteriën (21%), *Fusobacterium spp.*, non *Fusobacterium necrophorum* (2,3%) en *Cutibacterium spp.*, non *Cutibacterium acnes* (2%). Aangezien 26% van de uitgevoerde antibiogrammen bij anaeroben behoren tot de species zonder disk diffusie breekpunten, moet hiervoor een alternatief voorzien worden. Om die reden moeten we ook nog een MIC methode ter beschikking hebben in ons laboratorium. Om die reden wordt voor de MIC methode een gelijkaardige validatie gedaan wat betreft juistheid en reproduceerbaarheid als voor de disk diffusie.

Tabel 4: aantal anaerobe gevoeligheidsbepalingen per jaar uitgevoerd in UZ Leuven, onderverdeeld per klasse. G-: gramnegatieven; G+: grampositieven.

Gram	Micro-organisme	Procentueel (totaal)	Gemiddeld aantal jaarlijks
	Alle anaeroben	100%	466
G-	<i>Bacteroides sp.</i>	36%	167
	<i>B. fragilis</i>	23%	109
	<i>Niet-fragilis</i>	12%	57
	<i>Prevotella spp.</i>	2.5%	12
	<i>Fusobacterium sp.</i>	2,8%	13
	<i>F. necrophorum</i>	0,5%	3
G+	<i>Clostridium sp.</i>	13%	63
	<i>C. perfringens</i>	8%	38
	<i>Niet perfringens en difficile</i>	5%	24
	<i>Clostridium difficile</i>	0,1%	1
	<i>Cutibacterium sp.</i>	24%	111
	<i>C. acnes</i>	22%	102
Overig totaal		21%	99
Overige G+		17%	81
	<i>Actinomyces</i>	7,5%	35
	<i>Finegoldia Magna</i>	1.2%	6
	<i>Parvimonas micra</i>	1.9%	9
	<i>Nocardia spp.</i>	1.5%	7
Overige G-		3,7%	17
	<i>Veillonella spp.</i>	0.8%	4
	<i>Leptotrichia trevisanii</i>	0.2%	1

- Validatie Etesten

Conform de evaluatie van juistheid en reproduceerbaarheid werden ook voor de MIC waarden criteria opgesteld om binnen de QC ranges van de kwaliteitscontrole stammen te liggen. Hierbij werden er ook vijf metingen uitgevoerd. Echter kon maar één enkele meting meegenomen worden in de analyse voor *Clostridium perfringens* door technische probleem. Zoals bij de disk diffusie methode, werden de FAA-HB platen voor gebruik gedurende 15 minuten gedroogd bij 35°C met het deksel open. Vervolgens werd een suspensie gemaakt van 1 McFarland (0,9-

1,1 McF). Met een steriele katoenen swab werd het inoculum gelijkmatig over het gehele oppervlakte van de plaat verdeeld, waarna 2 Etesten per plaat werden aangebracht in tegengestelde richting. De platen werden geïncubeerd in een anaerobe omgeving bij 35°C-37°C gedurende 42-48u. Hierbij werd ook de 15-15-15-minuten regel gerespecteerd waarbij de suspensie binnen 15 minuten gebruikt werd, Etesten binnen 15 minuten na inoculatie aangebracht werden en de platen binnen 15 minuten na het aanbrengen van de Etesten geïncubeerd werden (22).

De metingen van bioMérieux Etesten op de FAA-HB bodem van Liofilchem leveren de beste resultaten. Een eenmalige QC overtreding bij *Bacteroides fragilis* voor amoxicilline/ clavulaanzuur (1 dilutie buiten de QC-range) werd waargenomen. Metronidazole bij *Clostridium perfringens* toonde een MIC van 0.5 mg/mL wat onder de QC range (1-4 mg/ mL) valt gesteld door EUCAST. Er zullen nog vier extra gevoeligheidsbepalingen gebeuren in de toekomst om een betrouwbare en reproduceerbare gevoeligheidsbepaling te garanderen.

De FAA bodem van BioTrading toonde minder goede resultaten. Er werd niet in geslaagd om binnen de QC grenzen te blijven van EUCAST voor amoxicilline en metronidazole bij *Bacteroides fragilis*. Voor metronidazole bij *Clostridium perfringens* werd een MIC waarde bekomen van 0.25 mg/mL, wat onder de QC range (1-4 mg/ mL) valt gesteld door EUCAST. Doordat de metingen van de disk diffusie methode ook niet binnen de QC grenzen lag, werd er besloten om geen extra gevoeligheidsbepalingen meer uit te voeren op de bodem van BioTrading voor *Clostridium perfringens*.

Tabel 5: Overzicht van de MIC QC resultaten voor *Bacteroides fragilis* en *Clostridium perfringens*. Groen: alle resultaten binnen de QC ranges, oranje enkele resultaten binnen de QC ranges, rood: geen enkel resultaat binnen QC ranges. BTFR: *Bacteroides fragilis*; CLPE: *Clostridium perfringens*. Etesten: bioMérieux; bodems: Liofilchem en BioTrading.

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

Etesten blijven nog een belangrijke methode aangezien voor 26% van de geïsoleerde anaerobe kiemen waarvan een gevoeligheidsbepaling wordt uitgevoerd, geen MIC-breekpunten beschikbaar zijn.

Aangezien de resultaten op de FAA-HB bodem van Liofilchem met de Etesten van bioMérieux meestal binnen de QC grenzen liggen, kan deze combinatie mits een volledige validatie in aanmerking komen als een betrouwbare manier om de gevoeligheid van anaeroben te bepalen gebruik makende van de EUCAST breekpunten.

In tabel 6 worden de breekpunten die in de routine gebruikt kunnen worden opgelijst. De breekpunten in onderstaande tabel werden dan ook aangepast van de EUCAST MIC-breekpunten naar de EUCAST disk diffusie-breekpunten. De overige gramnegatieve/ grampositieve breekpunten werden overgenomen van het document 'When there are no breakpoints in breakpoint tables?'.

Omdat voor *Cutibacterium acnes* geen officiële EUCAST- of CLSI-breekpunten voor rifampicine bestaan, worden in verschillende studies teruggevallen op de breekpunten die gedefinieerd zijn voor *Staphylococcus aureus*. Vilanueva-Martinez et al. (2022) beschrijven hierbij expliciet: 'Breakpoints for levofloxacin, linezolid and rifampicin have not been determined regarding anaerobic Gram-positive bacteria; therefore, *Staphylococcus aureus* breakpoints were used.'. Hoewel farmacokinetische en farmacodynamische data specifiek voor *C. acnes* beperkt zijn, wordt deze extrapolatie algemeen aanvaard in de literatuur zolang er geen specifieke breekpunten voor *C. acnes* volgens EUCAST richtlijn beschikbaar zijn. Hierbij werd in het verleden al gebruik gemaakt van het breekpunt van *Staphylococcus aureus*. Ten opzichte van de huidige werkwijze zal er niets veranderen. Rifampicine voor *C. acnes* zal nog steeds met een E-test gemeten worden waarvan het MIC breekpunt wordt gebruikt van *Staphylococcus aureus*, penicilline en clindamycine zullen wel met de diskdiffusie methode bepaald worden voor *C. acnes* (23,24).

De waarden van tabel 6 werden overgenomen van de EUCAST breekpunten (11,25).

Tabel 6: Klinische zonediameter breekpunten (mm) en MIC breekpunten (mg/L) die in UZ Leuven gebruikt kunnen worden. Afgeleid van EUCAST v 15.0

	Bacteroides spp. (disk diffusie)	Prevotella spp. (disk diffusie)	F. necrophorum (disk diffusie)	Clostridium spp. ³ (disk diffusie)	C. acnes (disk diffusie)	Overige Gramnegatieven (Etesten)	Overige Grampositieven ³ (Etesten)
Penicilline	/	S ≥ 20 ¹ R < 20 ¹	S ≥ 25 ¹ R < 25 ¹	S ≥ 15 ¹ R < 15 ¹	S ≥ 24 ¹ R < 24 ¹	/	S ≤ 0.5 R > 0.5
Amoxiclav³	S ≥ 14 R < 14	S ≥ 24 ¹ R < 24 ¹	S ≥ 23 ¹ R < 23 ¹	/	/	S ≤ 0.5 R > 0.5	/
Meropenem	S ≥ 28 R < 28	/	/	/	/	/	/
Clindamycine⁴	/	S ≥ 31 ² R < 31 ²	S ≥ 30 ² R < 30 ²	S ≥ 19 ² R < 19 ²	S ≥ 26 ² R < 26 ²	S ≤ 0.5 R > 0.5	S ≤ 0.5 R > 0.5
Metronidazole	S ≥ 25 R < 25	S ≥ 22 R < 22	S ≥ 30 R < 30	S ≥ 16 R < 16	/	S ≤ 4 R > 4	S ≤ 4 [*] R > 4
Rifampicine	/	/	/	/	S ≤ 0,06 R > 0,06	/	/

¹ Isolates susceptible to benzylpenicillin can be reported susceptible to all beta-lactam agents with breakpoints (including those with Note) without further testing. Isolates resistant to benzylpenicillin should be tested for susceptibility to individual agents.

² Examine zones carefully for colonies within zones. Colonies should be taken into account when reading.

³ In EUCAST v15 enkel breekpunten voor Clostridium perfringens ter beschikking, voor de overige Clostridium sp. gebruiken we ook de C. perfringens breekpunten

⁴ Clindamycine moet niet getest worden bij hemoculturen.

⁵ Afgeleid van breekpunt rifampicine Staphylococcus aureus (EUCAST v15)

* Bij Actinomyces, geen metronidazole inzetten, steeds 'R' rapporteren bij metronidazole

In de toekomst is het wenselijk om de implementatievalidatie verder uit te breiden met het testen van anaerobe isolaten met gekende gevoeligheid en/ of te participeren in een EKE programma/ringtest voor anaeroben.

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

Om deze vraag te beantwoorden, is het belangrijk om te weten hoeveel gevoeligheidsbepalingen via de disk diffusie methode zullen gebeuren en hoeveel gevoeligheidsbepalingen met Etesten.

- Disk diffusie methode:

74% van de gevoeligheidsbepalingen, wat ongeveer neerkomt op 345 gevoeligheidsbepalingen per jaar, zullen via de disk diffusie methode bepaald worden. Hierbij worden maximaal 4 antimicrobiële schijfjes (0,18 euro per schijfje) per gevoeligheidsbepaling gebruik, wat ervoor zorgt dat er telkens maar 1 FAA-HB bodem (1,86 euro) nodig is voor één gevoeligheidsbepaling. Deze totale kostprijs komt neer op 840 euro per jaar.

- Etesten:

26%, wat neerkomt op 121 gevoeligheidsbepalingen per jaar, zullen nog steeds met Etesten bepaald worden waarvan de kostprijs varieert tussen 5 euro en 9 euro per E-test. Er zijn 2 FAA-HB bodems nodig per gevoeligheidsbepaling wat de totale kostprijs op ongeveer 3000 euro brengt.

De huidige werkwijze maakt gebruik van Brucella agar (1,08 euro/stuk, in house gemaakt). Voor elke gevoeligheidsbepalingen zijn 2 Brucella agarplaten nodig. Dit brengt de totale kostprijs van de huidige werkwijze voor de gevoeligheidsbepaling van anaerobe kiemen op ongeveer 11760 euro per jaar.

- Verschil huidige werkwijze en toekomstige werkwijze

Indien overgeschakeld wordt naar een disk diffusie methode, kan de totale kostprijs voor de anaerobe gevoeligheidsbepaling worden teruggebracht tot ongeveer 3840 euro per jaar. Dit betekent een potentiële jaarlijkse besparing van gemiddeld 7920 euro ten opzichte van de huidige werkwijze. Dit is een geschatte reductie van de kostprijs van 67% ten opzichte van de huidige werkwijze.

REFERENTIES

1. Noor A, Khetarpal S. Anaerobic Infections. StatPearls [Internet]. 2025 [cited 2025 May 2]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29493974/>
2. Sood A, Ray P, Angrup A. Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: In routine and research. Anaerobe [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2025 May 2];75:102559. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996422000476>
3. Reissier S, Penven M, Guérin F, Cattoir V. Recent Trends in Antimicrobial Resistance among Anaerobic Clinical Isolates. Microorganisms [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2025 Aug 12];11(6):1474. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10302625/>
4. Cooley L, Teng J. Anaerobic resistance: should we be worried? Curr Opin Infect Dis [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2025 Aug 12];32(6):523–30. Available from: https://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/fulltext/2019/12000/anaerobic_resistance__should_we_be_worried_.2.aspx
5. Nagy E, Urbán E. Antimicrobial susceptibility of Bacteroides fragilis group isolates in Europe: 20 years of experience. Clinical Microbiology and Infection [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2025 Sep 3];17(3):371–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14638702?via%3Dihub>
6. Alauzet C, Lozniewski A, Marchandin H. Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review. Anaerobe [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2025 Sep 2];55:40–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996418301768>
7. He W, Jiang K, Qiu H, Liao L, Wang S. 16-membered ring macrolides and erythromycin induce ermB expression by different mechanisms. BMC Microbiol [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Aug 14];22(1):1–13. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-022-02565-3>
8. Kulczycka-Mierzejewska K, Sadlej J, Trylska J. Molecular dynamics simulations suggest why the A2058G mutation in 23S RNA results in bacterial resistance against clindamycin. J Mol Model [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2025 Aug 14];24(8):1–12. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00894-018-3689-5>
9. Bavelaar H, Justesen US, Morris TE, Anderson B, Copsey-Mawer S, Stubhaug TT, et al. Development of a EUCAST disk diffusion method for the susceptibility testing of rapidly growing anaerobic bacteria using Fastidious Anaerobe Agar (FAA): a development study using Bacteroides species. Clinical Microbiology and Infection [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2025 May 2];27(11):1695.e1-1695.e6. Available from: <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showFullText?pii=S1198743X21001634>
10. - E. BIOMÉRIEUX ETEST® APPLICATION GUIDE (EAG) AEROBES ORGANISM SPECIFIC PHENOTYPE MEDIA 6).
11. eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics [Internet]. [cited 2025 May 2]. Available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
12. EUCAST guidance on When there are no breakpoints in breakpoint tables? 2024;
13. Cobo F, Sadyrbaeva-Dolgova S, Navarro-Marí JM. Different breakpoints interpretation yielded distinct resistance rates to moxifloxacin of clinically significant anaerobic bacteria. Anaerobe [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Aug 29];72:102471. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996421001542>
14. Pence MA. Antimicrobial Resistance in Clinically Important Anaerobes. Clin Microbiol Newsl [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Aug 29];41(1):1–7. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439918301223?utm_source=chatgpt.com
15. Bavelaar H, Justesen US, Morris TE, Anderson B, Copsey-Mawer S, Stubhaug TT, et al. Development of a EUCAST disk diffusion method for the susceptibility testing of rapidly growing anaerobic bacteria using Fastidious Anaerobe Agar (FAA): a development study using Bacteroides species. Clinical Microbiology and Infection [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2025 May 3];27(11):1695.e1-1695.e6. Available from: <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showFullText?pii=S1198743X21001634>
16. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. [cited 2025 May 3]; Available from: www.clsi.org.
17. EM100 Connect - CLSI M100 ED35:2025 [Internet]. [cited 2025 Aug 29]. Available from: <https://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED35:2025&sbssok=CLSI+M100+ED35%3a2025+TABLE+5D&format=HTML#CLSI%20M100%20ED35:2025%20TABLE%205D>
18. eucast: FAA medium for disk diffusion of anaerobe bacteria [Internet]. [cited 2025 Jun 10]. Available from: https://www.eucast.org/eucast_news/news_singleview?tx_ttnews%5Btt_news%5D=516&cHash=805567e1643d2ac39d8f3dbc507535fb
19. Product details [Internet]. [cited 2025 May 14]. Available from: https://www.liofilchem.com/products/liofilchem-products/product-details.html?classe_cat=001&codice=10062&type=01
20. Åhman J, Matuschek E, Kahlmeter G. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers—EUCAST evaluations in 2014 and 2017. Clinical Microbiology and Infection [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2025 Jul

29];25(3):346–52.

Available

from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X18304567?via%3Dihub>

21. Disk diffusion anaerobic bacteria Version EUCAST disk diffusion methodology for selected rapidly growing anaerobic bacteria* on Fastidious Anaerobe Agar with defibrinated horse blood (FAA-HB).
22. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. 2025 [cited 2025 Jul 30]; Available from: www.eucast.org
23. Salar-Vidal L, Aguilera-Correa JJ, Brüggemann H, Achermann Y, Esteban J. Microbiological Characterization of Cutibacterium acnes Strains Isolated from Prosthetic Joint Infections. Antibiotics [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 Aug 29];11(9):1260. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9495218/>
24. Salar-Vidal L, Aguilera-Correa JJ, Brüggemann H, Achermann Y, Esteban J. Microbiological Characterization of Cutibacterium acnes Strains Isolated from Prosthetic Joint Infections. Antibiotics [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 Aug 29];11(9):1260. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9495218/>
25. EUCAST guidance on When there are no breakpoints in breakpoint tables? 2024;

- COMMENTS

To do/ACTIONS

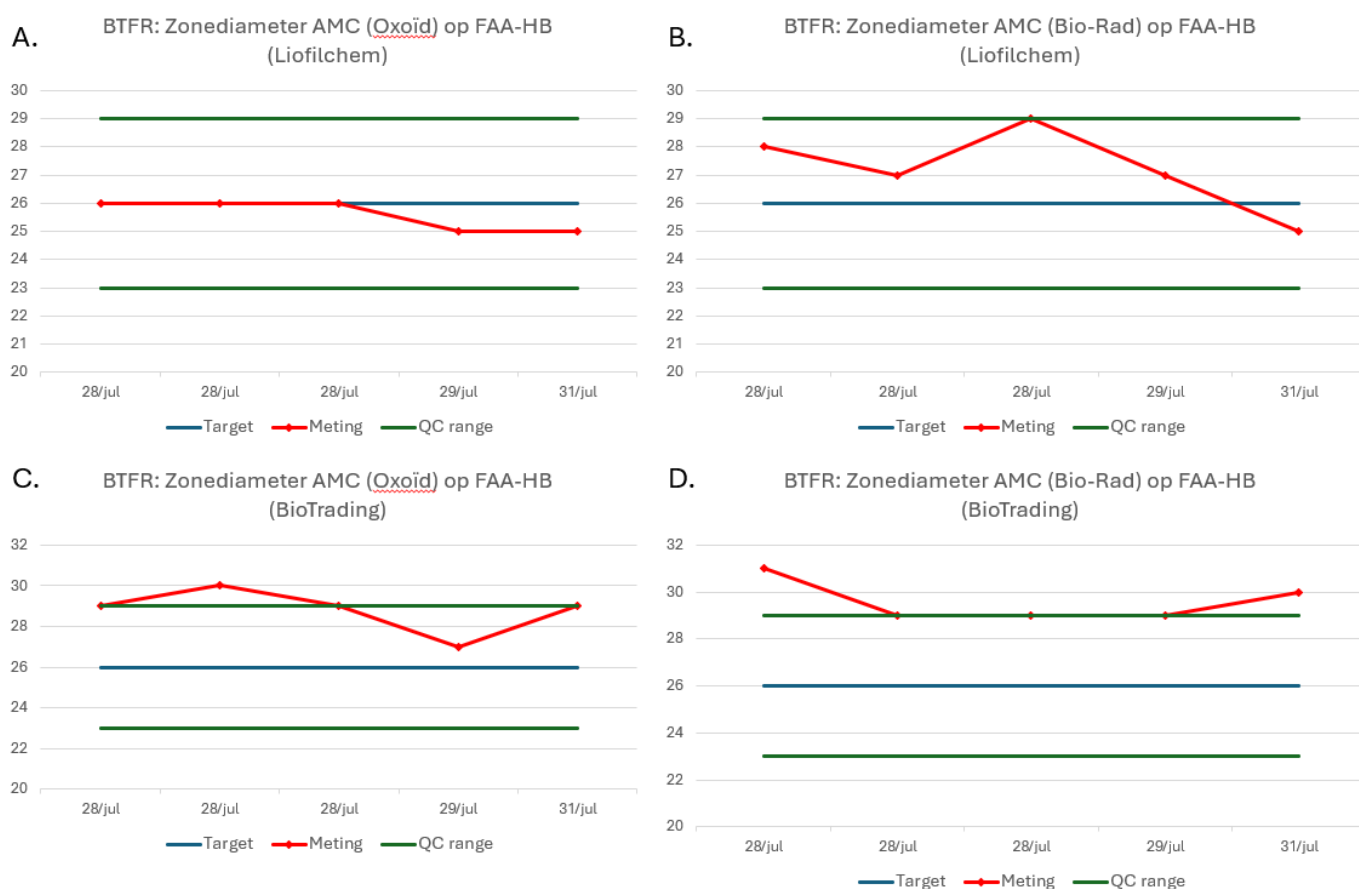
1. In de toekomst zal een volledige validatie plaatsvinden van Etesten op FAA-HB agar van Liofilchem, zodat er met zekerheid Etest op FAA-HB 'volgens EUCAST' kan uitgevoerd worden.
2. Procedures en SOP's zullen herschreven worden zodat er volledig overgeschakeld kan worden naar de anaerobe antimicrobiële gevoeligheidsbepaling op FAA-HB agar, zoals EUCAST aanhaalt.
3. Tegen einde september 2025 zal ons labo van UZ Leuven hopelijk kunnen overschakelen naar deze nieuwe gevoeligheidsbepaling mits een goede validatie van Etesten op FAA-HB agar.

ATTACHMENTS

Attachment I

1. *Bacteroides fragilis*: amoxicilline-clavulaanzuur

BTFR: Zonediameter amoxicilline-clavulaanzuur op FAA-HB					
	28/jul	28/jul	28/jul	29/jul	31/jul
Target	26	26	26	26	26
QC range	23-29	23-29	23-29	23-29	23-29
Oxoid/ Liofilchem	26	26	26	25	25
Bio-Rad/ Liofilche	28	27	29	27	25
Oxoid/ BioTrading	29	30	29	27	29
Bio-Rad/ BioTrading	31	29	29	29	30



Figuur 3 - Gevoeligheidsbepaling van *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 voor amoxicilline-clavulaanzuur via de EUCAST disk diffusie methode op FAA-HB-agar. Vijf metingen van de zone-diameter werden uitgevoerd voor elk van de volgende combinaties van medium en antimicrobiële schijfjes: **A.** FAA van Liofilchem met Oxoid-schijfjes. **B.** FAA van Liofilchem met Bio-Rad-schijfjes. **C.** FAA van BioTrading met Oxoid-schijfjes. **D.** FAA van BioTrading met Bio-Rad-schijfjes.

Afkortingen: BTFR, *Bacteroides fragilis*; FAA-HB, Fastidious Anaerobe Agar; AMC, amoxicilline-clavulaanzuur.

Attachment 2

2. *Bacteroides fragilis*: meropenem

BTFR: Zonediameter meropenem op FAA-HB					
	28/jul	28/jul	28/jul	29/jul	31/jul
Target	35-36	35-36	35-36	35-36	35-36
QC range	32-39	32-39	32-39	32-39	32-39
Meting (Oxoid/ Liofilchem)	36	35	35	34	34
Meting (Bio-Rad/ Liofilchem)	36	34	35	34	33
Meting (Oxoid/ BioTrading)	39	38	38	39	38
Meting (Bio-Rad/ BioTrading)	38	38	39	37	38



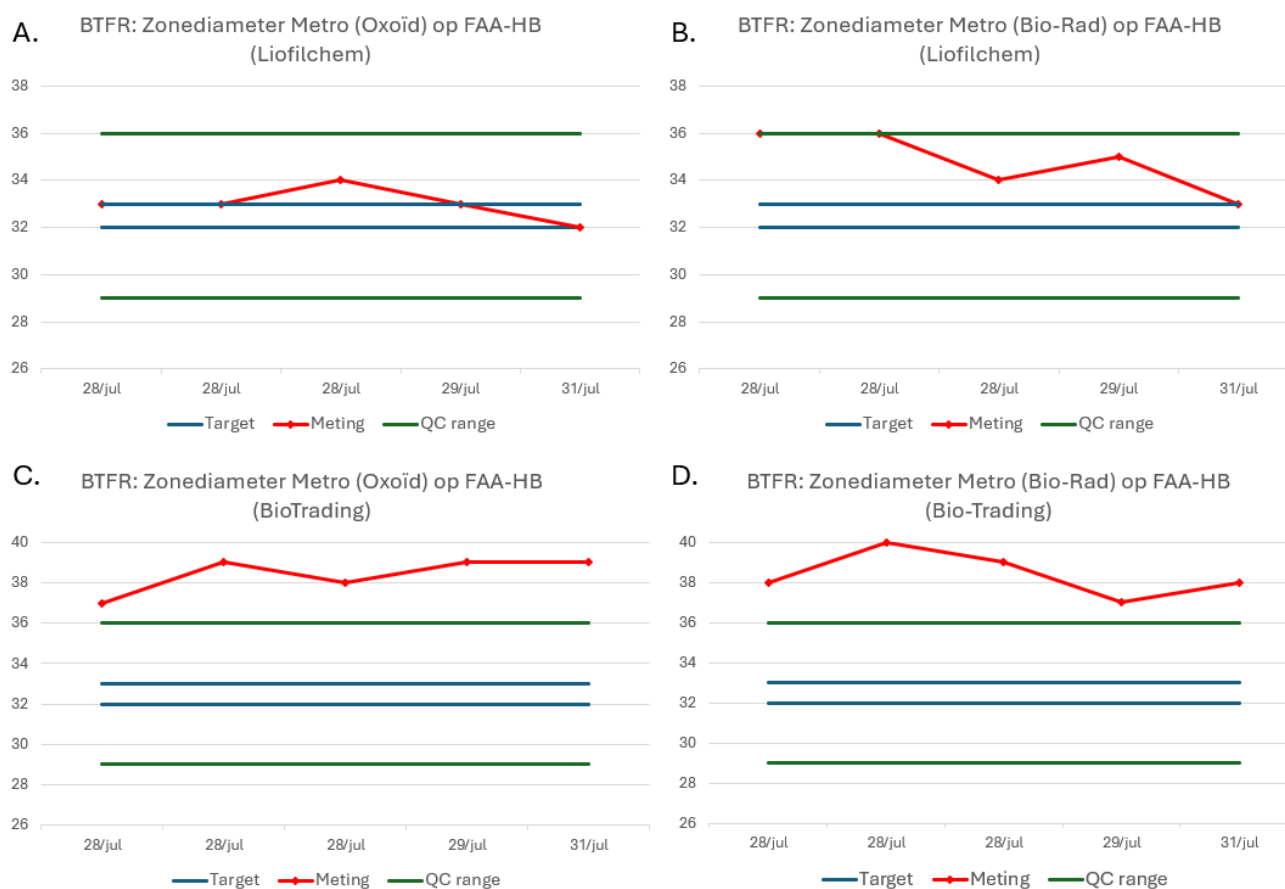
Figuur 4 - Gevoeligheidsbepaling van *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 voor meropenem via de EUCAST disk diffusie methode op FAA-HB-agar. Vijf metingen van de zone-diameter werden uitgevoerd voor elk van de volgende combinaties van medium en antimicrobiële schijfjes: **A.** FAA van Liofilchem met Oxoid-schijfjes. **B.** FAA van Liofilchem met Bio-Rad-schijfjes. **C.** FAA van BioTrading met Oxoid-schijfjes. **D.** FAA van BioTrading met Bio-Rad-schijfjes.

Afkorting: BTFR, *Bacteroides fragilis*; FAA-HB, Fastidious Anaerobe Agar; Mero, meropenem.

Attachment 3

3. *Bacteroides fragilis*: metronidazole

BTFR: Zonediameter metronidazole op FAA-HB					
	28/jul	28/jul	28/jul	29/jul	31/jul
Target	32-33	32-33	32-33	32-33	32-33
QC range	29-36	29-36	29-36	29-36	29-36
Meting (Oxoid/Liofilchem)	33	33	34	33	32
Meting (Bio-Rad/ Liofilchem)	36	36	34	35	33
Meting (Oxoid/ BioTrading)	37	39	38	39	39
Meting (Bio-Rad/ BioTrading)	38	40	39	37	38



Figuur 5 - Gevoeligheidsbepaling van *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 voor metronidazole via de EUCAST disk diffusie methode op FAA-HB-agar. Vijf metingen van de zone-diameter werden uitgevoerd voor elk van de volgende combinaties van medium en antimicrobiële schijfjes: **A.** FAA van Liofilchem met Oxoid-schijfjes. **B.** FAA van Liofilchem met Bio-Rad-schijfjes. **C.** FAA van BioTrading met Oxoid-schijfjes. **D.** FAA van BioTrading met Bio-Rad-schijfjes.

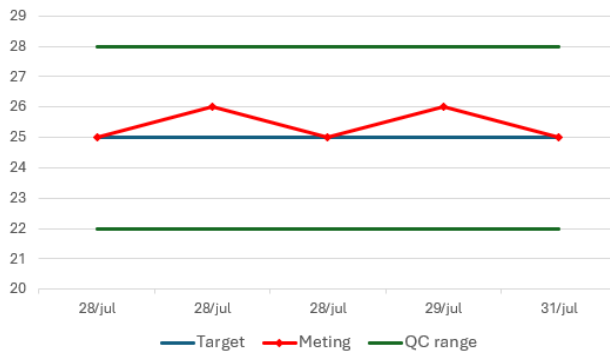
Afkorting: BTFR, *Bacteroides fragilis*; FAA-HB, Fastidious Anaerobe Agar; Metro, metronidazole.

Attachment 4

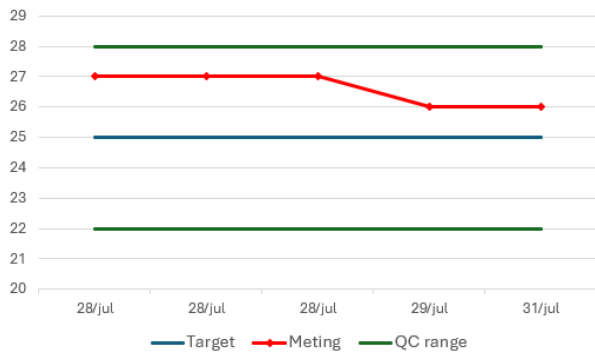
4. *Clostridium perfringens*: Penicilline G

CLPE: Zonediameter Penicilline G op FAA-HB					
	28/jul	28/jul	28/jul	29/jul	31/jul
Target	25	25	25	25	25
QC range	22-28	22-28	22-28	22-28	22-28
Meting (Oxoid/ Liofilchem)	25	26	25	26	25
Meting (Bio-Rad/ Liofilchem)	27	27	27	26	26
Meting (Oxoid/ BioTrading)	28	28	29	29	28
Meting (Bio-Rad/ BioTrading)	30	29	29	28	29

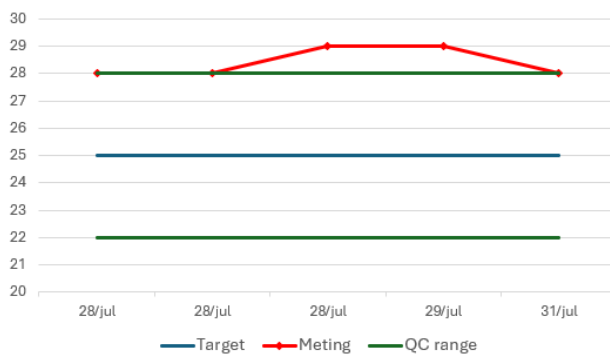
A. CLPE: Zonediameter benzylpenicilline (Oxoid) op FAA-HB (Liofilchem)



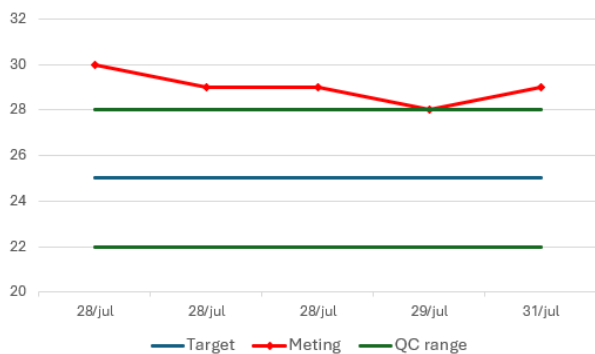
B. CLPE: Zonediameter Peni (Bio-Rad) op FAA-HB (Liofilchem)



C. CLPE: Zonediameter Peni (Oxoid) op FAA-HB (BioTrading)



D. CLPE: Zonediameter Peni (Bio-Rad) op FAA-HB (BioTrading)



Figuur 6 - Gevoeligheidsbepaling van *Clostridium perfringens* ATCC 13124 voor penicilline G via de EUCAST disk diffusie methode op FAA-HB-agar. Vijf metingen van de zone-diameter werden uitgevoerd voor elk van de volgende combinaties van medium en antimicrobiële schijfjes: A. FAA van Liofilchem met Oxoid-schijfjes. B. FAA van Liofilchem met Bio-Rad-schijfjes. C. FAA van BioTrading met Oxoid-schijfjes. D. FAA van BioTrading met Bio-Rad-schijfjes.

Afkortingen: CLPE, *Clostridium perfringens*; FAA-HB, Fastidious Anaerobe Agar; Peni, Penicilline G.

Attachment 5

5. *Clostridium perfringens*: clindamycine

CLPE: Zonediameter clindamycine op FAA-HB					
	28/jul	28/jul	28/jul	29/jul	31/jul
Target	23	23	23	23	23
QC range	20-26	20-26	20-26	20-26	20-26
Meting (Oxoid/ Liofilchem)	26	25	24	25	25
Meting (Bio-Rad/ Liofilchem)	27	26	27	25	27
Meting (Oxoid/ BioTrading)	28	29	28	28	27
Meting (Bio-Rad/ BioTrading)	29	29	28	29	28



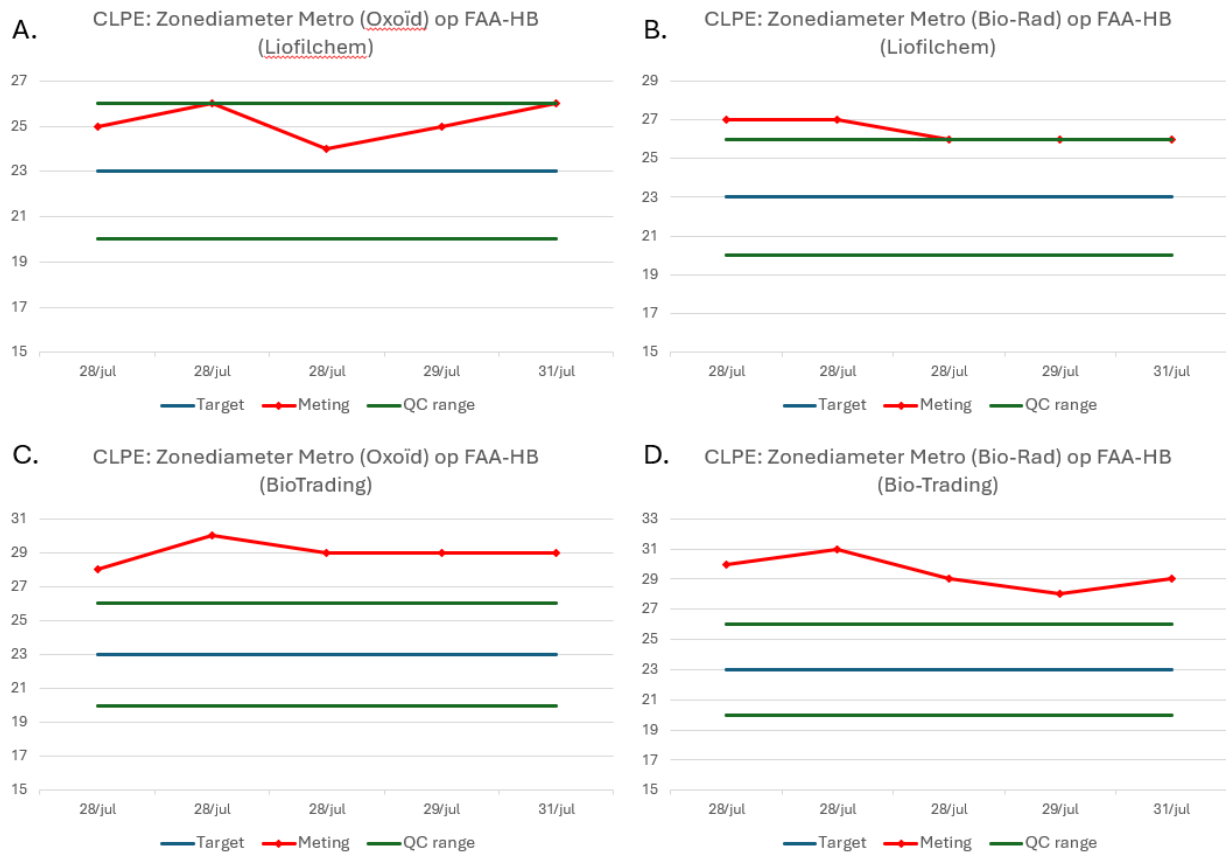
Figuur 7 - Gevoeligheidsbepaling van *Clostridium perfringens* ATCC 13124 voor clindamycine via de EUCAST disk diffusie methode op FAA-HB-agar. Vijf metingen van de zone-diameter werden uitgevoerd voor elk van de volgende combinaties van medium en antimicrobiële schijfjes: **A.** FAA van Liofilchem met Oxoid-schijfjes. **B.** FAA van Liofilchem met Bio-Rad-schijfjes. **C.** FAA van BioTrading met Oxoid-schijfjes. **D.** FAA van BioTrading met Bio-Rad-schijfjes.

Afkortingen: CLPE, *Clostridium perfringens*; FAA-HB, Fastidious Anaerobe Agar; Clinda, Clindamycine.

Attachment 6

6. *Clostridium perfringens*: metronidazole

CLPE: Zonediameter metronidazole op FAA-HB					
	28/jul	28/jul	28/jul	29/jul	31/jul
Target	23	23	23	23	23
QC range	20-26	20-26	20-26	20-26	20-26
Meting (Oxoid/ Liofilchem)	25	26	24	25	26
Meting (Bio-Rad/ Liofilchem)	27	27	26	26	26
Meting (Oxoid/ BioTrading)	28	30	29	29	29
Meting (Oxoid/ Biotrading)	30	31	29	28	29



Figuur 8 - Gevoeligheidsbepaling van *Clostridium perfringens* ATCC 13124 voor metronidazole via de EUCAST disk diffusie methode op FAA-HB-agar. Vijf metingen van de zone-diameter werden uitgevoerd voor elk van de volgende combinaties van medium en antimicrobiële schijfjes: **A.** FAA van Liofilchem met Oxoid-schijfjes. **B.** FAA van Liofilchem met Bio-Rad-schijfjes. **C.** FAA van BioTrading met Oxoid-schijfjes. **D.** FAA van BioTrading met Bio-Rad-schijfjes.

Afkortingen: : CLPE, *Clostridium perfringens*; FAA-HB, Fastidious Anaerobe Agar; Metro, Metronidazole.