



JÖNKÖPING UNIVERSITY  
*School of Health and Welfare*

# Utvärdering av direktresistensmetod på urinodlingar gentemot EUCAST diskdiffusionsmetod

**HUVUDOMRÅDE:** *Biomedicinsk laboratorievetenskap*

**FÖRFATTARE:** *Jelena Andersson*

**HANDLEDARE:** *Caroline Bylfors, Jessica Björklund*

**EXAMINATOR:** *Sandra Karlsson*

**JÖNKÖPING** 2019 Maj

## Sammanfattning

Urinvägsinfektioner är den näst vanligaste anledningen till antibiotikaförskrivning i Sverige. För diagnos av UVI i urinkultur med standardmetoden krävs 18 - 48 timmar och ytterligare 24 timmar i odling tills resultaten för antimikrobiell känslighetstestning är tillgängliga. Direktresistensmetoden ger svar 24 timmar tidigare än standardmetoden. Studiens syfte var att utvärdera direktresistensmetoden (in-housemetod) från mikrobiologiska laboratoriet Unilabs, Skövde på urinodlingar från patientprover och jämföra den med EUCAST-diskdiffusionsmetod. I denna studie användes 334 bakteriestammar från urinodlingar; *E. coli* (n=211) *E. faecalis* (n=45), *Klebsiella spp* (n=37), *P. mirabilis* (n= 17) och övriga gramnegativa bakteriestammar (n=24). Direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetod har utförts parallellt på alla bakteriestammar och sex olika antibiotikatyper testades. Hämningszonernas diameter lästes av och placerades i rätt S, I, R kategori för respektive antibiotikum. Från sammanlagt 1674 testade antibiotikalappar hittades 23 avvikelser där *E. coli* representerade 13 av dessa. Mecillinam var det antibiotikum där flest avvikelser noterades, totalt tio stycken. Överensstämmelsen mellan de två metoderna var 98,6% från 1674 testade antibiotikalappar. Direktresistensmetoden leder till att patienten få ett svar 24 timmar tidigare än med EUCAST diskdiffusionsmetoden där svaret inkluderar även resistensbestämning.

Nyckelord: urinvägsinfektion, *E. coli*, mecillinam, very major errors, antibiotikaresistens.

## Summary

### **Evaluation of direct resistance method on urine cultures in relation to EUCAST disc diffusion method**

Urinary tract infections are the second most common reason for prescription of antibiotics in Sweden. Diagnosis of UTIs in urine culture by the standard method requires 18 to 48 hours and an additional 24 hours until antimicrobial testing is available. The direct resistance method provides answers 24 hours earlier than the standard method. The aim of the study was to evaluate the direct resistance method (in-house method) from the microbiological laboratory Unilabs, Skövde on urine cultures from patient samples and compare it with the EUCAST disc diffusion method. For this study, 334 bacterial strains from urinary cultures were used; *E. coli* (n = 211) *E. faecalis* (n = 45), *Klebsiella spp* (n = 37), *P. mirabilis* (n = 17) and other gram-negative rods (n = 24). The direct resistance method and the EUCAST disk diffusion method were performed in parallel on all bacterial strains and six different types of antibiotics were tested. The diameter of the inhibition zones was measured and categorized according to S, I, R for each antibiotic. From a total of 1674 tested antibiotics 23 discrepancies were found where *E. coli* represented 13 of these. Mecillinam was the antibiotic where most discrepancies were noted, a total of ten. The agreement between the two methods was 98,6% from 1674 tested antibiotics. The direct resistance method allows a response to the patient 24 hours earlier than the EUCAST disc diffusion method.

Keywords: urinary tract infections, *E. coli*, mecillinam, very major errors, antibiotic resistance.

## Innehållsförteckning

<b>Inledning</b> .....	<b>1</b>
<b>Bakgrund</b> .....	<b>2</b>
Klassifikation enligt patogener och urinvägspatogener .....	2
Odling av bakterier i urinen .....	2
Resistens och resistensbestämningsmetoder för urinvägspatogener .....	3
Diskdiffusionsmetoden .....	3
EUCAST diskdiffusionsmetod .....	3
Mätning av zonernas diameter och känslighetskategorier .....	3
Direktresistensmetod .....	4
Metodjämförelse diskdiffusion och direktresistens .....	4
Minor errors (mE), Major errors (ME), Very major errors (VME) .....	4
<b>Syfte</b> .....	<b>6</b>
<b>Material och metod</b> .....	<b>7</b>
Studiedesign .....	7
Direktresistensmetod .....	7
EUCAST diskdiffusionsmetod .....	7
Avläsning .....	8
Datainsamling och databearbetning .....	8
Etiska överväganden.....	8
<b>Resultat</b> .....	<b>10</b>
<b>Diskussion</b> .....	<b>14</b>
Överensstämmelse mellan direktresistensmetod och EUCAST diskdiffusionsmetod .....	14
Fördelar och nackdelar med direktresistensmetoden .....	15
<b>Slutsatser</b> .....	<b>17</b>
<b>Ett tack till</b> .....	<b>18</b>
<b>Referenser:</b> .....	<b>19</b>

## Inledning

Termen urinvägsinfektion (UVI) omfattar infektioner som drabbar urinvägarna (njuror, urinledare, urinblåsa och urinrör) (1). Urinvägsinfektioner är den näst vanligaste anledningen till antibiotikaförskrivning i Sverige. Behandling av urinvägsinfektioner inom primärvården sker vanligtvis utan tidigare bakterieodling och resistensbestämning, därför finns ett stort behov av uppföljning av utvecklingen av resistensen (2).

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) diskdiffusionsmetod används idag som standardmetod (3) vilken baseras på principerna definierade i rapporten av International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing, 1972 (4). I direktresistensmetoden (in-housemetod från Unilabs, Skövde) används urin som inokulat istället för uppodlade kolonier. Detta icke-standardiserade inokulat är en utav anledningarna varför denna metod inte rekommenderas från EUCAST (5).

För diagnos av UVI i urinkultur med standardmetoden krävs 18 - 48 timmar för att kunna identifiera de patogena mikroorganismerna och ytterligare 24 timmar tills resultaten för antimikrobiell känslighetstestning är tillgängliga (3). Den ökande antimikrobiella resistensen påvisar behov av direktresistensmetoden, som möjliggör snabbare tillgång till resultat med 24 timmar tidigare, samt möjlighet till korrekt antibiotikabehandling för patienten (6).

Enligt mikrobiologiska laboratoriet Unilabs, Skövde, hanterades 65 000 urinprover under 2018, vilket motsvarar ca 1250 urinprover per vecka. Dessa mängder innebär en stor arbetsbelastning för personalen och genom användning av direktresistensmetoden förhindras dubbelarbete och tid sparas. Denna metod utvärderades senast år 2012 när metoden introducerades. Den ökade resistensutvecklingen bidrar till kravet för säkerställning av metoden.

## Bakgrund

Urinvägsinfektioner beror på bakterietillväxt i urinen (bakteriuri). Hos patienter med UVI görs klassifikation av infektionstypen för att kunna optimera behandling, diagnostik, utredning samt uppföljning i enstaka fall (1). Urinvägsinfektioner delas in i okomplicerade och komplicerade. Okomplicerade UVI påverkar särskilt individer som vanligtvis är friska och saknar strukturella eller neurologiska urinvägsavvikelser. Dessa infektioner definieras som nedre UVI (cystit) och övre UVI (pyelonefrit), där njurarna är drabbade i det sistnämnda. Komplicerade UVI definieras som UVI som är förknippade med faktorer som komprometterar urinvägarna eller värdförsvaret inklusive urinobstruktion, urinretention orsakad av neurologisk sjukdom, immunosuppression, njursvikt, njurtransplantation, graviditet och förekomst av främmande kropp som till exempel kvarliggande katetrar (1,7).

Urinvägsinfektionerna hos pojkar är vanligast under deras första halvår av livet och är ovanliga efter det första året, medan det hos flickor är vanligt med urinvägsinfektioner efter det första halvåret. Under en livstid har nästan hälften av alla kvinnor fått urinvägsinfektion. Vanligast är det hos unga kvinnor och med stigande ålder minskar risken för urinvägsinfektioner, men ökar igen hos äldre kvinnor. Förekomsten av urinvägsinfektioner är sällsynta hos män under 60 år men är vanligare efter 60 år. Hos män förekommer dessutom bakteriella infektioner som omfattar prostata (8).

## Klassifikation enligt patogenes och urinvägspatogener

Beroende på urinvägsisolatets potential att framkalla infektion samt graden av relevans delas de in i fyra olika grupper. Bakteriearter som har "potential att framkalla urinvägsinfektion" hos patienter med normala urinvägar är primärpatogena arter. I denna grupp ingår *E. coli* (>10%) och *S. saprophyticus* (1–10%). Som sekundärpatogena förekommer bakteriearter som vanligtvis inte ingår i slidans och urinrörets normalflora. De förekommer vanligtvis vid vårdrelaterade urinvägsinfektioner hos vuxna och vid sällsynta fall hos patienter med normala urinvägar orsakar de förstagångs – UVI. Vanliga bakteriearter i denna grupp är *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp*, *Morganella morganii*, och *Enterococcus spp*. I gruppen av "tveksamt patogena arter" förekommer hudflorabakterier samt bakteriearter som ibland och i samband med sjukhusvård koloniserar patienter och kan vara orsak till vårdrelaterade UVI. I denna grupp ingår koagulasnegativa stafylokokker (KNS) som ibland orsakar UVI och grupp B streptokocker (GBS). I sista gruppen ingår arter som är en del av den normala urogenitalfloran som kontaminerar tappade- och kastade urinprov. Denna grupp är införd för att förminska risken till överdiagnostik (9).

## Odling av bakterier i urinen

Urinodling utförs för att identifiera bakterietillväxt. Mittstråleurinprov odlas på tillväxtmedium som sedan inkuberas i ett till två dygn. Om det finns bakterier i urinen så kommer synliga kolonier att växa. Bakteriearten kan oftast identifieras genom identifiering av kolonimorfologin (10).

Referensmetodiken för laboratediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier, omfattar tre olika nivåer av kvantitativ urinodling. 1) Kvantitativ urinodling – jämförelsenivå (Nivå 3), anledning till att utföra denna typ av odling är kliniska fynd, till exempel leukocyter i urin (U-LPK) som är tecken på inflammation, nitriter i urin (U- nitrit) som indikerar närvaro av bakterier i urinen som har enzym som omvandlar nitrat till nitrit, remissuppgifter, blåspunktionsprov som visar UVI men urinodling har varit negativ. Som substrat för odling används Cystein-Lactose-Electrolyt-Deficient (CLED) agar, blodagar och hematinagar (11,12). 2) Nivå två fastställts som hög rutinnivå som används mycket i rutinen och vilket innefattar blodagar plus ett differentierande medium som en del av denna odlingsmetod. Substrat som ingår i denna nivå är CLED- agar och blodagar (13). 3) Nivå ett beaktas som låg rutinnivå eller screening och lägsta koncentrationen som kan besvaras med denna metod är  $10^7$  CFU/L ( $10^4$  CFU/mL), substrat som används är CLED – agar (14). Idag används kromogena substrat som ett alternativ till CLED – agar. Genom att använda kromogena substrat kan differentieras och åskådliggöras mikroorganismen i fråga i tydliga kolonifärger och hjälper till att urskilja mikroorganismerna i en blandflora. Användning av blodagar i kombination med kromogena substrat ger likvärdigt diagnostiskt resultat som kombinationen av blod och CLED – agar (15).

Blodagar används som odlingsmedium för isolering av aeroba, fakultativt anaeroba mikroorganismer och olika gramnegativa stavar (16). Mueller Hinton (MH) är det enda kommersiella mediet för resistensbestämning av bakterier som rekommenderas från EUCAST (3).

## Resistens och resistensbestämningsmetoder för urinvägspatogener

Bakterier har egenskaperna att förvärva och uttrycka resistens mot antimikrobiella medel som vanligtvis används för att behandla infektioner. Efter att en organism isoleras på laboratoriet karakteriseras den med test som inkluderar detektion av antimikrobiella resistenser. Förutom att identifiera organismen så är den antimikrobiella känslighetsprofilen nyckelkomponent när det gäller patientens vård. Proceduren som används för att framställa antimikrobiella känslighetsprofiler och detektera resistens mot terapeutiska medel benämns som antimikrobiell känslighetstestningsmetod (17).

Det viktigaste målet för antimikrobiell känslighetstestning är att identifiera om ett bakterieisolat har egenskaperna för att uttrycka resistens mot antimikrobiella medel utvalda för behandling. Metoder som direkt detekterar antimikrobiell aktivitet medför antimikrobiella ämnen av intresse och infekterande bakterier tillsammans *in vitro* för att bestämma läkemedlets effekt på bakteriens tillväxt och livskraft. Graden av påverkan på bakteriens tillväxt läses av och organismens resistens eller känslighet mot varje medel rapporteras. Konventionella känslighetstestningsmetoder som används för direkt avläsning av antimikrobiella aktiviteter är buljongspädning, agarspädning och diskdiffusionsmetoden (17).

### *Diskdiffusionsmetoden*

Antibiotikalappar som innehåller en känd koncentration av antimikrobiella medel placeras på ytan av en nyligen inokulerad agarplatta. Medlet börjar omedelbart diffundera i agarn och etablerar en koncentrationsgradient runt antibiotikalapparna. Den högsta koncentrationen är närmast antibiotikalappen. Vid inkubation sker bakteriell tillväxt på plattan förutom där antibiotikakoncentrationen i gradienten runt varje antibiotikalapp är tillräckligt högt för att inhibera bakteriell tillväxt. Efter inkubation, mäts diametern av inhiberingszonen i millimeter runt varje antibiotikalapp (17). Diskdiffusionsmetoden används i rutinen och är den mest använda metoden när det gäller resistensbestämning av de flesta bakteriella patogener (18).

### EUCAST diskdiffusionsmetod

EUCAST diskdiffusionsmetod är standardiserad enligt principerna som står i rapporten från International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing 1972 (4). Zonbrytpunkter i EUCAST diskdiffusionsmetod är överensstämmande med European Minimum Inhibitory Concentration (MIC) -brytpunkter och tillgängliga för alla från EUCAST websida. För att kunna producera pålitliga resultat måste den standardiserade metodens teknik följas utan modifieringar (3). Detta innebär att bakteriesuspensionen ska användas inom 15 minuter efter förberedelse. Rumstempererade antibiotikalappar ska appliceras inom 15 minuter efter inokulation på agarplattans yta och agarplattorna ska inkuberas inom 15 minuter efter antibiotikalapparna applicerats på agarytan. Det är viktigt att följa dessa regler eftersom diffusionen av antimikrobiella medel sker väldigt fort efter applicering av antibiotikalapparna på agarplattans yta och därför är det viktigt att de inte ska flyttas efter placering. En annan konsekvens som kan uppkomma om reglerna inte följs är om inokulerade agarplattor lämnas i rumstemperatur en längre tidsperiod innan antibiotikalapparna appliceras, då organismen kommer att börja växa. Detta kommer att resultera i felaktig minskning av inhiberingszonernas diameter (3).

### Mätning av zonernas diameter och känslighetskategorier

Enligt EUCAST ska hämningszonernas diameter läsas till närmaste millimeter med en linjal eller skjutmått. Plattorna ska hållas 30 cm från ögat och agarplattor utan tillsats ska läsas mot svart bakgrund från plattans botten med reflekterad ljus (3). Zonerna bedöms enligt S (susceptible), I (intermediate) och R(resistant). S – känsligt, standarddosering innebär att mikroorganismen kategoriseras som ”känsligt, standarddosering” när det finns stor sannolikhet för terapeutisk framgång genom användning normaldosering av medlet. I – känslig, ökad exponering. En mikroorganism kategoriseras som ”känslig, ökad exponering” när det finns stor sannolikhet av terapeutisk framgång eftersom exponeringen för medlet ökar genom justering av dosering eller genom koncentrationen vid infektions stället. R – resistent. En mikroorganism kategoriseras som resistent när det finns stor sannolikhet till utebliven

terapeutisk framgång även när det finns ökad exponering. Exponering är en funktion av hur administrerings sättet, dosen, doseringsintervall, infusionstiden samt fördelning och utsöndring av det antimikrobiella medlet kommer att påverka mikroorganismen vid infektionsstället (19).

## Direktresistensmetod

Med direktresistensmetoden kan blod, men vanligtvis urin användas som källa för inokulatet. Fördelen med direktresistensmetoden är att resultaten kan vara tillgängliga 24 timmar tidigare (6), än när organismen är isolerad i renkultur före testning. Detta resulterar i en direkt förmån för patienten när det gäller tidig och anpassad antibiotikabehandling. En annan fördel med direktresistensmetoden är förmånen att begränsa behandlingsspektrat i ett tidigt skede (5). Med denna metod identifieras känsligheten mot antibiotika för hela provet snarare än enstaka bakteriekolonier vilket möjliggör en bedömning av populationens känslighet mot antibiotika (20).

Den största nackdelen med metoden är att inokulatet inte kan kontrolleras på ett effektivt sätt. Blandkultur och pH-varianter eller ämnen kan finnas i proverna som kan påverka resultatet (till exempel antimikrobiella medel i urin). Dessa typer av problem kommer att vara orsak till mindre tillförlitliga resultat jämfört med resultat från rena kulturer där endast en bakterieart förekommer. Enligt EUCAST måste alla laboratorier som använder denna metod ta ansvar för att resultaten är tillförlitliga (5).

## Metodjämförelse diskdiffusion och direktresistens

Många studier gjorda på urinodling där diskdiffusionsmetoden jämförs med direktresistensmetoden visar övergripande överensstämmelse med över 90% (20,21, 22, 23, 24, 25). I två utav dessa studier var det *E. coli* som uppvisade flest avvikelser och nitrofurantoin det antibiotikum med flest avvikelser (21, 22). Det som var intressant i några utav studierna var att direktresistensmetoden ger pålitliga resultat utförda på urin men vid blandkultur blev antalet avvikelser mycket högre (21, 23, 24).

I en studie utförd på blododling där direktresistensmetoden jämförs med standardmetoden visas en överensstämmelse på 98,3 % mellan de två metoderna. Som mest avvikande isolat presenteras *S. epidermidis*, och penicillin som antibiotikum som visade mest avvikande resultat (26). I en annan studie var överensstämmelsen mellan de två metoderna 98% hos Enterobacteriaceae isolat (27).

Direktresistensmetoden rekommenderas inte från American Society for Microbiology (ASM), EUCAST eller British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) på grund av det icke standardiserade inokulatet som används. Enligt ASM kan direktresistensen från positiva blododlingar och urin accepteras under specifika förhållanden. För det första måste en mikroskopisk undersökning visa en monomikrobiell infektion, för det andra behöver bekräftande resistenstest upprepas när organismen befinner sig i renkultur. Sedan behöver laboratorerna validera sin metod mot standardmetoden och resultatet från direktresistensen ska läsas av en erfaren mikrobiolog. BSAC accepterar direktresistensmetoden på många laboratorier och föreslår att ett korrekt inokulat för urin kan uppnås genom att använda en steril 10 µL platinös och genom att placera en droppe buljong i 5 ml sterilt vatten. De rekommenderar också att testet ska upprepas om det finns blandkultur eller icke tät växt (20).

### *Minor errors (mE), Major errors (ME), Very major errors (VME)*

Skilnader i känslighetskategorisering av enskilda isolat i upprepade eller i motsvarande antibiotikakänslighetstest kan beskrivas som avvikelser. Denna kategori innefattar avvikelser där falsk kategorisering förekommer till följd av felaktig tolkning av antibiotikakänslighetstestets resultat vilka i sin tur får terapeutiska konsekvenser. Avvikelse som resulterar i oregelbunden tilldelning av bakteriella isolat till intilliggande tolkningskategorier kallas för minor errors (mE) vilket resulterar i begränsade terapeutiska konsekvenser (28). Felaktig kategorisering av sanna - känsliga isolat som resistentas kallas för major errors (ME) vilket leder till onödiga begränsning av terapeutiska alternativ som kan beröva patienten framgångsrik terapi. Very major errors (VME), innebär kategorisering av sanna - resistentas isolat som känsliga och ger upphov till absolut allvarligaste kliniska konsekvensen då är högst sannolikhet för terapeutiskt misslyckande (Tabell 2) (28).



Tabell 2: Korrekt och avvikande känslighetskategorisering av S (susceptible), I (intermediate), R (resistant) som resulterar i very major errors, major errors och minor errors.

	<b>Korrekt kategorisering</b>	<b>Avvikande kategorisering</b>
<b>Very major errors (VME)</b>	R	S
<b>Major errors (ME)</b>	S	R
<b>Minor errors (mE)</b>	S	I
	I	S
	I	R
	R	I

## Syfte

Studiens syfte var att utvärdera direktresistensmetoden på Unilabs, Skövde på urinodlingar från patientprover och jämföra gentemot EUCASTs diskdiffusionsmetod.

## Material och metod

### Studiedesign

I denna studie användes 334 bakteriestammar från urinodlingar; *E. coli* (n=211) *E. faecalis* (n=45), *Klebsiella* spp (n=37), *P. mirabilis* (n= 17) och övriga gramnegativa stavar (n=24). Studien utfördes på det mikrobiologiska laboratoriet Unilabs, Skövde. Urinproverna från patienter odlades och parallellt med det utfördes en direktresistensbestämning. På urinodlingar utförda med direktresistensmetoden där provsvaret är utlämnad till beställare samt utan växt av blandkultur utfördes EUCAST diskdiffusionsmetod. Innan EUCAST diskdiffusionsmetod utfördes, lästes hämningszonernas diameter av runt antibiotikalapparna som utförts med direktresistensmetoden. Avläsning av hämningszonernas diameter utfördes också på antibiotikalapparna utförda med EUCAST diskdiffusionsmetod.

Kontroller utfördes varje morgon enligt laboratoriets rutiner. *E. coli* ATCC 25922 och *E. faecalis* ATCC 29212 som är känsliga mot Amoxicillin -klavulansyra, Cefadroxil, Ciprofloxacin, Nitrofurantoin, Trimetoprim användes. Det är dagliga resistenskontroller som visade bland annat antibiotikans effektivitet, att substratet som användes uppfyllde kravet och om inkubatorn hade rätt temperatur.

### Direktresistensmetod

Direktresistensmetoden utfördes med hjälp av odlingsroboten Walk-Away Specimen Processor (WASP)(Copan, Italien). Urinproverna från patienterna odlades på en blod/UVI agarplatta där den ena delen bestod av blodagar (Becton Dickinson, Sverige) och andra delen bestod av kromagar (Oxoid, England). På varje agar odlades 10 µL urin och agarplattorna användes för identifiering av bakteriearter samt eventuella blandkulturer. På en MH (Mueller Hinton) -agarplatta som användes för resistensbestämning, odlades 20 µL urin i två olika riktningar och därefter placerades antibiotikalapparna på agarytan med hjälp av antibiotikaapplikator. Följande antibiotika (Oxoid, England) applicerades på samtliga direktresistenser; Amoxicillin/Klavulansyra 30 µg (AMC), Cefadroxil 30 µg (CFR), Ciprofloxacin 5 µg (CIP), Mecillinam 10 µg (MEL), Nitrofurantoin 100 µg (F), Trimetoprim 5 µg (W). Plattorna inkuberades i 35 ± 1°C i 14–21 timmar och efteråt lästes hämningszonernas diameter av.

### EUCAST diskdiffusionsmetod

Isolerade kolonier från blod/ UVI-agarplattan som var inkuberade i 16 - 20 timmar i 36 °C ± 1° användes för förberedelse av bakteriesuspensionen. Kolonierna blandades i 0,85% (w/v) NaCl till en grumlighet motsvarande 0,5 McFarland. Suspensionen användes inom 15 minuter efter förberedning.

Inokulatet applicerades på rumstempererade MH-agarplattor. För gramnegativa bakterier trycktes överflödigt vätska bort mot insidan av röret. På inokulerade agarplattor applicerades respektive antibiotikalappar med hjälp av applikator inom 15 minuter efter inokulering (Tabell 2).

Tabell 2: Antibiotikalappar som användes i studien vid diskdiffusion enligt EUCAST på respektive agens

Agens	Antibiotikalapp och antibiotikastyrka
<i>E. coli</i>	Amoxicillin/Klavulansyra 30 µg Cefadroxil 30 µg Ciprofloxacin 5 µg Mecillinam 10 µg Nitrofurantoin 100 µg Trimetoprim 5 µg
<i>E. faecalis</i>	Amoxicillin/Klavulansyra 30 µg Ampicillin 2 µg Trimetoprim 5 µg Nitrofurantoin 100 µg
<i>Klebsiella spp</i> , <i>Proteus spp</i>	Amoxicillin/Klavulansyra 30 µg, Cefadroxil 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Mecillinam 10 µg Trimetoprim 5 µg
Övriga gramnegativa bakteriestammar	Trimetoprim 5 µg Ciprofloxacin 5 µg

Agarplattorna inkuberades inom 15 minuter efter att antibiotikalapparna placerats på MH-agarplattans yta. Plattorna inkuberades i 16 – 20 timmar i 36 °C ± 1°.

#### Avläsning

Hämmningszonerna mättes på alla plattorna med jämn och tät växt, med skjutmått från baksidan av MH-agarplatta och mot en svart bakgrund. Hämningszonernas diameter avrundades till närmsta millimeter.

#### Datinsamling och databearbetning

Data bearbetades för amoxicillin/klavulansyra, cefadroxil, mecillinam för *E. coli*, *Klebsiella spp*, *P. mirabilis* (n=795), ciprofloxacin för *E. coli*, *Klebsiella spp*, *P. mirabilis* och övriga gramnegativa bakteriestammar (n=289), nitrofurantoin för *E. coli* samt *E. faecalis* (n=256) och trimetoprim för *E. coli*, *E. faecalis*, *Klebsiella spp*, *P. mirabilis* och övriga gramnegativa stammar (n=334). Från alla slutsvarade resistensbestämningar utförda med direktresistensmetoden lästes hämningszonernas diameter av runt varje antibiotikalapp. Samma gjordes med resistensbestämningar utförda med EUCAST diskdiffusionsmetod. Data bearbetades med Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA USA) för varje bakteriestam samt respektive antibiotika. De blev sedan kategoriserade för varje avläst hämningszon från båda resistensbestämningsmetoder i respektive S, I, R kategori.

## Etiska överväganden

För denna studie användes bakteriestammar från urinodlingar som utfördes från patientprover. Biobankslagen är inte tillämplig på prover som inte sparas i en längre period (29). Urinen från patienterna sparas i en vecka medans urinodlingarna förstörs (kasseras) inom ett till två dagar det vill säga så fort patienten har fått ett resultat.

Agarplattor med bakteriestammarna var avidentifierade och ingen koppling till patienten kunde göras. Patienternas provresultat påverkades inte eftersom bakteriestammarna som användes för avläsning och resistensbestämning med EUCAST diskdiffusions metoden redan var slutsvarade från legitimerade biomedicinska analytiker. Tystnadsplikt gällde samt etisk egengranskning enligt Hälsohögskolans anvisningar genomfördes.

## Resultat

Direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden utfördes på 334 bakteriestammar från urinodlingar; *E. coli* (n=211), *E. faecalis* (n=45), *P. mirabilis* (n=17), *Klebsiella spp* (n=37) och övriga gramnegativa bakteriestammar (n=24). Data erhållen från direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden bearbetades bara för antibiotika för bakteriestam med befintliga brytpunkter. För ampicillin/klavulansyra och *E. faecalis* finns inga befintliga brytpunkter (30). För direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden utförd på 334 urinodlingar erhöles 1674 antibiotikum - bakterieisolatkombinationer. Resultatet från båda metoderna visade en övergripande överensstämmelse på 98,6% (1651/1674) av fallen. Resten visade minor errors i 0,4% (1667/1674), major errors 0,7 % (1663/1674) och very major errors i 0,3 % (1669/1674) av fallen.

Från totalt 23 avvikelser från 1674 test, fem som VME, elva som ME och sju som mE. Utifrån de sex olika antibiotika som användes för metoderna hade mecillinam antibiotikumet med mest avvikelser (totalt tio), följt av trimetoprim med sex avvikelser, amoxicillin/klavulansyra med tre avvikelser, ciprofloxacin med tre avvikelser, nitrofurantoin med en avvikelse och cefadroxil som antibiotikumet som inte visade några avvikelser (Tabell 3).

**Tabell 3:** Kategorisk överensstämmelse mellan direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden från urinprover i antal bakteriestammar klassificerade som VME, ME och mE. *E. coli* visas inom parantes. Antibiotika utan I-kategori redovisas ej (-).

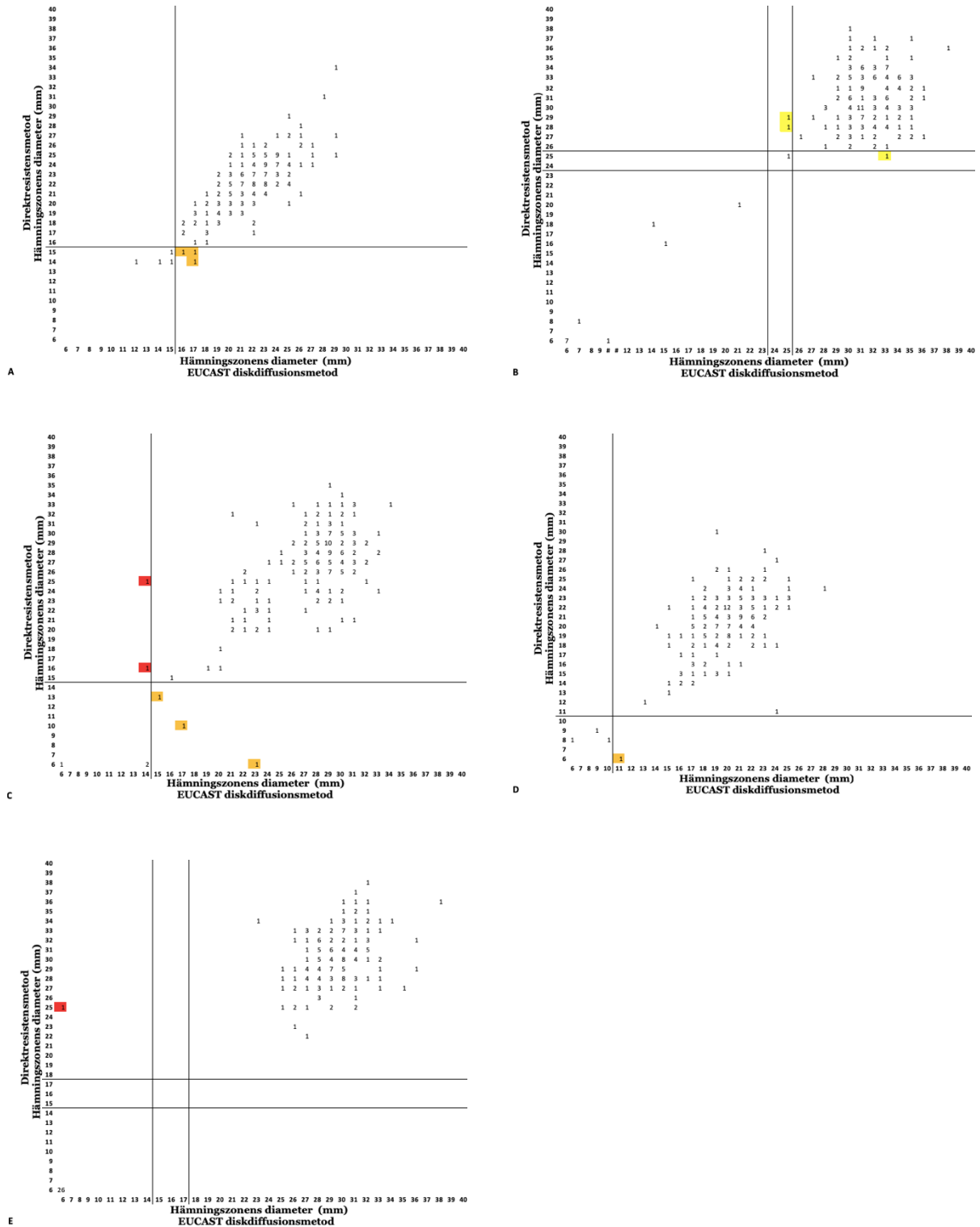
Antibiotika	Very major errors (VME)	Major errors (ME)	Minor errors (mE)	Antal bakteriestammar
Amoxicillin/Klavulansyra	0 (0)	0 (3)	-	265 (211)
Cefadroxil	0(0)	0(0)	-	265 (211)
Ciprofloxacin	0 (0)	0 (0)	0 (3)	289 (211)
Mecillinam	1 (2)	4 (3)	-	265 (211)
Nitrofurantoin	0 (0)	0 (1)	-	256 (211)
Trimetoprim	1 (1)	0 (0)	4 (0)	334 (211)

För *E. coli* kunde 1% avvikelser av de totalt 1266 testade antibiotikalappar observeras, från *E. faecalis* observerades 1% avvikelser från 90 antibiotikalappar, 6% avvikelser från 85 testade antibiotikalappar observerades från *P. mirabilis*, från *Klebsiella spp* observerades 1,6% avvikelser från 185 testade antibiotika och från de övriga gramnegativa bakteriestammarna observerades 2% avvikelse från 48 testade antibiotikalappar.

Från 23 identifierade avvikelser var 13 med *E. coli* där tre var VME, sju ME och tre mE. Amoxicillin/klavulansyra visade tre ME, ciprofloxacin tre mE, mecillinam med fem totala avvikelser där tre identifierades som mE och två som VME, nitrofurantoin hade en ME och slutligen trimetoprim med en VME (Figur 1).

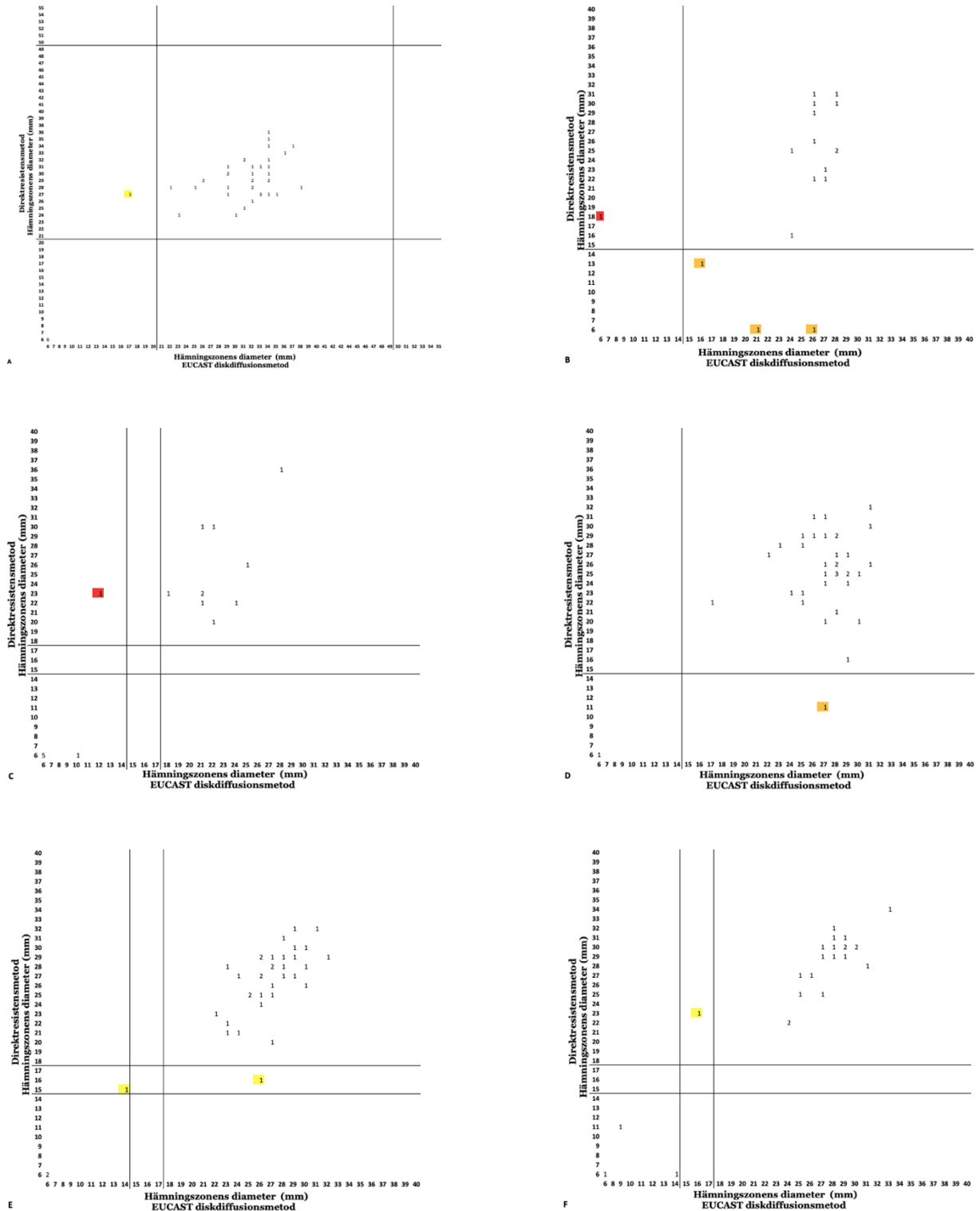
Totalt tio avvikelse var från andra bakteriestammar; *E. faecalis* med trimetoprim visade en mE (Figur 2A), *P. mirabilis* med mecillinam visade ett VME och tre mE samt ett VME med trimetoprim (Figur 2B-C), *Klebsiella spp* visade en ME med mecillinam och två mE med trimetoprim (Figur 2D-E) och slutligen från övriga gramnegativa bakteriestammar förekom en mE med trimetoprim (Figur 2F).

I Figur 1 och Figur 2 kan ses alla bakteriestammar som uppvisat resistens med båda metoderna, hamnar den nedre vänstra delen av diagrammet och alla bakteriestammar som uppvisat känslighet med båda metoderna, hamnar den övre högra delen av diagrammet. I Figur 1 och Figur 2 kan ses alla bakteriestammar med ME-avvikelser det vill säga alla bakteriestammar som uppvisat resistens med direktresistensmetoden och känslighet med EUCAST diskdiffusionsmetoden, hamnar den nedre högra delen av diagrammet och kan ses alla bakteriestammar med VME-avvikelser det vill säga alla bakteriestammar som uppvisat känslighet med direktresistensmetoden och resistens med EUCAST diskdiffusionsmetoden, hamnar den övre vänstra delen av diagrammet.



**Fig. 1.** Korrelation mellan direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden för alla antibiotika som visade avvikelse för *E. coli*. Brytpunkterna från EUCAST presenteras med linjerna. VME är presenterade med röd färg, ME är presenterade med orange färg och mE är presenterade med gul färg. (A) Amoxicillin/Klavulansyra 30 µg (n=211). (B) Ciprofloxacin 5 µg (n=211). (C) Mecillinam 10 µg (n=211). (D) Nitrofurantoin 100 µg (n=211). (E) Trimetoprim 5 µg (n=211).





**Fig. 2.** Korrelation mellan direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden för antibiotika som visade avvikelse. Brytpunkterna från EUCAST presenteras med linjerna. VME är presenterade med röd färg, ME är presenterade med orange färg och mE är presenterade med gul färg. (A) *E. faecalis* med trimetoprim 5 µg (n=45). (B) *P. mirabilis* med mecillinam 10 µg (n=17). (C) *P. mirabilis* med trimetoprim 5 µg (n=17). (D) *Klebsiella spp* med mecillinam 10 µg (n=37). (E) *Klebsiella spp* med trimetoprim 10 µg (n=37). (F) Övriga gramnegativa bakteriestammar med trimetoprim 10 µg (n=24).

## Diskussion

Studiens syfte var att utvärdera direktresistensmetoden samt jämföra den med EUCAST diskdiffusionsmetod. Metoderna utfördes på urinodlingar från patientprover. Bakteriestammarna testades för resistens med samma antibiotika med båda metoderna och brytpunkterna från EUCAST diskdiffusionsmetod användes för kategorisering av hämningszonernas diameter i rätt S, I, R kategori. Prestandan för direktresistensmetoden jämfört med EUCAST diskdiffusionsmetod var 98,6% vilket är väldigt hög.

### Överensstämmelse mellan direktresistensmetod och EUCAST diskdiffusionsmetod

Överensstämmelsen mellan direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden var 98,6% från 1674 testade antibiotikalappar. Denna överensstämmelse baseras på om avlästa hämningszonernas diameter från respektive antibiotika och bakteriestam hamnar i rätt S, I, R kategori. Många studier som jämför direktresistensmetoden med diskdiffusionsmetoden på urinodlingar visar en väldigt bra och procentuellt hög överensstämmelse (20, 21, 22, 23, 24, 25).

I en studie av Sundqvist *et al.* från 2014, valideras de EUCAST brytpunkter för direktresistensmetoden genom att parallellt också utföra EUCAST diskdiffusionsmetod på urinodlingar med fokus på Enterobacteriaceae. I deras studie rapporterades 15 avvikelser från 855 test där tre var VME, fem ME och sju mE. De hittade vidare flest avvikelser för trimetoprim (6). Till skillnad från Sundqvist *et al.* studie sågs här 23 avvikelser av totalt 1674 testade antibiotika, där fem var VME, 11 var ME och sju var mE och antibiotikumet med näst mest avvikelse var trimetoprim. I en annan studie från 2015 visades att majoriteten av alla avvikelser tillhörde ME (20) vilket också kunde visas i denna studies resultat (Tabell 3). Detta kan bero på förekomst av muterade resistent isolat eller närvaro av ett annat isolat (20).

Högst antal avvikelser (totalt 13) förekom hos *E. coli* vilket delvis var förväntat eftersom största antalet bakteriestammar som ingick i studien tillhörde denna bakterieart. Näst högst antal avvikelser (totalt fem) förekom från *P. mirabilis*. Det höga antalet avvikelser kan bero på svärmningen som uppkommer hos denna art vilket leder till otydliga hämningszoner som i sin tur påverkar vid avläsningen av samtliga zoner. Hos *Klebsiella spp* förekom tre avvikelser då 185 antibiotikalappar testats. Även denna andel är hög. *E. faecalis* visade en avvikelse från 90 antibiotikalappar medans övriga gramnegativa stammar visade också en avvikelse från 48 antibiotikalappar som testades.

Det antibiotikum som visade flest avvikelser var mecillinam med 3,8 % (n=10) från 265 antibiotikalappar som testades. Dessa representerades av *E. coli* (n=5), *P. mirabilis* (n=4) och *Klebsiella spp* (n=1). I en studie utförd på 19 mecillinamresistenta kliniska isolat från *E. coli* från patienter i Sverige och andra länder i Europa från 2015 föreslog att en mutation i *cysB*-genen är huvudmekanism för mecillinamresistens (31). En annan studie från 2017 visade två viktiga fynd. Den första fyndet var att genetisk stabila resistensmutationer kan fenotypisk återgå till känsligt när bakterien växer i urin, så tillväxten i urin gör mecillinam resistent *E. coli cysB* mutationer känsliga mot mecillinam. Den andra fyndet visar att urinens osmolaritet ändrade känslighet så att utspädningen av urin och mediet resulterar i ökad känslighet mot antibiotikat medan genom koncentrerad av urinen eller mediet samt tillsatser resulterade i ökad mecillinamresistens (32). I denna studie förekom två VME på mecillinam och *E. coli*.

Resultatet från denna studie visade trimetoprim 1,8 % (n=6) avvikelse från (n=334) testade antibiotikalappar. Amoxicillin/klavulansyra visade 1,1 % (n= 3) avvikelse från (n=265) antibiotikalappar som testades, ciprofloxacin med 1 % (n=3) från (n=289) testade antibiotikalappar. Nitrofurantoin hade 0,4 % (n=1) avvikelse från (n=256) testade antibiotikalappar och slutligen cefadroxil som inte visade någon avvikelse från (n=265) testade antibiotikalappar.

Antibiotika valda för direktresistensbestämningsmetoden omfattar antibiotika som används för empirisk behandling vid urinvägsinfektioner det vill säga antibiotika mot vilka nästan alla stammar är känsliga. Både mecillinam och nitrofurantoin är ett utav de antibiotika som rekommenderas som förstahandsbehandling vid okomplicerade UVI i Sverige (6). Från alla avvikelser kategoriseras 0,3% (n=5) från (n=1674) antibiotika-bakteriestamkombinationer som VME, det vill säga sanna - resistent isolat som känsliga. Detta skulle bidra till terapeutiskt misslyckande. ME förekom likaså där 0,7% (n=11) från (n=1674) antibiotika-bakteriestamkombinationer där sanna – känsliga isolat kategoriserades som resistent. Detta skulle leda till onödig begränsning av terapi för patienten. Slutligen 0,4% (n=7) från

(n=1674) antibiotika-bakteriestamkombinationer tillhörde kategorin mE vilka innebär felaktig kategorisering av bakteriestam till intilliggande kategori som skulle komma att resultera till begränsning i behandling (28).

Överensstämmelsen mellan de båda metoderna i den här studien var över 95% för respektive antibiotika, det vill säga amoxicillin/klavulansyra visade en överensstämmelse på 98,9 %, cefadroxil 100%, ciprofloxacin 99%, mecillinam 96,2%, nitrofurantoin med 99,7% och slutligen trimetoprim med 98,2 % överensstämmelse. Antibiotika presenterar väldigt bra överensstämmelse mellan båda metoderna. Den snabba bestämningen för känslighet (5) mot orala antibiotika leder till minskad varaktighet av intravenösbehandling och eventuellt sjukhusvistelsen för patienter med allvarliga UVI (24).

Hos en VME var avvikelserna i brytpunkterna mellan direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden två mm (Figur 1C), hos en ME avvikelse skillnaden var en mm (Figur 1A) och hos två var den två mm (Figur 1A, 1C) samt hos en mE skillnaden var avvikelserna en mm (Figur 2E). Det som presenterar ett problem med direktresistensmetoden är när bakteriestammens hämningszon ligger väldigt nära zombrytpunkten och samma problematik finns också hos EUCAST diskdiffusionsmetod. Vid avläsning av hämningszonernas diameter är den tillåtna avvikelserna  $\pm 2$  mm (18).

Enligt rutinerna på mikrobiologiska laboratoriet Unilabs, Skövde används amoxicillin/klavulansyra med direktresistensmetoden för *E. faecalis* medan amoxicillin/klavulansyra och ampicillin används med EUCAST diskdiffusionsmetod. För *E. faecalis* finns inga brytpunkter för amoxicillin/klavulansyra i EUCAST, medan ampicillin inte används med direktresistensmetoden. Förslag för förbättring av direktresistensmetoden är att byta amoxicillin/klavulansyra från direktresistensmetoden till ampicillin.

Det som är gemensamt för direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetoden är att de använder antibiotikalappar som diffunderar på en inokulerat agarplatta samt MH-platta används för resistensbestämning (3,5). En av skillnaderna med metoderna är att inokulatet som används vid direktresistensmetoden är icke-standardiserat (5) till skillnad från inokulatet från EUCAST diskdiffusionsmetoden (3). För EUCAST diskdiffusionsmetoden används 15-15-15 minuters regel dock är denna regel inte tillämplig vid användning av direktresistensmetoden, speciellt vid applicering av antibiotikalappar och inkubering av plattorna. Detta är det mest logiska orsaken då WASP instrumentet odlar urinprover som skickas in. Plattorna genereras inte förrän en stämpel om 12 plattor odlats. Plattorna inkuberas sedan när 50 prover är klara. Detta kan leda till olika problem, som exempelvis om inokulerade agarplattor lämnas i rumstemperatur under en längre tidsperiod innan antibiotikalapparna appliceras då det kan resultera i växt av organismen som i sin tur leder till felaktig minskning av inhiberingszonernas diameter. Om plattorna inte inkuberas inom 15 minuter efter applicering av antibiotikalapparna så kan det resultera i växt inom hämningszonerna och då kategoriseras de som falsk resistent (3).

## Fördelar och nackdelar med direktresistensmetoden

Med den snabba resistensutvecklingen i samhället, ger direktresistensmetoden möjlighet till snabbare resultat samt möjliggör en tidig och korrekt behandling. Den största fördelen med direktresistensmetoden är att patienten får ett svar 24 timmar tidigare än med EUCAST diskdiffusionsmetod (6), där svaret även inkluderar även resistensbestämning. En annan stor fördel är minskad arbetsbelastning och att det sparas mycket tid samt att de resistent bakteriestammarna upptäcks snabbare. Resistensbestämning på urinprover utförs alltid och om inte direktresistensmetoden finns då måste först bakterierna växa fram. På cefadroxil-lappen identifieras Extended Spectrum Betalactamase (ESBL)- stammar vilket gör att utredning kan utföras direkt på stammen och den kommer att vara klar dagen efter.

En utav de största nackdelarna med metoden dock är ett icke-standardiserat inokulat samt växt av blandflora (6). En del av urinproverna som kommer till laboratoriet för odling är negativa vilket leder till onödigt användning av antibiotikalappar samt agarplattor som används för direktresistensbestämning. Detta är en kostnadsfråga som måste tas till hänsyn vid fortsatt användning av metoden.

En av bristerna med denna studie var det begränsade antalet av bakteriearter. För att kunna säkerställa att direktresistensmetoden är generellt gångbar borde andra arter också undersökas.

Denna studie bidrar till säkerställning och möjlighet till förbättring av direktresistensmetoden som i sin tur leder till tidigare och säkrare behandling för patienterna.

## Slutsatser

Resultatet från denna studie visade att direktresistensmetoden och EUCAST diskdiffusionsmetod utförda på urinodlingar ger en överensstämmelse på 98,6%. Direktresistensmetoden möjliggör snabbare och säkert svar för patienten. Denna metod fungerar utmärkt för *E. coli* men *P. mirabilis* behöver utvärderas extra noggrann och överväga om den kanske inte ska ingå om man får lika mycket errors vid fleras isolat.

## Ett tack till

Stort tack till alla på mikrobiologiska laboratoriet Unilabs, Skövde för möjligheten att göra mitt examensarbete där. Tack för all hjälp och stöd under den laborativa delen, jag fick lära mig mycket från er. Speciellt tack till min metodhandledare legitimerade biomedicinsk analytiker Jessica Björklund, infektionsläkaren ST-läkare klinisk mikrobiologi Camilla Kiszakiewicz och min vetenskapliga handledare Caroline Bylfors för hjälpen med studien, inspirationen samt trevliga och lärorika diskussioner. Jag skulle också vilja tacka Martin Sundqvist överläkare, med Dr och Erika Matuschek, Ph D, koordinator EUCASTs utvecklingslaboratorium, för hjälpen med resultatpresentation. Slutligen vill jag tacka alla som har bidragit till detta arbete på ett eller annat sätt.

## Referenser:

1. Referensmetodik. UVI-definition. [citerad 2019.03.17] Hämtad från: <http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/UVI-definition>
2. Referensmetodik. Resistensutveckling hos UVI-patogener. [citerad 2019.03.20] Hämtad från: [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Resistensutveckling\\_hos\\_UVI-patogener](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Resistensutveckling_hos_UVI-patogener)
3. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method 2019. [cited 2019.03.10]. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2019\\_manuals/Manual\\_v\\_7.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_2019.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf)
4. Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol 1971; 217.
5. EUCAST. Direct antimicrobial susceptibility testing. [cited 2019.03.16]. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Direct\\_testing\\_guidance\\_note\\_Feb2012.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Direct_testing_guidance_note_Feb2012.pdf)
6. Sundqvist M, Olafsson J, Matuschek E. EUCAST breakpoints can be used to interpret direct susceptibility testing of Enterobacteriaceae from urine samples. APMIS. 2015;123(2):152-5.
7. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015;13(5):269-84.
8. Läkemedelsbehandling av urinvägsinfektioner i öppenvård - behandlingsrekommendation: Information från Läkemedelsverket 2017;(28)5:21-36 [citerad 2019.04.20]. Hämtad från: <https://lakemedelsverket.se/upload/halso-och-sjukvard/behandlingsrekommendationer/Information-fran-lakemedelsverket-nr-5-2017-behandlingsrekommendation.pdf>
9. Referensmetodik. Urinvägspatogener-klassifikation efter patogenitet [citerad 2019.03.21]. Hämtad från: [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Urinv%C3%A4gspatogener-klassifikation\\_efter\\_patogenitet](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Urinv%C3%A4gspatogener-klassifikation_efter_patogenitet)
10. Informed Health Online [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. Understanding urine tests. 2010 Jul 27 [Updated 2016 Dec 30]. [cited 2019.03.03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279350/>
11. Referensmetodik. Kvantitativ urinodling-jämförelsenivå (Nivå 3) 2000 [citerad 2019.05.01]. Hämtad från: [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Kvantitativ\\_urinodling-i%C3%A4mf%C3%B6relseniv%C3%A5\\_\(Niv%C3%A5\\_3\)](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Kvantitativ_urinodling-i%C3%A4mf%C3%B6relseniv%C3%A5_(Niv%C3%A5_3))
12. Referensmetodik. Mikroskopi och testremsor vid UVI-diagnostik 2000. [citerad 2019.05.17] Hämtad från: [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Mikroskopi\\_och\\_testremsor\\_vid\\_UVI-diagnostik#Testremsor](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Mikroskopi_och_testremsor_vid_UVI-diagnostik#Testremsor)
13. Referensmetodik. Kvantitativ urinodling - Nivå 2 - Hög rutinnivå 2000 [citerad 2019.05.01]. Hämtad från: [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Kvantitativ\\_urinodling-hög\\_rutinnivå\\_\(Nivå\\_2\)](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Kvantitativ_urinodling-hög_rutinnivå_(Nivå_2))
14. Referensmetodik. Kvantitativ urinodling - låg rutinnivå (screening, Nivå 1) 2000 [citerad 2019.05.01]. Hämtad från: [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Kvantitativ\\_urinodling-l%C3%A4g\\_rutinniv%C3%A5\\_\(screening,\\_Niv%C3%A5\\_1\)](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Kvantitativ_urinodling-l%C3%A4g_rutinniv%C3%A5_(screening,_Niv%C3%A5_1))
15. Referensmetodik. Kromogena substrat 2011 [citerad 2019.05.04]. Hämtad från: [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Kromogena\\_substrat#Urinodlingar](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Kromogena_substrat#Urinodlingar)
16. Referensmetodik. Urin - bilaga 1 2000 [citerad 2019.05.04]. Hämtad från: [http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Urin-bilaga\\_1#1\\_Blodagar](http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Urin-bilaga_1#1_Blodagar)
17. M. Tille P. Baileys & Scotts Diagnostic Microbiology. 14 ed. St. Louis Missouri: Elsevier; 2017. P. 177-178, 180, 184 -185.
18. Matuschek E, Brown DF, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect. 2014;20(4):O255-66.
19. EUCAST. New definitions of S, I and R [cited 2019.03.15]. Available from: <http://www.eucast.org/newsiandr/>
20. Coorevits L, Boelens J, Claeys G. Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(6):1207-12.
21. Hollick GE, Washington JA. Comparison of direct and standardized disk diffusion susceptibility testing of urine cultures. Antimicrob Agents Chemother. 1976;9(5):804-9.

22. Källenius G, Dornbusch K, Hallander HO, Jakobsson K. Comparison of direct and standardized antibiotic susceptibility testing in bacteriuria. *Chemotherapy*. 1981;27(2):99-105.
23. Oakes AR, Badger R, Grove DI. Comparison of direct and standardized testing of infected urine for antimicrobial susceptibilities by disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 1994;32(1):40-5.
24. Johnson JR, Tiu FS, Stamm WE. Direct antimicrobial susceptibility testing for acute urinary tract infections in women. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2316-23.
25. Breteler KB, Rentenaar RJ, Verkaart G, Sturm PD. Performance and clinical significance of direct antimicrobial susceptibility testing on urine from hospitalized patients. *Scand J Infect Dis*. 2011;43(10):771-6.
26. Johnson JE, Washington JA. Comparison of direct and standardized antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;10(2):211-4.
27. Doern GV, Scott DR, Rashad AL, Kim KS. Evaluation of a direct blood culture disk diffusion antimicrobial susceptibility test. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;20(5):696-8.
28. Hombach M, Böttger EC, Roos M. The critical influence of the intermediate category on interpretation errors in revised EUCAST and CLSI antimicrobial susceptibility testing guidelines. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(2):E59-71.
29. Riksdag S. Lag (2002:297) om biobanker i hälso- och sjukvården m.m. 2018 [citerad 2019.05.11]. Hämtad från: [http://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/lag-2002297-om-biobanker-i-halso--och\\_sfs-2002-297](http://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/lag-2002297-om-biobanker-i-halso--och_sfs-2002-297)
30. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters 2019 [cited 2019.05.16]. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf)
31. Thulin E., Sundqvist M., Andersson D.I. Amdinocillin (mecillinam) resistance mutations in clinical isolates and laboratory-selected mutants of Escherichia Coli. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2015;59:1718–1727.
32. Thulin E, Thulin M, Andersson DI. Reversion of High-level Mecillinam Resistance to Susceptibility in Escherichia coli During Growth in Urine. *EBioMedicine*. 2017;23:111-8.



