

# **Undersøgelser ved brug af antibiotika**



## *Kapitel 38*

# **Alment om antibiotika og måling ved hjælp af agardiffusionsmetoden**

Kapitlerne i dette afsnit er udarbejdet i nært samarbejde med  
overlæge Jørgen Bang, antibiotikaafdelingen

### **1. Historisk indledning**

De første antimikrobielle kemoterapeutika, der kendes, er naturprodukter fra planter (i dette kapitel bruges udtrykket antibiotika om alle antimikrobielle kemoterapeutika). Sådanne produkter har været anvendt på empirisk grundlag i århundreder, indtil isolering og renfremstilling af de aktive stoffer påbegyndtes i 1817-20 med renfremstillingen af emetin fra ipecacuanharod og kinin fra cinchona-bark (Pelletier & Caventou fra Paris). Ipecacuanharod anvendtes af de indfødte i Brasilien til behandling af amøbedysenteri før Columbus opdagede Amerika, og cinchonabark havde være brugt til behandling af malaria i lange tider.

Med erkendelsen i sidste fjerdedel af forrige århundrede (Pasteur, Koch og deres elever) af, at mange sygdomme skyldtes mikroorganismer, var grunden lagt for en rationel anvendelse af desinfektionsmidler til sygdomsforebyggelse og -bekæmpelse. Desinfektionsmidler var på det tidspunkt den tekniske betegnelse for alle slags antimikrobielle stoffer. De grundlæggende metoder til bedømmelse af desinfektionsmidlers hæmmende eller dræbende effekt på mikroorganismér in vitro og in vivo udvikledes af Koch i 1881, og i årene derafter undersøgte von Behring en mængde forskellige desinfektionsmidlers effekt in vitro og in vivo ved at indsprøjte disse midler på inficerede forsøgsdyr. Disse terapeutiske forsøg faldt dog skuffende ud, da de anvendte midler enten var for giftige eller kun havde ringe eller ingen kurativ virkning (von Behring 1890).

En ny rationel æra indledtes, da kemoterapiens fader, Ehrlich (Guttman & Ehrlich 1891) med god effekt anvendte et farvestof, metylenblåt, til behandling af to patienter med malaria. Baggrunden var, at dette stof var parasitotrop, idet det kunne farve malariaparasitter in vitro, og at Ehrlich fra sit arbejde med metylenblåt vidste, at det ikke var toksisk og at det farvede blodlegeme-inklusioner in vivo. Fra Ehrlich og medarbejdere udgik der kort efter århundredskiftet en række arbejder om syntetiske kemoterapeutika fremstillet ud fra farvestoffer og arsenforbindelser (de gik ud fra det af englænderen Thomas og hans medarbejder Breinl (Thomas 1905) indførte ret-

toksiske arsenik-derivat, atoxyl, som var virksomt over for trypanosomer). I 1910 og i årene derefter kronedes Ehrlich og medarbejdernes arbejde med held ved udviklingen af stofferne salvarsan og neosalvarsan, som var virksomme over for bl.a. syphilis og trypanosomiasis.

Det næste store fremskridt på kemoterapiens område kom i 1930'erne. Omkring 1932 syntetiserede tyskerne Mietzsch og Klarer prontosil blandt flere andre azo-forbindelser, og i 1935 viste deres landsmand Domagk, at dette stof, som ingen bakteriehæmmende effekt havde in vitro, kunne helbrede eller forebygge eksperimentel streptokokinfektion hos mus og kaniner. Tréfouél et al. (1935) på Institut Pasteur i Paris påviste, at prontosils aktivitet in vivo skyldtes sulfanilamid, som fraspaltes fra prontosil i organismen. Hermed var sulfonamiderne introduceret i infektionsbekæmpelsen som de første stoffer med aktivitet over for en række af de mest frygtede pyogene mikroorganismer. Domagk's indsats belønnedes med Nobel-prisen i 1939.

I 1929 havde Fleming påvist et nyt antibiotikum, penicillin, som produceredes af en skimmelsvamp og havde antibakteriel aktivitet over for en lang række, fortrinsvis grampositive bakterier. En metode til fremstilling af penicillin i større mængde samt stoffets terapeutiske effekt på eksperimentelle dyreinfektioner og på infektionssygdomme hos mennesker blev beskrevet af en gruppe forskere fra Oxford (Chain et al. 1940; Abraham et al. 1941), og i 1945 fik Fleming, Florey og Chain Nobel-prisen for deres indsats. Streptomycin og en lang række andre antibiotika blev isoleret ved systematiske undersøgelser af jordbundsbakterier i Waksman's laboratorium ligeledes i 1940'erne, og Waksman fik i 1952 Nobel-prisen for opdagelsen af streptomycinet i 1944. Kloramfenikol opdagedes i 1947 af forskere ved Parke, Davis & Co. Laboratorierne, hvoriblandt J. Ehrlich, P.R. Burkholder og D. Gottlieb, og klortetracyklin i 1948 af forskere (bl.a. Duggar) ved Lederle Laboratorierne (cit. fra Lechevalier & Solotorovsky 1974). Siden er yderligere en lang række effektive antibiotika blevet opdaget eller syntetiseret.

Allerede kort tid efter introduktionen af antibiotika viste det sig i klinikken, at der kunne opstå resistente mutanter af ellers følsomme arter (se fx. Maclean et al. 1939; Abraham & Chain 1940; Gallardo 1944), og senere erfaringer har til fulde bekræftet den kliniske betydning af resistensudvikling over for de til rådighed stående antibiotika. Der opstod derfor ret snart et krav om hurtig bestemmelse af en isoleret mikroorganismes følsomhed for et givet antibiotikum (se fx. Maclean et al. 1939) og om bestemmelse af antibiotikumkoncentrationen (aktivitet) dels som led i produktionskontrolen dels i serum og andre legemsvæsker og væv under kemoterapi, med henblik på farmakokinetiske studier (se fx. Marshall et al. 1937). Tidligt havde man erkendt, at der var god overensstemmelse mellem en bakteriestammes følsomhed over for

et antibiotikum *in vitro* målt som den minimale inhibitoriske koncentration (MIC), blod- og vævskoncentrationen af stoffet og den terapeutiske effekt (se fx. Marshall et al. 1937; Felke 1939; Reymann & Schmith 1942). Med indførelse af mere toksiske stoffer som fx. aminoglykosiderne til klinisk brug steg behovet yderligere for måling af antibiotikumkoncentrationen i serum med henblik på at opnå effektive, men ikke toksiske koncentrationer af det givne antibiotikum under kemoterapi (såkaldt styret kemoterapi), især hos patienter med nedsat udskillelse af stofferne fx. på grund af nyreinsufficiens.

De metoder, man anvendte til bestemmelse af en mikroorganismes følsomhed over for et givet antibiotikum, var oprindelig udviklet til brug for bedømmelse af desinfektionsmidlers effekt (Koch 1881; von Behring 1890) og til undersøgelse af serums bakteriehæmmende og -dræbende effekt (Nutall 1888; Buchner 1889). Man rådede på det tidspunkt over to hovedmetoder: (1) Tilsætning af desinfektionsmidlet til en tilsået flydende kultur og påvisning af væksthæmning under efterfølgende inkubation og påvisning af drab ved hjælp af subkulturer. (2) Terapiforsøg med desinfektionsmidler ved eksperimentelle dyreinfektioner. Disse metoder benyttedes til bedømmelse af kemoterapeutikas effekt på trypanosomer (Laveran & Mesnil 1902; Ehrlich & Shiga 1904) og videreudvikledes under Ehrlich og medarbejdernes systematiske arbejde med kemoterapeutika og kemoterapi, hvor metoderne også anvendtes til bedømmelse af effekten på bakterier (se fx. Bechhold & Ehrlich 1906; Ehrlich & Gonder 1913, 1914; Gotschlich 1913). Endnu en metode, som kendes fra resistensbestemmelse og koncentrationsbestemmelse af antibiotika, nemlig agar-cup-diffusionsmetoden, blev først anvendt til undersøgelse af lysozym i vævsvæsker og sekreter (Fleming 1922) og af desinfektionsmidler (Reddish 1929; Ruehle & Breever 1931; Rose & Miller 1939a).

I sit første arbejde om penicillin anvendte Fleming (1929) flere metoder til at måle penicillinaktiviteten over for forskellige mikroorganismer: (1) En agar diffusionsmetode hvor han udskar en grøft i agaren og fyldte den med smeltet agar indeholdende det aktive stof. Ved at udså bakterier vinkelret på grøften kunne han efter inkubering iagttage en væksthæmningszone og efter yderligere inkubering en lyse af den nærmestliggende vækst.. Han brugte hæmningszonens størrelse som udtryk for mikroorganismens følsomhed over for penicillin. (2) Ved hjælp af en række bouillonkulturer med stigende koncentration af penicillin kunne han mere præcist udtrætte penicillinet hæmmende (bakteriostatiske) effekt. (3) Ved at subkultivere fra glassene i sådanne rækker af bouillonkulturer på bestemte tidspunkter kunne han tælle overlevende bakterier og få et udtryk for den bakteriedræbende (baktericide) effekt. Senere fremhævede Fleming (1938) dog, at på grund af legemets egne forsvarsmekanismer er det tilstrækkeligt at måle den bakteriostatiske effekt ved

bedømmelse af kemoterapeutiske midler. Fortyndinger i bouillon eller agar til bestemmelse af bakteriers følsomhed over for sulfonamid introduceredes i Danmark af Sindbjerg-Hansen (1940) og Schmith & Reymann (1940).

Colebrook et al. (1936b) og senere Fleming (1938) lavede semikvantitative bestemmelser af sulfonamid i blod ved hjælp af Wright's (1923) "slide cell" teknik (mikrodyrkningsteknik i små kamre mellem to objektglas), som oprindeligt var udviklet til at bestemme serum og leukocytters bakteriehæmmende aktivitet, men som Fleming allerede i 1924 havde anvendt til undersøgelse af antiseptika.

Fuller fra London (1937) og uafhængigt heraf Marshall et al. i USA (1937) udviklede en kemisk metode til bestemmelse af sulfonamid i blod og urin byggende på en kolorimetrisk påvisning af et rødt farvestof, der fremkommer ved en diazoreaktion med sulfonamid. En modifikation heraf (Bratton & Marshall, 1939) bruges stadig i antibiotika-afdelingen til måling af sulfonamider i fx. serum. I Danmark angav Lundsteen et al. (1938) en mikrometode, der byggede på Marshall's teknik, til måling af sulfonamid.

Mange af disse metoder til resistensbestemmelse og koncentrationsmåling var dog temmelig besværlige at arbejde med i praksis, så det var et yderligere fremskridt, da Abraham et al. i 1941 i deres klassiske arbejde over penicillin beskrev en forbedret agardiffusionsmetode, den såkaldte Oxford cup-metode, til måling af penicillin i serum og andre væsker. De benyttede glascylindre sat oven på agaren som depot for væskerne, og foruden den ukendte prøve anvendtes en standardrække. I principippet og med kun små ændringer er det den metode, der i dag anvendes til resistensbestemmelser og koncentrationsmålinger. Metoden er nærmere beskrevet af et medlem af Oxford-gruppen (Heatley 1944) med angivelse af prædiffusionsprincipippet og beskrivelse af en hurtigere modifikation, som tilskrives Pope. Pope anvendte en hurtigtvoksende *B. subtilis*, der tillod bestemmelse af penicillinkoncentrationen på 4–5 timer. I stedet for at bruge en cup anbragt oven på agaren introduceredes snart en række andre former for depoter: hul i agaren (se Fleming 1942), filterpapir-discs (Dawdy et al. cit. af Foster & Woodruff 1943a; Vincent et al. 1944), en dråbe anbragt oven på agaren (Hagerman 1942; Thomas et al 1944) og tabletter indeholdende antibiotika (Hoyt & Levine 1947).

I Skandinavien blev agar-hulmetoden først beskrevet i 1945 af K.A. Jensen (Jensen et al. 1945), som selv under krigen havde isoleret en penicillin-producerende skimmelsvamp og iværksat en penicillinproduktion i samarbejde med Løvens Kemiske Fabrik. Metoden var udarbejdet uden kendskab til Flemings artikel om agar-hulmetoden fra 1942 og vandt udbredelse også i Sverige (Sievers 1948). En række disputatsarbejder om penicillin, bl.a. omhandlende

koncentrationsmålinger og resistensbestemmelser og lignende udgik i årene herefter fra K.A. Jensens institut (Vesterdal 1947; Dragsted 1949; Brodersen 1949; Espersen 1951; Staun 1959; Eriksen 1965; Dons 1966).

Foruden agardiffusionsmetoden anvendtes bouillonfortyndingsmetoden (Rammelkamp 1942) til måling af penicillinaktiviteten og turbidimetri (Foster 1942) til måling af penicillins hæmmende effekt under bakterievækst i bouillon samt en række kemiske metoder (Murtaugh & Levy 1945; Alcino 1946; Herriott 1946; Scudi 1946; Scudi & Jelinak 1946) til påvisning af penicillin. Men i overenstemmelse med Fleming's (1942) og Foster & Woodruff's (1943a, 1944) kritiske metodegennemgang og standardiseringarbejder blev agardiffusionsmetoden den klinisk mest anvendte.

Den teoretiske baggrund for zonedannelsen ved diffusionsmetoderne udvikledes i England (Cooper & Woodman 1946) og uafhængigt heraf i Danmark (Vesterdal 1947a, b) og er siden yderligere blevet belyst af en række forskere (Michison & Spicer 1949; Erlandson 1951; Cooper & Linton 1952; Cooper & Gillespie 1952; Humphrey & Lightbown 1952; Bang 1955, 1970a, b; Linton 1958, 1961; Cooper et al. 1958; Cooper 1963).

Et vigtigt bidrag til at øge resistensbestemmelsens kliniske anvendelighed er ydet af Ericsson og medarbejdere. De indførte i 1954 den semikvantitative resistensbestemmelse, hvor zonestørrelsen for en række stammer korreleres med deres MIC-værdier over for samme antibiotikum bestemt ved pladefortyndingsmetoden, og grundlaget for den kliniske tolkning fastlagdes ved sammenligning med de serum- og vævskoncentrationer, der forventedes opnået med det pågældende antibiotikum ved normal terapeutisk dosis (se Ericssons disputats 1960).

Som det fremgår, udvikledes metoderne til koncentrationsbestemmelse (= aktivitetsbestemmelse) og resistensbestemmelse ved hjælp af agardiffusion næsten sideløbende i 1940'erne, da de byggede på samme principper. Mens resistensbestemmelsen allerede fra sidste halvdel af 1940'erne fik praktisk betydning i klinikken, så blev koncentrationsbestemmelserne først og fremmest brugt til at bestemme antibiotikas farmakokinetik i grundlæggende arbejder og til aktivitetsbestemmelse af antibiotika under og efter produktionen. Den praktiske betydning af koncentrationsbestemmelse i klinikken kom først 10-15 år senere, specielt med indførelsen af de nye aminoglykosider som fx. gentamycin.

## 2. Fysisk og biologisk baggrund for hæmningszonens dannelse ved agardiffusionsmetoden til resistensbestemmelse og koncentrationsmåling

### A. Diffusionsteori

At et opløst stof diffunderer skyldes, at de enkelte molekyler er underkastet Brownske bevægelser.

Vi forudsætter, at bevægelserne af de enkelte molekyler sker frit, uafhængigt af hinanden, i alle 3 dimensioner. Er der mange molekyler placeret indenfor et lille begrænset område, men med fri bevægelsesmulighed, vil resultanten af molekylbevægelserne være en udbredning fra steder med mange molekyler til steder med få eller ingen molekyler. Der vil herved etableres en *koncentrationsgradient* betinget af forskelle i koncentrationen mellem forskellige steder i agarren. Situationen findes f.eks., når en disc med antibiotikum anbringes på en agaroverflade og molekylerne begynder at trænge ud i agarren. Betragter vi to naboområder i agarren, det ene med mange, det andet med få molekyler, vil der per tidsenhed bevæge sig flere molekyler fra stedet med de mange til stedet med de få molekyler, end der i samme tidsrum vil bevæge sig i modsat retning. Simpelthen fordi der er flere det ene sted end det andet. Denne øgede afgang af molekyler i forhold til tilgangen benævnes ofte *diffusionstrykket*, og dette er større jo større forskel der er på koncentrationen af molekyler i de to naboområder.

Som følge af molekylarbevægelserne er al diffusion i principippet 3-dimensonal. Når vi alligevel taler om både *1-, 2- og 3-dimensional diffusion*, skyldes det, at vi kan fastlægge de eksperimentelle forhold, hvorunder diffusionen foregår således, at koncentrationsforskellen – eller koncentrationsgradienten – er ophævet i én eller to retninger. Nabopunkter har under disse forhold samme koncentration og udveksler blot molekyler.

Dette er f.eks. tilfældet ved *agar-cup metoden*, hvor et hul i hele pladens tykkelse fyldes helt med antibiotikumopløsning. Diffusionen kan her beskrives som 2-dimensonal, idet der ikke er koncentrationsgradienter i retningen overflade-bund (op-ned).

Ved diffusion fra overfladen ned i en *agarsøje* (reagensglas med agar overlejret med antibiotikumopløsning) ophæves koncentrationsgradienterne indenfor agarsøjens tværsnitflade, dvs. i to retninger, og diffusionen kan beskrives som 1-dimensonal.

Antibiotikum-molekylernes tidsmæssige fordeling i substratet beskrives af diffusionsligningen (Fick's 2. lov):

$$\frac{dC}{dt} = -D \cdot \frac{d^2C}{dx^2}$$

For 3-dimensonal diffusion ser formlen således ud:

$$\frac{dC}{dt} = -D \left( \frac{d^2C}{dx^2} + \frac{d^2C}{dy^2} + \frac{d^2C}{dz^2} \right) \quad \text{ligning (1)}$$

Hvis der er tale om 2-dimensonal eller 1-dimensonal diffusion, reduceres udtrykket i parentesen tilsvarende. C er molekyltætheden i afstanden x, y, z i de tre dimensioner fra diffusionscentret, og D er diffusionskonstanten (se side 370). Ligningen udtrykker altså,

at diffusionshastigheden ( $\frac{dC}{dt}$ ) er proportional med koncentrationsgradienten og med stoffets diffusionskonstant. Fick's lov er en differentialligning og må til praktisk anvendelse integreres, og den form, den får, afhænger af de betingelser, hvorunder diffusionen finder sted (Thomsen 1967).

Der er angivet mange løsninger af Fick's ligning (1), og den af Vesterdal (1947a, b) anvendte kan udledes således iflg. Bang (upublicerede beregninger):

Ser vi først på det enkleste – den 1-dimensionale diffusion – hvor vi forudsætter molekylerne anbragt i punktet 0 til tiden 0, og alene med mulighed for at bevæge sig til begge sider i liniens retning, så vil vi til tiden T have en fordeling langs denne, der vil vise en høj koncentration omkring udgangspunktet faldende til begge sider – nøje svarende til den klokkeformede Gausske fordeling eller den normale fordeling (fig. 1). Med stigende tid vil kurven flade mere og mere af. Denne effekt vil fremskyndes, hvis molekylerne bevæger sig hurtigt.

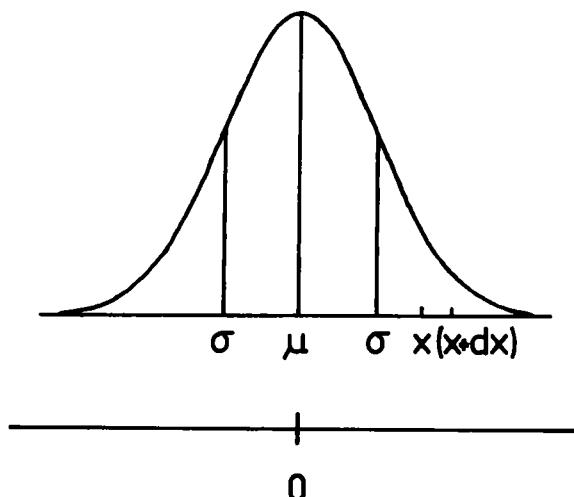


Fig. 1. 1-dimensional diffusion ud fra punktet 0 på den nederste linie. Koncentrationen af molekylerne til tiden T efter diffusionens start er angivet ved den klokkeformede kurve ovenover linien, med koncentrationen af det diffunderende stof afsat ud ad ordinaten og afstanden fra startpunktet afsat ud ad abscissen (Gauss' normalfordelingskurve med middelværdien  $\mu$  og spredningen  $\sigma$ , se i øvrigt teksten).

Formlen for kurven i fig. 1 er:

$$F(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$

hvor  $\mu$  er middelværdien og  $\sigma$  spredningen.

En øget affladning betyder en øget spredning – dvs. kurvens 2 vendepunkter σ rykker længere og længere væk fra midten. Bestemmende for forløbet af denne affladning er tiden T og diffusionskonstanten D, og det kan vises, at spredningen er bestemt ved  $\sigma = \sqrt{2DT}$ .

Vi tænker os som nævnt molekylerne anbragt til tiden 0 i punktet 0, og vil da have  $\mu = 0$  (koordinaten er jo 0 for punktet 0). Vi betragter derefter sandsynligheden for, at et molekyle efter tiden T befinner sig i et lille afsnit, dx, på x-aksen (fig. 2) i afstanden mellem x og  $x+dx$  fra 0 punktet. Denne sandsynlighed kan udtrykkes ved

$$\begin{aligned} F(x)dx &= \frac{1}{\sqrt{2DT}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x}{\sqrt{2DT}}\right)^2} \cdot dx \\ &= \frac{1}{\sqrt{4\pi DT}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4DT}} \cdot dx \end{aligned} \quad \text{ligning (2)}$$

Bevæger molekylerne sig *alene* i én retning vinkelret på den i fig. 1 tegnede, er den tilsvarende sandsynlighed for, at ét molekyle vil befinde sig i afstanden mellem y og  $y+dy$  på y-aksen (fig. 2) givet ved

$$F(y)dy = \frac{1}{\sqrt{4\pi DT}} \cdot e^{-\frac{y^2}{4DT}} \cdot dy \quad \text{ligning (3)}$$

Bevæger de sig *både* i retningerne x og y (altså i planet).

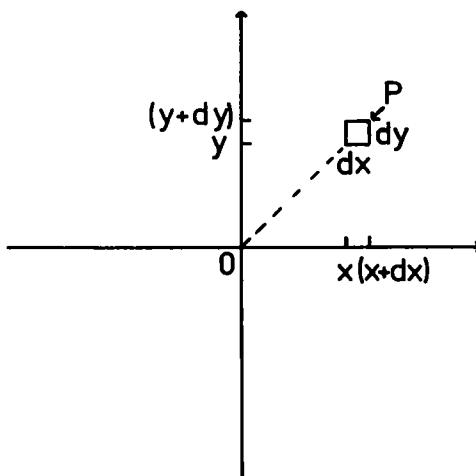


Fig. 2. 2-dimensional diffusion ud fra punktet 0 (se teksten).

er sandsynligheden for, at ét molekyle til tiden T befinder sig i det lille areal ( $dx \cdot dy$ ) givet ved en multiplikation af de to sandsynligheder (ligning 2) og (ligning 3) for at nå ud i henholdsvis  $dx$  og  $dy$  (fig. 2):

$$\begin{aligned} F(x)dx F(y)dy &= \left( \frac{1}{\sqrt{4\pi DT}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4DT}} \right) \left( \frac{1}{\sqrt{4\pi DT}} \cdot e^{-\frac{y^2}{4DT}} \right) dx dy \\ &= \frac{1}{4\pi DT} \cdot e^{-\frac{x^2+y^2}{4DT}} \cdot dx dy \end{aligned} \quad \text{ligning (4)}$$

Er der *tillige* tale om diffusion i retningen  $z$  vinkelret på planet (3-dimensionalt), ser vi på lignende måde at chancen for at ét molekyle til tiden T befinder sig i et lille volumen,  $dx \cdot dy \cdot dz$ , er

$$F(x)dx F(y)dy F(z)dz = \frac{1}{(\sqrt{4\pi DT})^3} \cdot e^{-\frac{x^2+y^2+z^2}{4DT}} \cdot dx dy dz \quad \text{ligning (5)}$$

De hidtidige formler har udtrykt sandsynligheden for, at ét molekyle anbragt i 0 punktet til tiden 0 efter tiden T befinder sig henholdsvis i et lille område,  $dx$  omkring punktet  $x$ , eller  $dx \cdot dy$  omkring punktet  $(x, y)$  eller  $dx \cdot dy \cdot dz$  omkring punktet  $(x, y, z)$ .

Anbringer vi *mange* molekyler, f.eks.  $N = kC_0$  i udgangspunktet, vil formlerne udtrykke det *forventede* antal molekyler,  $N'$ , i de respektive områder, fx. vil ligning (4) under betingelserne for den 2-dimensionale diffusion få formlen:

$$N' = \frac{k \cdot C_0}{4\pi DT} \cdot e^{-\frac{x^2+y^2}{4DT}} \cdot dx dy$$

Hvilket betyder at vi kan forvente  $N'$  molekyler i det lille område  $dx \cdot dy$  omkring  $P$ , hvilket også kan skrives således:

$$C_p = \frac{N'}{dx dy} = \frac{k \cdot C_0}{4\pi DT} \cdot e^{-\frac{R^2}{4DT}} \quad \text{ligning (6)}$$

hvor  $C_p$  betegner koncentrationen i  $P$ ,  $k$  betegner arealet af hullet med radius  $r$ , hvori molekylerne fyldes ( $k = \pi r^2$ ) og  $x^2 + y^2 = R^2$ , hvor  $R$  er afstanden fra begyndelsespunktet

(0,0) ud til punktet P med koordinaterne x,y (den stiplede linie i fig. 2).

Ligning (6) kan da omformes til:

$$\frac{C_p}{C_0} = \frac{r^2}{4DT} \cdot e^{-\frac{R^2}{4DT}} \quad \text{ligning (7)}$$

Dette er udtrykket for diffusionsformlen ved den 2-dimensionale diffusion – og den kan anvendes på agar-cup metoden. Det skal dog nævnes, at vi hele tiden har forudsat, at molekylerne fra starten var anbragt i et *punkt* – det er ikke praktisk muligt – vi anbringer en bestemt mængde af en kendt koncentration ( $k \cdot C_0 = \pi r^2 C_0$ ) hvilket er et udtryk for antallet af molekyler, men vi har samtidig *ikke* korrigeret for hullets udstrækning.

(En sådan korrektion kan iøvrigt foretages ved at forøge T med en størrelse  $t_0 = \frac{r^2}{8D}$  = ca. 1 time – afhængig af stof (D) og agar-cup (r) – forklaringen på denne korrektion er at man kan betragte anbringelsen i en agar-cup som svarende til fordelingen efter ca. 1 times diffusion fra et punkt. Ligning (13) side 371 vil efter en sådan korrektion få formlen:  $T = t_0 + L + P + n'G$ .)

Ligning (7) er udtrykket for *den rene diffusion* hvor  $C_p$  er koncentrationen i punktet P, beliggende i afstanden R fra diffusionscentrum, og T tiden fra diffusionens start til  $C_p$  er nået ud i afstanden R. Udfra ligning (7) kan vi anskueliggøre hvorledes et antibiotikum diffunderer ud i agaren fra et depot:

Anbringes et depot af antibiotikum på en agaroverflade eller i et hul i agaren, vil der ske en diffusion af antibiotikum ud i den tilgrænsende agar. Straks efter diffusionens begyndelse vil der være en høj koncentration af antibiotikum i agaren nærmest ved depotet og en meget lav koncentration lidt længere ude i agaren og slet intet antibiotikum herudenfor (stejl koncentrationsgradient). Noget senere vil antibiotikum være diffunderet længere ud i agaren, og koncentrationsgradienten vil være mindre stejl, idet koncentrationen nærmest depotet begynder at falde. Til slut, når depotet er udtømt, vil antibiotikum være fordelt med en ligelig koncentration i hele agaren.

I fig. 3A er angivet *koncentrationsgradienterne* fra depotet ud i agaren på forskellige tidspunkter efter diffusionens start ( $T_1$  lige efter starten,  $T_3$  efter flere timers diffusion). Det ses, at koncentrationsgradienten bliver fladere og fladere med tiden. I fig. 3B er *koncentrationsændringerne* i agaren i forskellige afstande fra depotet ( $R_1$  tæt ved,  $R_8$  langt væk fra depotet) angivet som funktion af tiden efter diffusionens start. Det ses også her, at afstanden mellem punkter med en given koncentrationsforskæl øges med diffusionstiden.

Når vi skal se på hæmningszonens dannelse, er forholdene imidlertid komplicerede af, at der foruden rent fysiske diffusionsprocesser foregår en samtidig vækst af bakterierne, som er en biologisk proces med betydelig større variabilitet end de fysiske faktorer, der bestemmer diffusionen. Det er *samspillet* mellem diffusion og vækst, der bestemmer hæmningszonens dannelse, idet væksten ophører, når bakterierne utsættes for en væksthæmmende koncentration (ikke nødvendigvis dræbende) af det diffunderende antibiotikum.

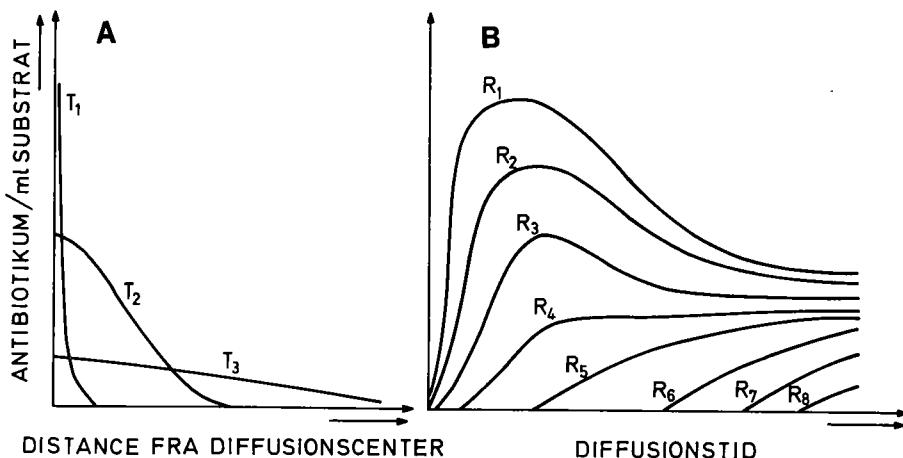


Fig. 3. A: Grafisk fremstilling af relationen mellem koncentrationen af antibiotikum/ml substrat og afstanden fra diffusionscentret til forskellige tidspunkter – arbitraet angivet som T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> og T<sub>3</sub> (Gengivet efter Thomsen (1967)). B: Grafisk fremstilling af relationen mellem koncentrationen i substratets enkelte punkter og diffusionstiden. Kurverne angiver koncentrationens variation i arbitraet valgte punkter R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> . . . ; R<sub>1</sub> tænkes nærmest og de følgende punkter med tiltagende afstand fra depotet (gengivet efter Thomsen (1967)).

Vi må derfor først slå fast, at der eksisterer en vis *kritisk antibiotikumkoncentration* ( $C_c = MIC$ ), som lige netop hæmmer bakterievæksten. Dernæst gælder det, at zonegrænsens markering afhænger af et vist antal bakterier (bakterietæthed) på agaroverfladen (synlig vækst) = *det kritiske bakterietal*. Endelig gælder det, at det tager en vis tid, før der er dannet det kritiske bakterietal på agaroverfladen ud fra det udsåede inoculum (= *den kritiske tid*). Det vil sige, at zonedannelsen foruden af *diffusionen* er afhængig af det udsåede *inoculums størrelse, lag-fasens længde, generationstiden* af stammen og dennes *MIC*.

Skal ligning (7) anvendes på hæmningszonen, må vi derfor først tolke de forskellige størrelser, der indgår i ligningen, idet vi nu foruden diffusionsprocessen også har at gøre med vækstprocessen. R vil indgå som mål for hæmningszonens radius, C<sub>p</sub> er mål for den koncentration, der er ansvarlig for bakteriestammens hæmning i zoneranden (C<sub>p</sub> = C<sub>c</sub>). I tidsfaktoren T indgår den tid, det tager det udsåede inoculum at vokse frem og markere zonedannelsen gennem dannelsen af en given vækstgrad (synlig vækst). Ligning (7) ser derefter således ud:

$$\frac{C_c}{C_0} = \frac{r^2}{4DT} \cdot e^{-\frac{R^2}{4DT}} \quad \text{ligning (8)}$$

Denne ligning er udarbejdet for en 2-dimensional diffusion, men er i praksis anvendelig på forholdene ved 3-dimensional diffusion under de her omtalte diffusionsbetingelser (se Thomsen 1967).

I ligning (8) er:

$C_0$  = koncentrationen i depotet ved diffusionens start

$C_c$  = den kritiske koncentration (= MIC)

T = den kritiske tid

R = afstanden fra centrum til stedet hvor  $C_c$  befinder sig til tiden T (hæmningszonens radius)

r = depotets radius

D = diffusionskonstanten

e = den naturlige logaritmes grundtal = 2,718;  $\log e = 0,4343$

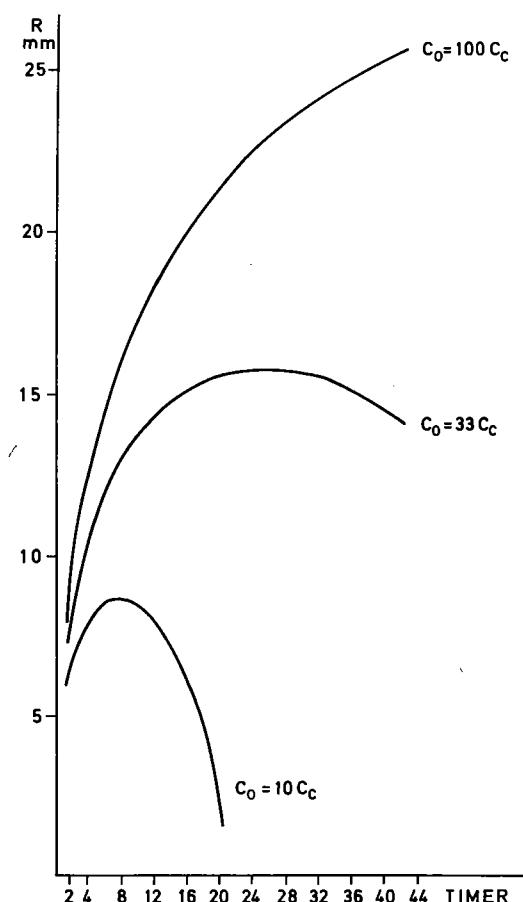


Fig. 4. Grafisk fremstilling af positionen (dvs. afstanden (R) fra diffusionscentrum), af en given antibiotikumkoncentration ( $C_c$ =MIC) i agaren til forskellige tider efter diffusionens start. Øverste kurve afbilder forholdene hvis antibiotikumkoncentrationen i depotet er  $100 \cdot \text{MIC}$  ( $C_0 = 100 \cdot C_c$ ). Midterste kurve svarer til en antibiotikumkoncentration i depotet på  $33 \cdot \text{MIC}$ , og nederste kurve svarer til en antibiotikumkoncentration på  $10 \cdot \text{MIC}$  (gengivet efter Bang, upublicerede resultater).

I fig. 4 er ligning (8) anvendt til at beregne den afstand hvori en given antibiotikumkoncentration ( $C_c = MIC$ ) befinder sig i agaren til forskellige tider efter diffusionens start. Hvis koncentrationen i depotet ( $C_0$ ) er  $100 \cdot C_c$  ( $C_c = MIC$ ), så vil MIC som en koncentrationsfront fortsat diffundere perifert ud i agaren i forsøgsperioden på knap 2 døgn, og de tidspunkter hvor MIC når forskellige punkter i agaren er angivet ved den øverste kurve på figuren. Hvis koncentrationen i depotet er  $33 \cdot MIC$ , så vil koncentrationsfronten efter ca. 1 døgn diffusion perifert ud i agaren "vende", idet koncentrationen falder perifert, så fronten nu bevæger sig centralt. Dette er angivet ved den midterste kurve. Dette er endnu mere udtalt hvis koncentrationen i depotet kun er  $10 \cdot MIC$ , idet MIC fronten efter ca. 8 timer "vender" og bevæger sig centralt. Dette er angivet ved den nederste kurve på figuren. Disse forhold har indflydelse på hæmningszonens skarphed. MIC-frontens "vending" betyder at MIC ligger praktisk taget stille (konstant) i en given afstand over en vis tid. Falder denne periode tidsmæssigt sammen med hæmningszonens markering (synlig vækst), bliver zonen skarpest. Også i denne figur ses det, at afstanden mellem punkter med en given koncentrationsforskæl øges med diffusionstiden, og fig. 4 anskueliggør således også prædiffusionsprincippets fordel, som det senere skal omtales nærmere (sml. med fig. 1 i kap. 39).

#### *Ligning (8) anvendt til resistensbestemmelse (regressionskurven)*

Såfremt depotets koncentration ( $C_0$ ) og radius ( $r$ ), den kritiske tid ( $T$ ) og diffusionskonstanten ( $D$ ) er faste størrelser i en forsøgsopstilling, vil måling af zonestørrelsen ( $R$ ) medføre, at den kritiske koncentration ( $C_c = MIC$ ) kan bestemmes ud fra ligning (8). Ved anvendelse af logaritmer bliver ligning (8) til:

$$\ln C_c - \ln C_0 + \ln \left( \frac{4DT}{r^2} \right) = - \frac{R^2}{4DT}$$

eller:

$$\log C_c - \log C_0 + \log \left( \frac{4DT}{r^2} \right) = - \frac{R^2}{4DT} \cdot 0,4343 \quad \text{ligning (9)}$$

( $\log e = 0,4343$ )

eller:

$$R^2 = - \frac{4DT}{0,4343} \cdot \log C_c + \frac{4DT}{0,4343} (\log C_0 - \log \left( \frac{4DT}{r^2} \right)) \quad \text{ligning (10)}$$

dvs. i et semilogaritmisk koordinatsystem med abscissen =  $\log C_c$  (=  $\log MIC$ ) og ordinaten = kvadratet på hæmningszonens radius vil ligning (10) beskrive en ret linie ( $R^2 = \alpha \cdot \log$

(MIC) +  $\beta$ ) med hældningskoefficienten  $\alpha = -\frac{4DT}{0,4343}$ . Denne rette linie kaldes *regressionskurven*, og den fastlægges eksperimentelt for en række stammer ved bestemmelse af samhørende MIC-værdier og hæmningszoner (se kap. 39 side 379) og bruges derefter til at bestemme en ukendt bakteriestammes følsomhed (MIC) over for et givet antibiotikum ved hjælp af eksperimentel zonestørrelsесbestemmelse efterfulgt af aflæsning på regressionskurven. Det forudsættes, at den ukendte stamme undersøges under såvidt muligt de samme betingelser som dem, hvorunder regressionskurven er fastlagt. I stedet for MIC kan man anvende  $IC_{50}$ , som er den koncentration som hæmmer væksten 50%.

#### *Ligning (8) anvendt til koncentrationsbestemmelse (standardkurven)*

Såfremt den kritiske koncentration ( $C_c = MIC$ ), den kritiske tid (T) og diffusionskonstanten (D) er faste størrelser i en forsøgsopstilling, vil måling af zonestørrelserne (R) for en række kendte og enkelte ukendte koncentrationer af et antibiotikum ( $C_0$ ) i depoter (med radius = r) på samme plade muliggøre at de ukendte koncentrationer kan bestemmes ud fra ligning (8), idet man omformer den deraf afledte ligning (9) til følgende:

$$R^2 = \frac{4DT}{0,4343} \cdot \log C_0 - \frac{4DT}{0,4343} (\log C_c + \log \frac{4DT}{r^2}) \quad \text{ligning (11)}$$

dvs. i et semilogaritmisk koordinatsystem med  $\log C_0$  som abscisse og kvadratet på hæmningszonens radius som ordinat vil ligning (11) beskrive en ret linie  $R^2 = \alpha \cdot \log (depotets\ antibiotikumkoncentration) - \beta$  med hældningskoefficienten  $\alpha = \frac{4DT}{0,4343}$ . Denne rette linie kaldes *standardkurven*, og den bestemmes eksperimentelt for en kendt stamme med en række kendte  $C_0$ -værdier (dvs. en kendt fortyndingsrække). Hæmningszonerne for de ukendte oplosninger (fx. serum) aflæses og omsættes via standardkurven til koncentrationsværdier for prøverne (se kap. 40).

#### *B. Samspillet mellem diffusion og bakterievækst ved hæmningszonens dannelse*

Fig. 5 og 6 viser Bangs (1970a) opfattelse af hæmningszonens dannelse.

I fig. 5 er positionen af den kritiske koncentration ( $C_c = MIC$ ) af et antibiotikum over for en given bakteriestamme beregnet efter forskellig diffusionstid iflg. Vesterdal (1947a, b) (ligning (8)). Det ses, at  $C_c$  bevæger sig stadig langsommere perifert med tiden. På fig. 6A ses en almindelig eksponentiel vækstkurve, og på fig. 6B er tidsaksen transformeret til en afstandsakse, og det er beregnet hvor mange bakterie-generationer, der kan nå at fremkomme i de pågældende afstande ( $R_1$  til  $R_6$ ) fra diffusionscentrum, inden den kritiske koncentration har nået det pågældende sted, og bakteriedelingen ophører. Da  $C_c$  bevæger sig stadigt langsommere perifert, fås et meget brat stigende antal bakterier i et bestemt, meget snævert område. Det vil sige, at der vil være en meget kort afstand mellem det sted på agaren, hvor inoculum-cellene kun har delt sig få gange (makroskopisk usynlig vækst) før hæmningen indtræder, og til det sted hvor de har delt sig uhæmmet mange gange (makroskopisk synlig vækst), og dette forhold forklarer hæmningszonens skarpe afgrænsning, man kan tale om en slags potenseret eksponentiel vækst, når den afbildes grafisk som i fig. 6B.

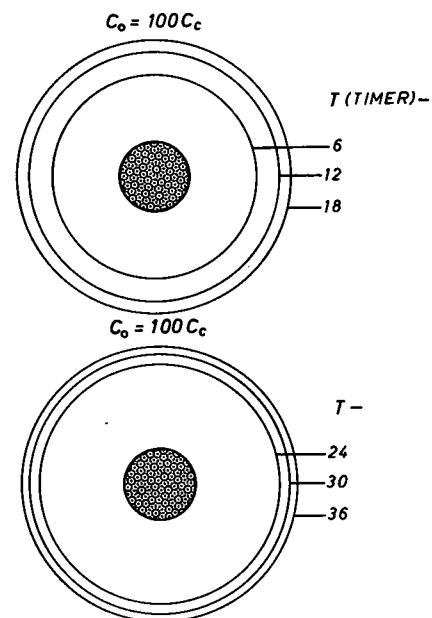


Fig. 5. Grafisk fremstilling af positionen af den kritiske koncentration ( $C_c = \text{MIC}$ ) i agaren på forskellige tidspunkter ( $T = \text{timer}$ ) efter diffusionens start. Antibiotikumkoncentrationen i depotet er  $100 \cdot \text{MIC}$  ( $C_0 = 100 \cdot C_c$ ) (gengivet efter Bang (1970a)).

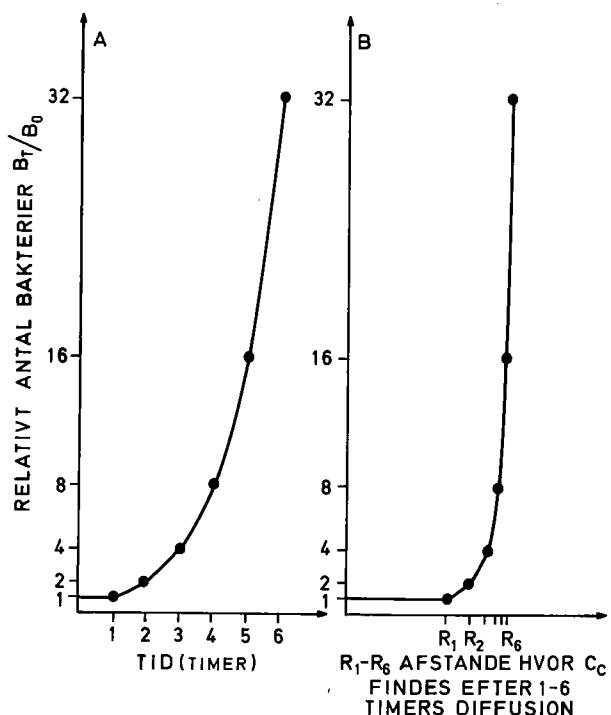


Fig. 6. A: Eksponentiel vækstkurve. Abscisse = tiden, ordinat = antal bakterie-generationer,  $\frac{B_T}{B_0}$ , hvor  $B_0$  er bakterietallet til tiden 0, og  $B_T$  er bakterietallet til tiden  $T$ .  $\frac{B_T}{B_0}$  angiver således, hvor mange gange  $B_0$  er forøget i tiden  $T$  (= antal bakteriegenerationer) (gengivet efter Bang, 1970a). B: Ordinat som på fig. A. Abscissen er transformert til en afstandssakse, idet det er beregnet hvor langt ude i agaren den kritiske koncentration ( $C_c = \text{MIC}$ ) vil befinde sig efter 1-6 timers diffusion (gengivet efter Bang (1970a)).

Cooper et al. (1958) forklarer zonedannelsen ud fra den antagelse, at det kritiske bakterietal er i stand til at adsorbere den tildiffunderende antibiotikummængde, hvorved de perifert herfor liggende bakterier beskyttes mod antibiotikumeffekten. Denne adsorptionsantagelse er ikke nødvendig ifølge Bangs beregninger (1970a) (fig. 5 & 6), og desuden er betingelsen for denne adsorption ikke opfyldt i overfladeinkulerede plader. For yderligere diskussion af disse problemer henvises til originalitteraturen.

Vesterdal (1947a) har ved forsøg med *S. aureus* og penicillin vist, at hæmningszonerne, som bliver synlige efter 4 timers inkubation, omgives af en bræmme af partiell hæmmet, synlig vækst, og denne partielle hæmning bliver mere tydelig efter 6-8 timers inkubation. Ved store hæmningszoner er væksten i den partielt hæmmede zone klar og gennemsigtig, hvilket skyldes en lysering af bakterierne forårsaget af den fortsatte diffusion med stigende koncentration af antibiotikum ved hæmningszonernes grænse (se fig. 3 & 4). Dette gør, at hæmningszonen vokser lidt og først bliver stationær efter ca. 12 timers inkubation. Ved små hæmningszoner er bræmmen af partiell vækst uklar og skyldes resistente varianter. Zonegrænsens skarphed er også betinget af forholdet  $\frac{MIC}{C_0}$  på tidspunktet hvor zonen markeres (fig. 4).

#### *Faktorer af betydning for hæmningszonens dannelse (ligning (8))*

*Diffusionskonstanten (D)* angiver det antal molekyler, der diffunderer gennem en areal enhed i et givet tidsrum, når koncentrationsfaldet er 1 mol pr. længdeenhed. D angives normalt i  $\text{mm}^2/\text{sek}$ . I en opløsning af sfæriske molekyler med radius  $r$  og viskositeten  $\eta$ , kan D bestemmes ved hjælp af den Sutherland-Einstein'ske ligning:

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta Nr},$$

hvor R = gaskonstanten, T = den absolutte temperatur, og N = Avogadro's tal. Det vil sige at D er proportional med den absolute temperatur og omvendt proportional med molekylestørrelsen og opløsningens viskositet. Det vil igen sige, at for et givet antibiotikum under givne forsøgsbetingelser kan D betragtes som konstant, medens antibiotika med høje molekulvægte alt andet lige vil diffundere langsommere end antibiotika med lave molekulvægte.

*Den kritiske tid (T)* er tidsrummet fra diffusionens start til det tidspunkt, hvor væksten er så langt fremme, at zonegrænsen markeres. Under forhold hvor diffusion og vækst starter samtidig kan den kritiske tid altså udtrykkes i relation til bakterievæksten som lag-fasen + tiden til det nødvendige antal bakteriedelinger:

$$T = L + n'G = L + G \cdot \log_2 \frac{N'}{N_0} \quad \text{ligning (12)}$$

hvor  $T$  = den kritiske tid,  $L$  = lag-fasens varighed,  $G$  = generationstiden, og  $n'$  = antal bakteriedelinger før væksthæmningen indtræder ( $= \log_2 \frac{N'}{N_0}$ , hvor  $N_0$  = inoculum og  $N'$  er det kritiske antal bakterier).

I almindeligt rutinearbejde tages inoculum fra en udvokset kultur (som befinder sig i den stationære fase eller i deklinationsfasen). Der vil derfor altid være en lag-fase, som er arts- og stammeafhængig. Den vil forlænges, hvis inoculum er lille og er i øvrigt afhængig af substrat, dyrkningstemperatur og andre fysiske miljøfaktorer samt tilstedeværelsen af toksiske stoffer.

Generationstiden i den logaritmiske vækstfase er ligeledes afhængig af substratet og temperaturen og af arts- og stammeegenskaber. Hvis man antager, at en kultur efter inkulation gennemgår ca. 8 delinger, før det kritiske bakterietal er nået, bruger en hurtigtvoksende *E. coli* under optimale forhold ca. 160 min. hertil. Anvender man et større inoculum, vil et mindre antal delinger selvfølgelig kræves, før det kritiske antal bakterier nås, hvorfor den kritiske tid forkortes tilsvarende. Indføres en prædiffusionsperiode før tilslåning af substratet, forlænges den kritiske tid tilsvarende, så ligning (12) kan skrives:

$$T = P + L + n'G$$

ligning (13)

hvor  $P$  er prædiffusionstiden. Hvis  $P$  er stor, vil variationer i lag-fase, delingstid og inoculums størrelse få relativt mindre indflydelse på  $T$ .

#### *Depotets form og udstrækning samt mængden af antibiotikum i depotet*

I ligning (8) indgår depotets antibiotikumindhold kun ved radius  $r$  og koncentrationen  $C_0$  hvor  $r^2 C_0$  i realiteten er en beregning af det antal molekyler, der ved diffusionens start er anbragt i *et punkt* i centrum. Ligning (8) har *ingen* korrektion for anvendelsen af *et hul* med radius  $r$  i stedet for et punkt (se side 364). Ud fra ligning (10) ses, at denne størrelse kun har betydning for hvor regressionskurven krydser ordinataksen, men ikke for dens hældning, som bestemmes af  $D$  og  $T$ , dvs. ved ændringer i depotets antibiotikumindhold sker der kun en parallel forskydning af regressionskurven. Heraf følger at med stigende antibiotikumindhold øges zonernes størrelse med det resultat, at stadigt mere resistente stammer også viser hæmningszoner.

Hvilken depotform ("ditch", "cup", cylinder, "disc" eller tablet) og hvilket antibiotikumindhold, der bør foretrækkes, afgøres først og fremmest af praktiske hensyn. Den principielle forskel, at ditch og cup betinger en todimensional diffusion i modsætning til den tredimensionale diffusion fra de øvrige depotformer, har ingen større praktisk betydning. Disc'ene og tabletterne har den fordel, at de kan færdigfremstilles industrielt, og i tørrede discs og især i tabletter er antibiotikum meget holdbart. Andre depoter må friskfremstilles i tilslutning til hver bestemmelse. Tabletter og tørrede discs opsuger den nødvendige væskemængde fra agaren, hvorved antibiotikum opløses og bliver diffusibelt, og meget høje koncentrationer af antibiotikum opnås i starten lige omkring depotet sammenlignet med de

koncentrationer, der opnås omkring en agar-cup (Murayama 1959). Kun en mindre del af den samlede mængde i tabletter og discs er straks diffusibelt, og først efterhånden som mere væske opsuges, opløses det resterende indhold. I tabletterne er det dog kun en mindre mængde af indholdet, som bliver diffusibelt under almindelige forhold (Murayama 1959). Der bør derfor skelnes mellem *indhold* og *diffusibel mængde* i disc og tablet, idet disse to størrelser ikke altid falder sammen. Der skal således ca. 2,5 gange så meget antibiotikum i en tablet som i en disc for at opnå sammen zonestørrelse uden prædiffusion. Foretages bestemmelsen efter 20 timers prædiffusion, giver tabletterne de største zoner, hvilket er udtryk for, at en større del af den resterende mængde nu er opløst og diffunderet ud (Thomsen 1967). Discs med så forskellig diameter som fra 5 mm (Ericsson et al. 1954) op til 20 mm (Jensen & Kiær 1948) har været benyttet med udmærket resultat. Hvis samme antibiotikum-mængde indeholderes i en stor og en lille disc, vil det gælde, at den store giver de største zoner med de meget følsomme stammer, mens den lille disc sammenlignet med den store giver relativt større zoner med de mindre følsomme stammer. Dette skyldes, at den store disc suger mere væske, koncentrationen bliver derfor lavere, men discens størrelse bevirker at depotet fra starten har en større udstrækning. Er stammen meget følsom vil zonen derfor blive stor, men er stammen mindre følsom, vil MIC ikke eller kun mere kortvarigt opnås omkring depotet. Omvendt forholder det sig med den lille disc der suger tilsvarende mindre væske, men derved har højere koncentration i depotet (Thomsen 1967).

### 3. Almene dyrkningsbetingelser ved diffusionsforsøg

#### *Substratet*

Substratets sammensætning og tykkelse spiller en rolle for zonestørrelsen, og denne afhængighed kan give sig udtryk på forskellig måde:

- (1) *Ændring af bakteriernes vækst*
- (2) *Ændring af antibiotikas aktivitet*
- (3) *Ændring af antibiotikas diffusion*

Sammensætningen af substratet skal afpasses, således at de stammer der skal undersøges vokser godt, og desuden bør substratet ikke indeholde stoffer, der hæmmer antibiotikas aktivitet. Der findes ikke noget specielt "rigtigt" medium til rutineformål, og det man vælger må baseres på overvejelser med hensyn til relativ egnethed, reproducerbarhed og pris. Almindeligvis bruges et isotonisk medium som kødvandsbouillonagar, hvortil er sat 5-10% defibrineret hestebloed og eventuelt andre stoffer. Som eksempler kan anføres Mueller-Hinton agar (Ericsson & Sherris 1971) og Seruminstittutts resistenssubstrat (se kap. 39 side 390). God reproducerbarhed er af afgørende betydning.

### *Glukose og pH*

Glukosetilsætning bruges som uspecifikt væksttilskud. Under glukosens omsætning dannes syrer, der nedsætter substratets pH, hvilket kan ændre den antibiotiske aktivitet, således at fx. erytromycin- og aminoglykosidzonerne bliver mindre og tetracyklin- og meticillinzonerne større (Ericsson & Sherris 1971). Mængder på 0,5–1% glukose har dog ingen indflydelse på zonestørrelsen. Almindeligvis anbefales, at pH i substratet er omrent som legemets: 7,3–7,4, hvorved stoffet jo skal virke i de fleste tilfælde (Thomsen 1967).

### *Blod*

Tilsætning af blod til substratet har flere formål. En del bakterier kræver serum for at kunne vokse. Desuden tillægger man almindeligvis blodet en vis afgiftende funktion, specielt over for væksthæmmende stoffer i agar, og endelig vil angiveligt sulfonamidantagonister neutraliseres af lyseret hesteblood på grund af dets indhold af thymidin fosforylase (Ferone et al. 1975). Citratblod er uegnet i forbindelse med nogle antibiotika (fx. tetracyklin), da divalente katjoner i substratet bindes, hvorved zonerne bliver større. I reglen anvendes 5–10% defibrineret hesteblood (Thomsen 1967; Ericsson & Sherris 1971).

### *Agar*

Substratet bør være så fast, at inokulatet kan spredes og disc'ene ligge fast, og det opnås ved tilsætning af 1–2% agar, hyppigst 1,2%. Agarindholdet kan varieres fra 0,5% til omkring 4% uden væsentlige ændringer i vækstforholdene, men ved stigende agarkoncentration bliver diffusionen langsommere, og nogle antibiotika med en molekylvægt på over 500 viser aftagende zonestørrelse (Ericsson et al. 1954; Ericsson & Svartz-Malmberg 1959; Thomsen 1967). Agartypen har også indflydelse på resultaterne, idet fx. aminoglykosider, tetracyklin og polymyxin giver mindre zoner med almindelig agar end med særligt renset agar (fx. Ionagar), hvilket skyldes dels at disse antibiotika i højere grad synes at bindes til almindelig agar, dels at der er færre divalente katjoner i renset agar. Problemets har specielt betydning ved resistensbestemmelse af *Pseudomonas aeruginosa* over for aminoglykosider (Thomsen 1967; Ericsson & Sherris 1971).

### *Pepton*

Peptoner sættes til de fleste gængse bakteriologiske substrater af hensyn til væksten, men ved resistensbestemmelse ødelægger de ofte målingen af sulfonamidfølsomheden. Grunden er, at mange peptoner indeholder sulfonamidantagonister, som forårsager at zonestørrelsen bliver mindre eller ophæves. Også streptomycin- og klortetracyklinzonerne bliver mindre ved tilstedevæ-

relse af pepton. Af disse grunde bliver der ikke anvendt sædvanlig kødpepton i substratet ved resistensbestemmelse og koncentrationsmålinger (Erlandson 1951; Thomsen 1967), men NZ-amin.

#### *Uorganiske stoffer*

Divalente katjoner (fx.  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ) kan nedsætte zonestørrelsen for tetracyklin ved at bindes til dette stof, men denne effekt modvirkes delvis af fosfat. Divalente katjoner, især  $\text{Mg}^{++}$  og  $\text{Ca}^{++}$ , øger også bakteriernes, især *P. aeruginosa*'s, resistens over for polymyxin og navnlig aminoglykosider med øget MIC og nedsat zonestørrelse til følge. 20–35 mg  $\text{Mg}^{++}$  og 50–100 mg  $\text{Ca}^{++}$ /l anbefales til Mueller-Hinton agar (WHO 1976). Ved så høje elektrolytkoncentrationer vil dog resistensbestemmelsen for mecillinam ikke give reproducerbare hæmningszoner.

#### *Lagtykkelsen*

Går hullet som ved agar-cup teknikken igennem hele substratlaget, og fyldes det til randen med antibiotikumopløsningen, spiller lagtykkelsen ingen rolle. Hvis diffusionen foregår fra et overfladepot som fx. en disc eller en tablet, får lagtykkelsen af substratet betydning. De Beer & Sheerwood (1945) fandt et liniært forhold mellem hæmningszonens diameter og logaritmen til lagtykkelsen, hvilket betyder at den af lagtykkelsen betingede variation i zonestørrelse (øget tykkelse = mindre zoner) er størst ved tynde plader og reelt betydningsløs ved en lagtykkelse på over 6–7 mm (Thomsen 1967; Ericsson & Sherris 1971). I almindelighed bruges en lagtykkelse på 6 mm.

#### *Dyrkningstemperaturen*

Dyrkningstemperaturen er af betydning for zonernes størrelse ved at påvirke dels bakteriernes vækst, dels, men i ringe grad, diffusionen. Generelt gælder, at jo længere fra en bakteriestammes temperaturopimum den aktuelle temperatur er, des langsmmere vil stammen vokse og desto større vil zonen blive. Når en plade sættes ind i en termostat, vil den nå inkubationstemperaturen ( $37^{\circ}\text{C}$ ) i løbet af ca. 1 time, ret uafhængigt af om den tages fra køleskab eller stueterminatur. Stilles 5 plader i stabel, vil den midterste først nå termostattemperaturen efter 4 timer, og hvis stablen er omgivet af andre stabler, kan der gå op til 5 timer. Forsinket opvarmning betyder langsmmere vækst og dermed større hæmningszoner (Cooper & Linton 1952), mens diffusionen er væsentlig mindre afhængig af sådanne temperaturforskelle (det skyldes at diffusionskonstanten er proportional med den absolute temperatur).

*Specielle krav til substratet*

Nogle bakterier kræver særlige vækstfaktorer (fx. thymidin, NAD, se kap. 39 side 390), som må sættes til standardsubstratet, fx. ved at sprede en oplosning af vækstfaktoren på agaroverfladen. Ved undersøgelse af *S. aureus* for meticillinresistens finder man, at stammerne er heteroresistente, dvs. at kun en lille del af kolonierne viser øget resistens over for meticillin. De resistente gror ofte som små kolonivarianter med defekt cellevæg på isotone medier, mens der udvikles større kolonier på hypertone medier indeholdende fx. 5% NaCl. Disse resistente varianter afsløres imidlertid lettest ved inkubering ved 30°C, som derfor anbefales til dette formål (Ericsson & Sherris 1971).

*Dyrkningsatmosfære*

10% CO<sub>2</sub> i dyrkningsatmosfæren kan influere på zonestørrelsen, dels ved at ændre visse bakteriearters væksthastighed, dels ved at ændre pH i substratets overflade. Zonestørrelsen bliver således mindre med aminoglykosider og erytromycin og større med tetracyklin, meticillin og novobiocin i CO<sub>2</sub>-atmosfære (Ericsson & Sherris 1971). CO<sub>2</sub> bør derfor undgås, hvis det ikke er nødvendigt for væksten. Anaerob inkubation foretages oftest i en atmosfære, som også indeholder CO<sub>2</sub>. Aminoglykosidernes aktivitet falder stærkt under anaerobe forhold, hvorfor fakultativt aerobe bakterier aldrig bør resistensbestemmes under anaerobe forhold over for aminoglykosider. Zonedannelsen under anaerobe forhold adskiller sig i øvrigt ikke principielt fra zonedannelsen under aerobe forhold, og agardiffusionsmetoderne kan udmærket anvendes til resistensbestemmelse under anaerobe forhold (Sapico et al. 1972; Dornbusch et al. 1975a, b; Kwok et al. 1975).

**Referencer:** se referencelisten efter kapitel 40.

## *Kapitel 39*

### **Resistensbestemmelse**

#### **Standardisering af agardiffusionsmetoden specielt med henblik på anvendelse af prædiffusionen**

Det er tidligere beskrevet, at bortset fra MIC, diffusionskonstanten og depotkoncentrationen er de øvrige faktorer, som influerer på zonesørrelsen afhængige af den kritiske tid T. Denne er sammensat af lag-fasen L, delingstiden G, det kritiske bakterietal N' og bakterietallet i inoculatet N<sub>o</sub> som angivet i ligning (12), og de variationer i hæmningszonerne, der skyldes samspillet mellem diffusion og vækst, kan derfor henføres til lag-fase, delingstid og inoculat, da det kritiske bakterietal regnes for konstant (Cooper et al. 1958).

$$\text{Ligning (12)} : T = L + G \cdot \log_2 \frac{N'}{N_o}$$

En standardisering af T, som er af betydning for at opnå sammenlignelige resultater fra prøve til prøve, er vanskelig, men kan tænkes foretaget på flere måder: 1) Samtlige led på ligning (12)'s højre side holdes konstant; 2) der korrigeres for variationer i de enkelte led eller der foretages en samlet korrektion; 3) et eller flere led på ligningens højre side øges i størrelse, således at variationer i de enkelte andre led får mindre betydning for den samlede størrelse; 4) der indføres en prædiffusionsperiode P, som gøres stor, hvorved hele ligningens højre side øges med en konstant, som er stor i forhold til de øvrige led.

*ad 1):* I modsætning til, hvad der er muligt ved måling af antibiotikumkoncentrationer, kan en fuldstændig standardisering af de enkelte led ikke gennemføres i resistensbestemmelserne, fordi både stamme og inoculumstørrelse varierer fra forsøg til forsøg. Inoculum kan standardiseres i en vis udstrækning, såfremt bestemmelserne udføres på subkultur (sekundært), mens dette er nærmest umuligt, hvis bestemmelserne udføres direkte på prøvemateriale (primært). Forskellen i delingstiden mellem forskellige arter lader sig heller ikke eliminere.

*ad 2):* Muligheden for at korrigere for variationer i lag-fasens længde, væksthastighed og inoculumstørrelse, ved at bestemme standardkurvens (liniens)

hældningskoefficient foreligger, da dette kan gøres eksperimentelt ved at bestemme to af liniens punkter, dvs. gennemføre resistensbestemmelsen ved to forskellige depotstyrker (se ligning (11) kap. 38). Herved bliver det muligt at fastlægge standardkurven (som det jo også gøres ved antibiotikumkoncentrationsmålinger) og korrigere for hældningsvariationer, når en referencekurve for en stamme med kendt følsomhed er bestemt på forhånd. Dette er imidlertid besværligt og vanskeliggøres yderligere ved, at der dagligt skal skaffes en referencekurve for hvert antibiotikum til de nødvendige korrektioner.

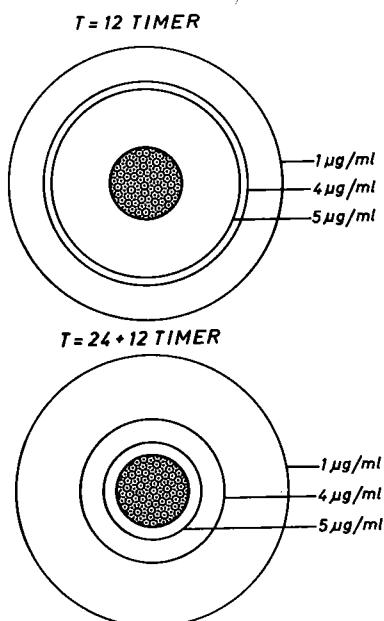
*ad 3):* En anden fremgangsmåde består i at lag-fasen forlænges med et vist antal timer ved at anbringe pladerne i køleskab eller ved stuetemperatur straks efter at man har tilsæt og startet diffusionen (Ericsson et al. 1954). I køleskab opnås fuldstændig vækststandsning, mens nogle stammer kan vokse ved stuetemperatur. Resultatet er, at diffusionen stort set forløber uændret, omend lidt langsommere, mens væksten standser, hvorved lagfasen forlænges med antallet af timer i køleskabet. Metodens væsentligste ulempe er, at bestemmelsen forsinkes med hele perioden ved lav temperatur. Afkortes denne til fx. 3 timer, mistes fordele ved fremgangsmåden i nogen grad, idet diffusionsgradienten først kan betragtes som relativt "stabil" noget senere (Thomsen 1967)(fig. 3, kap. 38 og fig. 1 i dette kap.). En mere teoretisk indvending er, at antibiotikas effekt på forskellig måde er afhængig af bakteriernes metaboliske status (se nærmere hos Thomsen 1967).

*ad 4):* Hvis inokuleringen først foretages efter en prædiffusionsperiode kan ligning (12) skrives således:

$$T = P + L + G \cdot \log_2 \frac{N'}{N_0}$$

dvs. at den kritiske tid øges med  $P$  = prædiffusionsperioden, og er denne stor vil variationer i de andre faktorer blive af relativt ringe betydning og  $T$  derfor i praksis bestemmes af  $P$ . En prædiffusionsperiode på 20 timer ved stuetemperatur har vist sig velegnet og praktisk, da diffusionsgradienten er stabiliseret og pladerne kan fremstilles dagen før. Ved anvendelse af en prædiffusionsperiode af denne længde er usikkerhedsmomenterne forårsaget af samspillet mellem diffusion og vækst derfor reduceret og faktisk i stor udstrækning elimineret (Thomsen 1967). Yderligere vil en længere prædiffusionsperiode medføre, at resitive stammer får mindre zoner, mens følsomme stammer får større zoner (Thomsen 1967; Bang 1970a, b) (se også fig. 1).

Med hensyn til yderligere diskussion af prædiffusionens fordele henvises til Thomsen (1967).



*Fig. 1: Grafisk fremstilling af positionen af tre forskellige antibiotikumkoncentrationer efter 12 timers diffusion i agaren (øverst) og efter 36 timers diffusion (nederst), dvs. svarende til forholdene uden, henholdsvis med 24 timers prædiffusion (gengivet efter Bang 1970a).*

Der er to problemer i forbindelse med inoculatets størrelse, som ikke løses ved anvendelse af en prædiffusionsperiode.

*Stammer der producerer ekstracellulært β-laktamase:* Sådanne stammers MIC og hæmningszone over for β-laktam-antibiotika (penicilliner og cefalosporiner) er stærkt afhængig af præformeret mængde af β-laktamase (som nedbryder β-laktam-antibiotika) i inoculum, og denne mængde stiger naturligvis med stigende inoculum. Prædiffusion er helt uden indflydelse på dette forhold. Et lille inoculum kan bevirke, at β-laktamase-producerende stammer fejlagtigt bestemmes som helt eller delvis følsomme for β-laktam-antibiotika, og et stort inoculum påvirker MIC-bestemmelsen, således at værdien kan øges med en faktor 100.

*Sulfonamidinhibitorer i inoculum:* p-aminobenzoesyre modvirker sulfonamids væksthæmning på sulfa-følsomme bakterier. Sulfonamid-antagonister produceres af mange bakteriearter under væksten, og den tilstedeværende mængde er derfor afhængig af inoculums størrelse. Et for stort inoculum vil bevirke, at nogle sulfa-følsomme stammer fejlagtigt bestemmes som resistent (Erlandson 1951; Thomsen 1967).

### Relationen mellem zonestørrelse og bakteriestammers følsomhed over for antibiotika ved resistensbestemmelse (regressionskurven)

Denne relation fremgår af ligning (10) i kap. 38. I praksis foretages eksperimentelt en bestemmelse af regressionskurven for et givet antibiotikum ved en samtidig bestemmelse af MIC eller  $IC_{50}$  ved agarfortyndingsmetoden og af hæmningszonen ved agardiffusionsmetoden, idet man benytter et stort antal stammer (helst over 100) dækkende alle klinisk relevante følsomhedsniveau'er. Stammerne skal være af forskellig art, repræsenterende almindeligt forekommende, humant patogene arter med forskellig væksthastighed og helst nyligt isolerede (Ericsson & Sherris 1971). Ifølge ligning (10) i kap. 38 er der en liniær relation mellem kvadratet på hæmningszonens radius og logaritmen af MIC (eller  $IC_{50}$ ), men i praksis er der også en næsten liniær relation mellem zonediameteren og log MIC, som derfor almindeligvis anvendes.

### Bestemmelse af MIC eller $IC_{50}$ ved agarfortyndingsmetoden

Metoderne er nøje beskrevet af Thomsen (1967) og Ericsson & Sherris (1971), også med begrundelse for hvorfor agarfortyndingsmetoden foretrækkes fremfor bouillonfortyndingsmetoden, skønt de stort set giver samme MIC-resultater (se også side 388-389). Siden midten af 1950'erne har man til penicillin og de fleste andre antibiotika anvendt 5% blodagarplader indeholdende pepton og til sulfonamider og trimetoprim 10% blodagar uden pepton. Af reference-mæssige grunde har man fastholdt brugen af disse substrater ved fortyndingsmetoden, mens substratet til diffusionsmetoden har været ændret flere gange i tidens løb (angående substratsammensætningen se side 54 i Thomsen 1967). Fremgangsmåden er følgende:

Der fremstilles en 2-folds fortyndingsrække af det pågældende antibiotikum i pladerne. Der benyttes fx. 10 fortyndingstrin dækkende det klinisk relevante koncentrationsområde, samt en kontrolplade uden antibiotikum. Pladerne skal helst bruges inden for det første døgn, men kan dog holde sig 1 uge i plastposer ved 4°C uden at antibiotikumaktiviteten falder væsentligt. Hver plade inddelles i et passende antal felter, således at mange stammer kan testes på samme plade. Et inoculum af størrelsesordenen  $10^2 - 10^3$  kim anbringes pr. felt på ca. 1 cm<sup>2</sup>. Dette opnås ved at tilså feltet med en øsefuld af en fortyndet døngammel serumbouillonkultur (eller med en mekanisk multi-inoculator, der muliggør samtidig tilsåning med fx. 16 stammer). Serumbouillonkulturerne fortyndes efter følgende skema:

Gramneg. stave og stafylokokker:  $10^{-3}$

Enterokokker og gramneg. kokker:  $10^{-2}$

Pneumokokker, andre streptokokker og coryneforme stave:  $10^{-1}$

Der inkuberes i 16–20 timer ved 35–37°C. Ved langsomt voksende bakterier (fx. nogle anaerobe) kan 2 døgns inkubation være nødvendig, hvis kontrolpladen ikke viser synlig vækst før efter 48 timer.

De fleste (ifølge Ericsson & Sherris 1971) aflæser derefter MIC som den laveste koncentration der giver komplet væksthæmning vurderet med det ubevæbnede øje, men det anbefales dog at se bort fra en enkelt koloni eller en knap synlig film af vækst. Det er imidlertid biologisk mere korrekt at beregne  $IC_{50}$  efter Kärbers metode af følgende grunde: 1) Betydningen af inokulatets størrelse elimineres vidtgående, idet stort inoculum giver højere MIC på grund af resistente varianter, der ofte optræder med en hyppighed på  $10^{-5} - 10^{-6}$ . 2) Kärber-metoden er en gennemsnitsberegning og derfor ikke så påvirkeligt af målefejl som en enkelt observation. 3) Det "net" af doser ( $\frac{1}{4}$  fortyndingstrin), hvormed man "indfanger" titeren, er finere med Kärber-metoden end hvis man blot angiver MIC (é et fortyndingstrin); forskellen ligger i aflæsningsmetoden, idet fortyndingsrækkerne er de samme.

*Aflæsning af  $IC_{50}$  efter Kärbers metode:* Ved aflæsningen opdeles væksten i 5 vækstgrader: 0, 1, 2, 3, 4, svarende til 0, 25%, 50%, 75% og 100% vækst, hvor væksten i de enkelte felter sammenlignes med væksten i et antibiotikumfrit kontrolfelt. Aflæsningen forudsætter ideelt, at vækstforskelle på 25% er erkendelige, hvilket kun er muligt med et forholdsvis moderat inoculum, der giver 100–200 kolonier pr. felt. Et mindre inoculum giver for stor usikkerhed, idet spredningen på de enkelte tællinger (= kvadratrodens af kolonitallet som følger Poisson-fordelingen) bliver for stor, og et større inoculum vil medføre, at mere end 25% skal hæmmes for at væksttætheden vurderes som nedsat til 75%. I praksis anvendes oftest et inoculum på ca.  $10^3$  kim og aflæsningen foretages subjektivt ved sammenligning med vækst på kontrolpladen. Denne sættes = 4 (100%). En reel reduktion til 50% vil under disse forhold ikke kunne iagttages, og sandsynligvis svarer den vækstgrad der angives ved 2 til en absolut reduktion i væksten på 90–95% (Reyn et al. 1963). Aflæsningen foretages fx. således:

Fortynding	Vækstgrad
1	0
1/2	0
1/4	0
1/8	0
1/16	0
1/32	0
1/64	1
1/128	2
1/256	3
1/512	4
Kärbersum =	10

Vækstgraderne summeres til Kärbersummen (her = 10), og derefter slås Kärbertallet op i en tabel eller beregnes. Kärbertallet er logaritmen til  $IC_{50}$  og beregnes således:

$$\log IC_{50} = \text{Kärbersummen} \cdot 0,07525 - (\text{antal plader} - 0,5) \cdot 0,3010 \quad \text{ligning (14)}$$

hvor 0,3010 er logaritmen til fortyndingsfaktoren 2 og 0,07525 er 1/4 heraf (svarende til én vækstgrad i aflæsningen). Beregningen ser i ovenstående tilfælde således ud:

$$\log IC_{50} = 10 \cdot 0,07525 - 9,5 \cdot 0,3010 = -2,107, \text{ dvs. } IC_{50} = 1/128 \text{ af udgangskoncentrationen.}$$

I stedet for at bruge fortyndingstrin af en udgangskoncentration til beregningerne kan man anvende de reelle koncentrationer af antibiotikum i pladerne til beregningerne på følgende måde:

Koncentration	Vækstgrad
512 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0
256	0
128	0
64	0
32	0
16	0
8	1
4	2
2	3
1	4
Kärbersum =	10

Beregningen er derefter således:

$$\log IC_{50} = Kärbersum \cdot 0,07525 - 0,5 \cdot 0,3010$$

Ligning (15)

altså i ovenstående eksempel:

$$\log IC_{50} = 10 \cdot 0,07525 - 0,5 \cdot 0,3010 = 0,6020, \text{ dvs. } IC_{50} = 4 \mu\text{g/ml.}$$

Stammer med vækstgrad 3 eller 4 på pladen med højeste antibiotikumkoncentration og stammer med vækstgrad 0 eller 1 på pladen med laveste antibiotikumkoncentration undrager sig  $IC_{50}$ -bestemmelse. I stedet angives i disse tilfælde  $IC_{50}$  som henholdsvis  $> 512$  eller  $< 1 \mu\text{g/ml}$ . Spredningen på denne metode er 0,05 fortyndingstrin (Thomsen 1967).

Til daglig brug er det kun Kärbersummen, der skal beregnes; resten findes tabelleret (Finney 1947; Reyn et al. 1958; Thomsen 1967). Råder man ikke over sådanne tabeller, kan man undgå beregningerne og opslagene i logaritmstabeller ved i stedet for at anvende semilogaritmisk papir. I det sidst anførte eksempel vil fx. en  $IC_{50}$ -værdi på  $128 \mu\text{g/ml}$  betyde, at væksten på pladen indeholdende  $128 \mu\text{g/ml}$  vil være af grad 2, mens væksten på alle pladerne med mindre antibiotikumindhold vil være af grad 4. Det vil sige, at Kärbersummen er  $7 \cdot 4 + 2 = 30$ . Tilsvarende er Kärbersummen ved  $IC_{50} = 64 \mu\text{g/ml} = 6 \cdot 4 + 2 = 26$  etc. I ovenstående eksempel kan man altså opstille følgende tabel over samhørende  $IC_{50}$ -værdier og Kärbersummer for de "hele" fortyndingstrin:

$IC_{50}$	Kärbersum
512	38
256	34
128	30
64	26
32	22
16	18
8	14
4	10
2	6
1	2

Mellem koncentrationerne af antibiotikum og de tilsvarende Kärbersummer er der en liniær relation i et semilogaritmisk koordinatsystem. Afbildes derfor ovenstående koncentrationer ud af den logaritmiske akse og de tilsvarende

Kärbersummer ud af den aritmetiske akse, fås en ret linie. Ved interpolation på denne linie kan de til de mellemliggende Kärbersummer svarende  $IC_{50}$ -værdier aflæses.

Samhørende værdier af  $IC_{50}$  og zonediametrene bestemt ved agardiffusionsmetoden vil herefter kunne anvendes til tegning af regressionskurven i et semilogaritmisk koordinatsystem, hvor  $IC_{50}$  (eller Kärbertallet) afsættes ud ad den logaritmiske akse mod zonediameteren (mm) ud ad den aritmetiske. Herved fås i reglen en ret linie, selv om der teoretisk kun er lineær relation mellem kvadratet på zoneradius (eller kvadratet på diameteren) og  $\log IC_{50}$  (fig. 2). Regressionsliniens beliggenhed kan beregnes af ligning (10), kap. 38, eller ved hjælp af "mindste kvadraters metode", men tegning af regressionslinien anbefales i alle tilfælde, idet afvigelser fra den rette linie og afvigende enkeltresultater bedre afsløres (Ericsson 1960; Thomsen 1967; Ericsson & Sherris 1971).

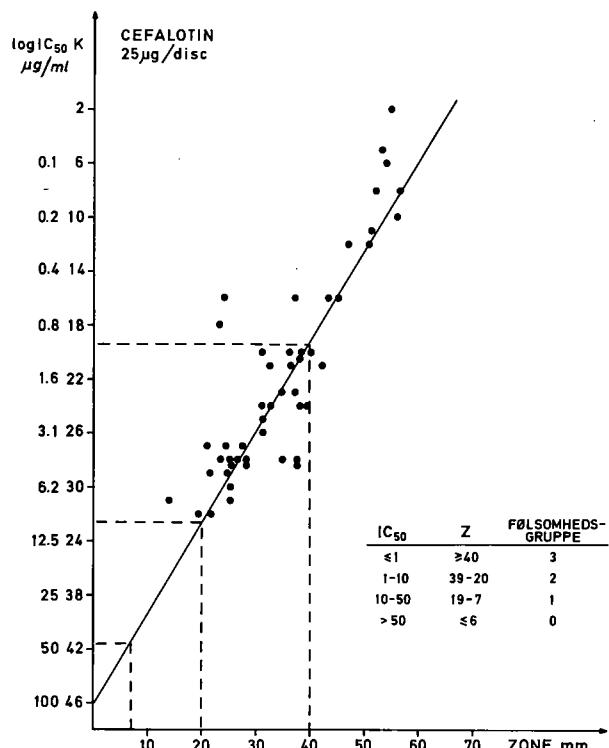


Fig 2: Regressionskurve for cefalotin (25  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ). Ordinat  $\log IC_{50}$  eller Kärbertal (K). Abscisse: diameteren af hæmningszonen. 20 timers prædiffusion. Bemærk at ud ad ordinaten er afsat *faldende* koncentrationer, dvs. at regressionskurvens hældningskoefficient er positiv i modsætning til den negative hældning, som ligning (10) angiver.

### Opstilling af følsomhedsgrupper (aflæsningsskemaet)

En opdeling af antibiotika i grupper (se tabel 1), således at bestemmelsen med eet bestemt stof udstrækkes til at gælde for andre nærtstående antibiotika, er nødvendig af praktiske grunde og medfører, at resultaterne bliver mere eller mindre omtrentlige for de øvrige antibiotika i gruppen, da der sjældent er fuldstændig ensartet virkning af alle stofferne i en gruppe. For videre diskussion herom henvises til Thomsen (1967), WHO Technical Report (1961) og special-litteraturen.

Tabel 2 viser en gruppering af resultaterne fra regressionskurverne i klinisk-bakteriologiske følsomhedsgrader ifølge Thomsens metode (1967), som anvendes på Seruminstittutet. Følsomhedsgraderne er i virkeligheden en semikvantitativ omsætning af den kontinuerlige skala af  $IC_{50}$ -værdier og den tilsvarende skala af zonestørrelser fastlagt ud fra regressionskurven. Basis for denne gruppering er serum-, vævs- og urinkoncentrationer af de forskellige antibiotika efter forskellige doseringsformer:

*Følsom* (i praksis angivet med tallet 3): omfatter stammer, hvor  $IC_{50}$  er mindre end ca.  $\frac{1}{5}$  af den maximale serumkoncentration, der opnås ved standarddosis også ved peroral indgift, idet man antager, at den aktuelle koncentration på selve infektionsstedet altid er en del lavere end serumkoncentrationen (Jensen et al. 1950b). In vivo respons på behandling med stoffet er sandsynlig ved milde til moderate systemiske infektioner.

*Middelfølsom* (2): omfatter stammer med højere  $IC_{50}$ -værdier, som kræver tilsvarende forøgede serumkoncentrationer, som kan opnås efter forhøjet dosis (med  $\beta$ -laktam-antibiotika), eller de forøgede koncentrationer, der opnås hvis antibiotikum kan koncentreres på infektionsstedet som fx. i urin ved blærebetændelse. I begge tilfælde kan man med en rimelig grad af sandsynlighed forvente klinisk respons.

*Relativt resistent* (1): omfatter stammer med endnu højere  $IC_{50}$ -værdier, som kræver de høje koncentrationer der kan opnås lokalt ved lokal applicing af antibiotika, fx. som salve, pudder osv.

*Resistent* (0): omfatter stammer med så høje  $IC_{50}$ -værdier, at der ikke kan forventes klinisk respons.

Fordelen ved en sådan semikvantitativ gruppering er, at paratviden om opnåelige serumkoncentrationer sammenlignet med  $IC_{50}$ -værdierne ikke er nødvendig i den terapeutiske situation, og at der tages hensyn til, at den  $IC_{50}$ -værdi der findes med agardiffusionsmetoden i rutinesituationen er behæftet med nogen usikkerhed. Ulempen ved systemet ligger dels i kategoriseringen af zonestørrelser tæt ved "breaking-points" mellem grupperne, hvor en subjektiv "bias" kan spille ind, dels i en række andre forhold, som skal omtales kort:

Tabel 1: Antibiotika som for tiden anvendes til resistensbestemmelse

Resistensbestemmelse med:	Gælder også for:	Disc-indhold (SSI)
Benzylpenicillin-natrium	Alle penicillinase-følsomme penicilliner undtagen ampicillin, carbenicillin og mecinilam	4 enh. (high-dose: 100 enh.)
Streptomycin-sulfat	Dihydrostreptomycin	40 µg S-base
Sulfametoxazol + trimetoprim (19+1)	Sulfadiazin + trimetoprim	75 µg
Gentamycin-sulfat		20 µg G-base
Tetracyklin-hydroklorid	Alle andre tetracyklinderivater	20 µg
Ampicillin (aminobenzylpenicillin)	Hetacillin, amoxicillin	40 µg
Cefalotin-natrium	De fleste andre cefalosporiner	25 µg
Kanamycin		40 µg K-base
Vancomycin-hydroklorid		150 µg
Fucidin-natrium		200 µg
Erytromycin		10 µg
Lincomycin-hydroklorid		15 µg L-base
Meticillin-natriummonohydrat	Alle penicillinase-resistente penicilliner og cefalosporiner overfor Staph. aureus	50 µg
Sulfatiazol-natrium	Alle sulfonamider	238 µg
Nalidixan-natrium		50 µg N-syre
Polymyxin-sulfat	Colistin	75 µg P-base
Karbenicillin-natrium		250 µg
Kloramfenikol		50 µg

De antibiotika der for tiden anvendes til resistensbestemmelse er opført i første kolonne, indholdet i discs er anført i tredie kolonne og beslægtede antibiotika som resistensbestemmelserne gælder for er anført i anden kolonne.

Tabel 2: Skematisk opstilling af følsomhedsgrupper (aflæsningsskemaet).

Antibiotikum	Følsom 3	Middelfølsom 2	Relativt res. 1	Resistent 0
Penicillin	≥ 40 (≤ 0,03)	39-27 (0,03-0,125)	26-7 (0,125-1)	≤ 6 (> 1)
Penicillin high-dose	≥ 40 (≤ 1)	39-25 (1-10)	24-7 (10-50)	≤ 6 (> 50)
Streptomycin	≥ 27 (≤ 3)	26-15 (3-12)	14-7 (12-30)	≤ 6 (> 30)
Sulfam/trim	≥ 40 (≤ 2)	39-26 (2-8)	25-7 (8-40)	≤ 6 (> 40)
Gentamycin	≥ 40 (≤ 0,5)	39-29 (0,5-5)	28-18 (5-50)	≤ 17 (> 50)
Tetracyklin	≥ 40 (≤ 1)	39-25 (1-5)	24-7 (5-50)	≤ 6 (> 50)
Ampicillin	≥ 40 (≤ 2)	39-23 (2-8)	22-7 (8-32)	≤ 6 (> 32)
Cefalotin	≥ 40 (≤ 1)	39-20 (1-10)	19-7 (10-50)	≤ 6 (> 50)
Kanamycin	≥ 37 (≤ 2,5)	36-22 (2,5-10)	21-7 (10-40)	≤ 6 (> 40)
Vancomycin	≥ 35 (≤ 2)	34-26 (2-8)	25-7 (8-100)	≤ 6 (> 100)
Fucidin	≥ 35 (≤ 1)	34-21 (1-10)	20-7 (10-100)	≤ 6 (> 100)
Erytromycin	≥ 40 (≤ 0,1)	39-21 (0,1-1)	20-7 (1-6)	≤ 6 (> 6)
Linkomycin	≥ 37 (≤ 0,5)	36-25 (0,5-2)	24-7 (2-15)	≤ 6 (> 15)
Meticillin	≥ 40 (≤ 1)	39-24 (1-5)	23-7 (5-35)	≤ 6 (> 35)
Sulfatiazol	≥ 40 (≤ 4)	39-27 (4-12)	26-7 (12-80)	≤ 6 (> 80)
Nalidixan *)	≥ 38 (≤ 4)	37-24 (4-16)	23-7 (16-100)	≤ 6 (> 100)
Polymyxin	≥ 32 (≤ 0,5)	31-25 (0,5-5)	24-7 (5-100)	≤ 6 (> 100)
Karbenicillin	≥ 45 (≤ 5)	44-25 (5-50)	24-7 (50-400)	≤ 6 (> 400)
Kloramfenikol	≥ 40 (≤ 1,5)	39-25 (1,5-5)	24-7 (5-25)	≤ 6 (> 25)

\*) Anvendes kun til urinvejsinfektioner.

I hver kolonne er angivet følsomhedsgруппens zonediameter i mm og i parentes de tilsvarende IC<sub>50</sub> intervaller, for penicillin i enh./ml for andre stoffer i µg/ml.

For *Streptococcus faecalis* tolkes følsomheden over for aminoglykosider en gruppe lavere end svarende til den aflæste zonestørrelse, idet regressionskurven for disse bakterier er anderledes.

Skemaer som tabel 2 er inkomplette vejledninger for situationen *in vivo*, idet de ignorerer proteinbindingen, lipid/vandopløseligheden og lignende forhold, som har betydning for fordelingen af antibiotika mellem på den ene side serum og på den anden side væv, CNS, betændelsesfoci og indtrængen i lege- mets celler. Der tages heller ikke hensyn til evt. specielle forhold i betændelsesfoci, til udskillelsesvejen af antibiotika eller til evt. specielle forhold ved infektioner i selve udskillelsesvejen (fx. pH i urinvejene). Sådanne skemaer giver ingen oplysninger om, hvorvidt der kan være effekt af subinhibitoriske koncentrationer af antibiotika, eller om stofferne virker baktericidt eller kun bakteriostatisk; ej heller viser de, om der er synergisme/antagonisme mellem de enkelte antibiotikagrupper ved kombinationsbehandling.

Relationen  $IC_{50}$ /serumkoncentrationen ved "almindelig dosis" er ret upræcis. Dels er "almindelig dosis" af fx. penicilliner ikke nogen veldefineret størrelse; den har undergået en stigning i de senere år, og dels kan "serumkoncentration" betyde "peak", "middel" eller "lige før næste dosis". I almindelighed anbefales det at anvende middelværdien (Ericsson & Sherris 1971). I nogle tilfælde er en stamme heterogen med hensyn til følsomhed over for et antibiotikum, dvs. at klonens enkeltindivider har forskellig følsomhed, og man kan risikere, at kun de følsomme varianter bliver undersøgt. Systematiske studier af korrelationen mellem følsomhedsgrupperne og klinisk behandlings- effekt er relativt sjældent udført, men sådanne studier er naturligvis af afgørende betydning for relevansen af skemaer som tabel 2.

Ovenstående følsomhedsgrupper bruges i Skandinavien, mens nogle andre lande foretrækker færre følsomhedsgrupper (se Dornbusch et al. 1977). På svensk initiativ arbejdes der her i Skandinavien på at gennemføre en følsomheds- inddeling i tre grupper betegnet S = sensitiv, I = intermediær og R = resistent.

De regressionskurver, der ligger til grund for tabel 2, er udarbejdet med stammer som vokser under aerobe forhold og giver synlig vækst i løbet af 1 døgn. Såfremt regressionskurven fremstilles med langsommere voksende stammer, som først giver synlig vækst efter 48 timer, vil regressionskurven blive lidt fladere, idet prædiffusionsperioden nu ikke mere er så dominerende (sml. ligning (12)). Det medfører, at følsomme stammer (gruppe 3) har lidt større zoner, resistente stammer (gruppe 1-0) mindre og de middelfølsomme stammer (gruppe 2) nogenlunde uændrede zoner (Thomsen 1967). At følsomme stammers  $IC_{50}$  således bestemmes for lavt, gør ikke så meget, men at delvis resistente stammers  $IC_{50}$  bestemmes for højt kan spille en rolle ved lokalbehandling, da en behandlingsmulighed kan forpasses. Endnu langsommere voksende bakterier som fx. mykobakterier må resistensbestemmes ved hjælp af en fortyndingsmetode i stedet for agardiffusionsmetoden (Jensen 1949).

For anaerobe bakteriers vedkommende kan følsomheden udmærket bestemmes med agardiffusionsmetoden, selv med anvendelse af ikke-præreducerede substrater. I de fleste tilfælde kan man konstruere regressionskurver, som dog adskiller sig fra tilsvarende kurver med aerobe bakterier. I nogle tilfælde, fx. med kloramfenikol, angives spredningen i følsomhed dog at være for lille til at regressionskurver kan konstrueres, så man kun kan sige om en stamme er følsom eller resistent over for det pågældende antibiotikum. Da der er stor forskel i væksthastigheden mellem forskellige anaerobe arter – fx. vokser *Cl. perfringens* hurtigt og anaerobe kokker langsomt – har flere forfattere set sig nødsaget til at konstruere regressionskurver for hver art (Sapico et al. 1972; Dornbusch et al. 1975a, b; Kwok et al. 1975).

Thomsens (1967) metode har ikke været afprøvet på anaerobe bakteriearter, men da de ændrede regressionskurver ifølge litteraturen synes at kunne henføres til langsmmere vækst, burde Thomsens metode med den lange prædiffusion være velegnet, og man ville forvente, at regressionskurver for anaerobe arter, der vokser frem på 1 døgn, ikke ville adskille sig væsentligt fra de tilsvarende ”aerobe” regressionskurver. Indtil dette forhold er undersøgt, må man dog advare mod ukritisk at anvende aflæsningsskemaet i tabel 2 til anaerobe arter.

### Valg af resistensbestemmelsesmetode

Ved udførelse af resistensbestemmelse af bakterier over for forskellige antibiotika skelner man mellem *primær* resistensbestemmelse, som udføres direkte med det modtagne prøvemateriale, og *sekundær* resistensbestemmelse, som udføres på isolerede kolonier efter dyrkning af prøvematerialet. Fordelen ved primær resistensbestemmelse ligger naturligvis i, at svaret kan foreligge 1 døgn tidligere end ved sekundær resistensbestemmelse, og dette er ofte vigtigt i den kliniske situation. Sekundær resistensbestemmelse kan ofte undværes, når den bakteriologiske diagnose er kendt, og en anden fordel er, at undersøgelsen kan udføres under standardiserede forhold for hver art med hensyn til lag-fase og inoculum og uden indflydelse fra andre bakterier i kulturen. Naturligvis kan resultatet af en primær resistensbestemmelse altid kontrolleres ved en sekundær resistensbestemmelse, hvis dette anses for påkrævet.

*Fortyndingsmetoderne* giver direkte MIC eller  $IC_{50}$ , men egner sig kun til sekundær resistensbestemmelse. Agarfortyndingsmetoden er lidt bedre reproducerbænd bouillonfortyndingsmetoden og giver samme eller lidt lavere MIC og  $IC_{50}$  end denne. Agarfortyndingsmetoden er desuden mere økonomisk med hensyn til tid og materiale, idet mange stammer kan undersøges på samme

plade, og den er mindre følsom over for forekomsten af enkelte resistente varianter eller forurenninger i inoculum. Ved bouillonfortyndingsmetoden er aflæsningstidspunktet mere kritisk, men metoden kan til gengæld mekaniseres, så den bliver egnet til rutinebrug, og til mindre opgaver er den at foretrække fremfor agarfortyndingsmetoden, som kræver mere forberedelse med hensyn til pladestøbning, selv om pladerne kan holde sig i op til 1 uge i køleskab (Ericsson & Sherris 1971).

*Agardiffusionsmetoderne* egner sig både til primær og sekundær resistensbestemmelse, og i standardiseret form er deres variabilitet den samme eller lavere end agarfortyndingsmetoden når MIC aflæses, fordi der ikke er de "spring" i aflæsningen, som der er ved en 2-foldsfortyndingsrække (Ericsson & Sherris 1971). Når  $IC_{50}$  aflæses ved agarfortyndingsmetoden, har denne dog mindre variabilitet end agardiffusionsmetoderne. Agardiffusionsmetoderne er simple og hurtige at udføre, de er fleksible med hensyn til hvilke antibiotika man ønsker at bruge på pladen, og økonomiske, og de egner sig således bedre end fortyndingsmetoderne til arbejdet i et rutinelaboratorium. Anvendt på det primære prøvemateriale tildeler agardiffusionsmetoderne ydermere substratet en selektiv karakter med hensyn til forskel i antibiotikumresistens, som tillader isolering af resistente bakteriearter blandt følsomme arter i sidstnævntes hæmningszone omkring en given antibiotikumdisc. Nogle arter har endvidere et så konstant resistensmønster, at dette bliver en hjælp i diagnostisk henseende, og i epidemiologiske udredninger spiller en given stammes specielle resistensmønster ofte også en rolle som epidemiologisk markør. Endelig muliggør en inspektion af kolonimorfologien i hæmningszonens rand omkring  $\beta$ -laktam-antibiotika i en del tilfælde, at  $\beta$ -laktamase-produktion opdages.

På baggrund af ovenstående fordele er det ikke overraskende, at agardiffusionsmetoderne foretrækkes langt de fleste steder til rutinebrug. I diagnoseafdelingen og antibiotika-afdelingen har vi anvendt Thomsens disc-diffusionsmetode med 6 mm discs og 20 timers prædiffusion siden 1960. Fordelene ved denne metode sammenlignet med andre her i landet anvendte (ROSCO's tablet metode (Neosensitabs), oprindelig udviklet af Erna Lund i samarbejde med ROSCO (Lund et al 1951) og udført med 1 times prædiffusion eller uden prædiffusion, K.A.Jensen disc-metode med 20 mm discs og en  $\frac{1}{2}$  times prædiffusion og Ericsson disc-metode (AB Biodisk) med 5 mm discs og  $\frac{1}{2}$  times forlænget lag-fase ved henstand ved stuetemperatur) er angivet tidligere og skal summeres op: koncentrationsgradienten fra depotet er stabiliseret og mere flad, hvilket medfører, at forskelle i inoculumstørrelse, lag-fase og væksthastighed i vidtgående grad elimineres, og at følsomme stammer får større, mens resistente stammer får mindre zoner. Thomsens metode er derfor også velegnet til primær resistensbestemmelse. Ulempene ved den består i, at man dagligt må skønne over næste dags behov for resistensplader, og da

disc'ene almindeligvis tages af før tilsåningen, er der ringe mulighed for at opdage evt. ombytninger af disc-rækkefølgen. Overskydende plader, der har diffunderet i 20 + 24 timer i stedet for 20 timer, kan dog bruges i weekend'er, hvis man husker på, at den fladere koncentrationsgradient bevirket, at følsomme stammer får større og resistente stammer mindre zoner, mens middelfølsomme stammer har relativt uændrede zoner (Thomsen 1967). I øvrigt henvises til Thomsens (1967) sammenlignende undersøgelse over egen metode, K.A. Jensens metode, Lunds tabletmetode, Ericssons metode og Kirby et al.'s (1957) disc-metode.

### Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### *Thomsens agardiffusionsmetode med 20 timers prædiffusion* (Thomsen 1967)

##### *Substrat*

Seruminstituttets resistensplader (14 cm, 90 g, 6 mm tykke) som består af:

Defibrineret hesteblood	5,0 %
Glukose	0,35 %
NZ-amin, type B	0,25 %
Orthana gæretekstrakt <sup>1)</sup>	0,125 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	0,8 %
KCl	0,33 %
Sæbe	0,001 %
So-Bi-gel agar tilsat ekstra Ca <sup>++</sup> og Mg <sup>++</sup>	1,2 %
pH: 7,1-7,3. Ca <sup>++</sup> : ca. 25 mg/l. Mg <sup>++</sup> : ca. 12 mg/l.	

1) (udvalgt specielt med henblik på lavt indhold af sulfonamidantagonister).

Ved resistensbestemmelse af *H. influenzae* fordeles umiddelbart før tilsåning af pladen 100 µl (2-3 dråber) 5% NAD-opløsning på pladens overflade med steril glasstav.

*NAD-opløsning* 5% (nicotinamid-adenin-dinucleotid = V-faktor): 1 ml i hætteglas. Opbevares ved -20°C. Åbnede hætteglas opbevares i køleskab.

Ved resistensbestemmelse af thymidin-krævende bakterier fordeles umiddelbart før tilsåning 100 µl (2-3 dråber) 0,2% thymidinopløsning på pladens overflade med steril glasstav.

*Thymidinopløsning 0,2% (2 mg thymidin/ml 0,1 M HCl)* opbevares ved 4°C.

**Antibiotika:** Resistenspladerne forsynes i antibiotika-afdelingen med tørrede discs indeholdende de relevante antibiotika (Schleicher & Schuell filtrerpapir-discs no. 2668, ø: 6 mm). Efter imbibering med antibiotika og tørring opbevares disc'ene i lukkede krukke med tætstluttende låg ved -22°C uden tab af aktivitet i op til flere år. Disc-indholdet fremgår af Tabel 1. Disc'ene anbringes på pladerne 2 cm fra randen og 4 cm fra hinanden. Der er plads til 7 discs pr. plade. Derefter prædiffunderes med låget på ved stuetemperatur i 20 timer, hvorefter disc'ene fjernes, og pladerne er klare til brug. Hvis de ikke bruges straks, stilles de i køleskab og forsynes med dato. Et døgn senere kasseres de, hvis de ikke er blevet anvendt.

For øjeblikket fremstilles følgende plader:

"7-plade": præpareret med penicillin, streptomycin, sulfametoxazol/trimetoprim, gentamycin, tetracyklin, ampicillin, cefalotin (startende ud for ribben på petriskålen og følgende uret).

*Udvidet gramps. plade mærket med rød streg:* kanamycin, vancomycin, fucidin, erytromycin, linkomycin og meticillin.

*Udvidet gramneg. plade mærket med sort kryds:* polymyxin, karbenicillin, kloramfenikol og kanamycin.

*Urinplade mærket med sort streg:* sulfametoxazol/trimetoprim, gentamycin, tetracyklin, ampicillin, cefalotin, sulfatiazol og nalidixan.

**Udførelse:** Både ved primær resistensbestemmelse af den modtagne prøve og ved sekundær resistensbestemmelse af en kultur bør det tilstræbes at få en tæt, men ikke sammenflydende vækst. Ericsson & Sherris (1971) har angivet tal for bakterietæthedten i det ideelle inokulum. Inokulums størrelse har speciel betydning ved bestemmelser med sulfonamid, sulfonamid/trimetoprim, kloramfenikol samt ved β-laktam-antibiotika, når det drejer sig om β-laktamase-producerende stammer.

#### *Primær resistensbestemmelse*

**Podninger:** Halvdelen af pladen tilsås med tætte, parallelle strøg, mens podepinden stadig rulles mellem fingrene, så alle dens sider udsås. Pladen vendes 90°, og proceduren gentages, så strøgene nu dels dækker et nyt område af pladen, dels dækker halvdelen af det første tilsåningsområde. Pladen vendes efterfulgt 90°, proceduren gentages, og den vendes for tredie og sidste gang 90° efterfulgt af samme procedure. Herved opnås, at hele overfladen bliver næsten ensartet tilsået.

**Uriner:** Hvis man ved mikroskopi af ikke-centrifugeret urin finder en eller flere bakterier pr. synsfelt, fortyndes urinen 1:20 med steril saltvand, og 100 µl (2-3 dråber) spredes jævnt over pladen med steril glasstav.

### Ekspektorater

*1. metode:* To klatter anbringes diametralt modsat hinanden 1 cm fra kanten af skålen og spredes med en bøjet steril glasstav i et bælte langs kanten. Med spidsen af den ombøjede del af staven inokuleres resten af pladen med tætte parallelle strøg fra kant til kant. Denne metode medfører, at det 2 cm brede bælte langs kanten af skålen tilsås tættere end den centrale del af pladen (Tung 1951; Dragsted & Erichsen 1953), hvorved problemet med fx. sulfonamidantagonister i et stort inokulum afhjælpes, men til gengæld bliver hæmningszonerne ofte ”skæve”.

*2. Metode:* En klat spredes jævnt over hele agarfladen med en steril glasstav eller vatpind.

Nogle laboratorier foretrækker at behandle ekspektorat med mukolytikum (fx. N-acetyl-L-cystein) og vaske det inden udsåningen, men det er en tidsrøvende metode.

*Trachealsug:* Materiale hentes op fra det fysiologiske saltvand med en pasteurpipette, og tilsåningen følger derefter ovenstående retningslinier.

*Pus og bundfald fra centrifugerede ”væske” (fx. spinalvæske):* En øsefuld spredes jævnt over agarfladen med en steril glasstav eller øskens.

### Sekundær resistensbestemmelse

Det er i reglen ikke muligt at opnå et passende inokulum ved direkte overføring af kolonimateriale til resistenspladen og spredning med glasstav. Ericsson & Sherris (1971) anbefaler at flyde pladerne med 3–5 ml af en døgngammel bouillonkultur fortyndet  $10^{-4}$  (= ca.  $10^5$  kim/ml), når det drejer sig om de fleste gramneg. stave, eller  $10^{-3}$  (= ca.  $10^6$  kim/ml), når det drejer sig om *S. aureus* og enterokokker, og afpipettere overskydende væske. Thomsen (1967) anbefaler at tilså pladerne med 2–3 øsefulde af en suspension af koloni-materiale i sterilt saltvand, som spredes med steril glasstav. Suspensionen kan fx. laves således:

Kolonimateriale	Saltvand
Gramneg. stave	1 øsefuld
Stafylokokker	”
<i>Strep. faecalis</i>	”
<i>H. influenzae</i>	”
Grampos. stave	”
Pneumokokker	”
Streptokokker iøvrigt	”
Meningokokker	”
Coryneforme stave	”
	10 ml
	2 ml
	2 ml
	2 ml
	2 ml
	få dråber

Spredning med glasstav foretrækkes af Thomsen, da flydningen med den efterfølgende skråstilling af pladerne ved afdækningen kan få zonerne til at trække i pæreform. I alle tilfælde bør inoculum helst stamme fra flere kolonier (Ericsson & Sherris (1971) anbefaler 10) for at undgå at overse resistente varianter. Pladerne inkuberes med bunden i vejret ved 35–37°C til næste dag. Stabning af plader bør så vidt muligt undgås. Når det drejer sig om hurtigt voksende bakterier, kan resistensbestemmelsen dog allerede aflæses efter 5–6 timer. Kuldioxid-atmosfære anvendes kun, hvis væksten kræver det.

*Aflæsning:* Hæmningszonerne aflæses med mm-papir på selvholdende pincet eller med skydelære, og zonestørrelserne omsættes til følsomhedsgrupperne 3, 2, 1, 0 efter tabel 2, og dette følsomhedsgruppetal meddeles klinikeren. Med skydelære kan 1/10 mm's nøjagtighed opnås ved aflæsningen. Det er vigtigt at holde aflæsningsinstrumentet helt ned til zonerne for at undgå paralakseforskydning med undervurdering af zonestørrelsen til følge.

#### *Fejlkilder og forhold der kan vanskeliggøre måling af hæmningszonen*

(1) Partiel hæmningszone som overgang mellem fuld hæmning og fuld vækst ses især ved følsomme stafylokokkers penicillinzoner og ved kloramfenikol- og streptomycinzonerne. Ifølge Thomsen (1967) får man den bedste overensstemmelse med  $IC_{50}$ -værdierne ved kun at måle den del af zonen, hvor hæmningen er total, men i reglen måler man dog også den del af zonen med, der består af meget svag vækst (Ericsson & Sherris 1971).

(2) Ved sulfonamid-resistensbestemmelse kan der ofte være vækst i hele hæmningszonen af små kolonier, således at zonens afgrænsning udgøres af en mere eller mindre skarp grænse mellem denne svage vækst og den normale vækst. Fænomenet skyldes formentlig inoculatets varierende indhold af sulfonamid-antagonister, der i nogle tilfælde muliggør dannelse af små kolonier før hæmningen indtræder, og fænomenet svinder ved fortynding af inoculatet. Af samme grund kan meget uensartet tilsåning af pladen medføre tungeformede indvækstpartier i sulfonamidzonen. I begge tilfælde bør den største zone tages som udtryk for følsomheden.

(3) Sværmning af fx. *proteus*-arter ind i hæmningszonen omkring visse antibiotika, fx. kloramfenikol, skal ignoreres og den under sværmningssløret liggende hæmningszone aflæses.

(4) *S. aureus* stammer som danner ekstracellulært  $\beta$ -laktamase, afsløres ved at hæmningszonerne omkring  $\beta$ -laktamase-følsomme antibiotika (penicillin, ampicillin, karbenicillin og i nogen grad cefalosporin) er skarpt definerede uden lysering, men med enkeltstående større kolonier i zoneranden, idet bakterierne har nedbrudt penicillin og i tilgift fået bedre vækstbetingelser på dette sted. Drejer det sig om ikke- $\beta$ -laktamase-producerende stammer, kan

en mindre veldefineret overgangszone med mindre kolonier iagttages, og væksten perifert for zonegrænsen er ofte præget af sekundær lysering med tab af pigment. For  $\beta$ -laktamase-producerende *S. aureus* stammers vedkommende er hæmningszonens størrelse omkring penicillin, ampicillin og karbenicillin helt afhængig af inoculums størrelse. Konstateres der  $\beta$ -laktamase-produktion hos en *S. aureus*, skal følsomheden – uafhængig af hæmningszonens størrelse – for penicillin, ampicillin og karbecillin angives som 1 eller tv (dvs. tvivlsomt om klinisk effekt kan opnås). Hvad angår  $\beta$ -laktamase hos gramneg. stave, så er denne cellebundet, hvorfor inoculum-afhængigheden er mindre eller ikke til stede (Sykes & Matthew 1976), og i disse tilfælde angives stammens følsomhed som svarende til den aktuelt målte hæmningszone. Der skal i øvrigt gøres opmærksom på, at der findes flere anbefalelsesværdige, nemme måder til påvisning af  $\beta$ -laktamaseproduktion (Sykes & Matthew 1976), fx. spaltning af kromogent cefalosporin, og en vejledning kan fås i antibiotikaafdelingen. Hvis en penicillin-følsom stamme forekommer i blanding med en  $\beta$ -laktamase-producerende stamme, kan sidstnævnte i nogle tilfælde ødelægge så meget penicillin, at der optræder en slags satellit-fænomen i hæmningszonen med følsomme kolonier omkring  $\beta$ -laktamase-producerende kolonier og evt. en generelt nedsat hæmningszone for den ellers følsomme stamme.

(5) Meticillin-resistente stafylokokstammer er en heterogen blanding af følsomme og resistente varianter. Ved resistensbestemmelse over for meticillin ved 37°C vil sådanne stammer ofte tolkes som følsomme, da de resistente varianter ved den temperatur gror langsomt i tilstedeværelse af meticillin. Udføres bestemmelsen ved lavere temperatur (35° og især 30°C), vil de resistente kolonier gro frem på 1 døgn (Ericsson & Sherris 1971; Brown & Kothari 1974). Hvis stafylokokker er meticillin-resistente, angives i svaret at de også er resistente over for cefalosporiner, og særskilt oplysning om følsomheden over for cefalosporiner skal i sådanne tilfælde ikke meddeles.

(6) Sulfonamid/trimetoprim: Selv om hæmningszonen viser fuld følsomhed, kan det dog ikke dermed afgøres, om stammen er følsom over for hvert enkelt af de to stoffer i blandingen. Såvel sulfonamid-følsomme, trimetoprim-resistente som sulfonamid-resistente, trimetoprim-følsomme stammer forekommer. Af den grund burde bakteriestammer altid undersøges for følsomhed over for både sulfonamid og trimetoprim særskilt og nogle laboratorier praktiserer også dette. I Seruminstituttets rutineplader indgår imidlertid kun sulfonamid særskilt og ikke på alle standardplader. En særskilt resistensbestemmelse over for sulfonamid skal imidlertid altid foretages og meddeles samtidig med resistensbestemmelse over for blandingen sulfonamid/trimetoprim.

(7) Anaerob inkubation, inkubation i CO<sub>2</sub>-atmosfære: se p. 388.

(8) Det kan anbefales ved alle agardiffusionsmetoder dagligt at resistens-bestemme en kendt kontrolstamme sideløbende med de ukendte stammer; dette har naturligvis specielt betydning ved nye batches af substrat eller discs og tabletter.

(9) Såfremt zonerne er teknisk tilfredsstillende, og såfremt nedbrydning af antibiotikum ikke forekommer ( $\beta$ -laktamase), så kan flere stammers resistensmønster undertiden godt aflæses på en primær resistensbestemmelsesplade.

*Fortolkning:* De aflæste zonestørrelser omsættes til følsomhedsgrupper (se tabel 2) under hensyntagen til ovenstående punkter nævnt under fejl-kilder. Spredningen på metoden er 3-5 gange større end ved agarfortyndingsmetoden (se p. 382), så usikkerheden på bestemmelsen af en  $IC_{50}$  ved en given zonestørrelse er af størrelsesordenen  $\frac{1}{3}$  til 1 fortyndingstrin, afhængig af det pågældende antibiotikum (Thomsen 1967).

*Anvendelse:* Foruden kendskab til en given stammes følsomhed over for forskellige antibiotika (resistensmønster) er det nødvendigt for den behandelnde læge at have viden om infektionens art og lokalisation, tilstanden af patientens egne forsvarsmekanismer, de forskellige antibiotikas farmakokinetik, proteinbinding, fordeling, metabolisering og udskillelse, deres bakteriostatiske eller baktericide virkning, eventuelle interaktioner med andre farmaka, herunder andre antibiotika (antagonisme/synergisme) og deres administrationsform, bivirkninger og pris, førend det rette valg af antibiotisk behandling kan foretages. Det må endvidere huskes, at kun ét antibiotikum fra hver gruppe (tabel 1) indgår i resistensbestemmelsen, og forskelle mellem gruppernes enkelte medlemmer findes. Med disse forudsætninger er de oplysninger, som resistensbestemmelsen giver klinikeren, af afgørende betydning for instituering eller justering af antibakteriel kemoterapi. For det klinisk-mikrobiologiske laboratorium har resultaterne som tidligere omtalt desuden ofte orienterende værdi i species-diagnostikken og i epidemiologisk henseende.

### Sikkerhedsforanstaltninger

Flydning af plader rummer en særlig risiko.

**Referencer:** se referencelisten efter kapitel 40.

## *Kapitel 40*

# **Koncentrationsmåling**

Betingelsen for at kunne måle koncentrationen af et antibiotikum i biologiske væsker med agardiffusionsmetoden er, at man råder over en bakteriestamme, der er følsom for det pågældende antibiotikum, men resistent over for andre væksthæmmende stoffer i disse væsker, herunder andre antibiotika og legemets egne bakteriebeskadigende stoffer (fx. lysozym og laktoferrin). Legemets egne bakteriebeskadigende stoffer spiller sjældent nogen rolle ved agardiffusionsmetoden, men det gør den samtidige tilstedeværelse af andre antibiotika. Det er i dag reglen snarere end undtagelsen, at patienter behandles med kombinationer af antibiotika. Specielt hyppig er en kombination af et  $\beta$ -laktam-antibiotikum og et aminoglykosid. For at kunne måle koncentrationen af et antibiotikum i tilstedeværelse af et eller flere andre, uden at disse måles med, har man udviklet flere metoder:

1) Den simpleste og mest udbredte metode er at bruge en bakteriestamme, der er følsom for det antibiotikum, der ønskes bestemt, men resistent over for andre tilstedeværende antibiotika. Da mange forskellige kombinationer af antibiotika bliver benyttet i klinikken, er det nødvendigt for laboratoriet at have en større kollektion af bakteriestammer med forskellige, kendte resistsmønstre.

2) En anden udbredt metode består i selektivt at inaktivere det antibiotikum, der ikke ønskes målt, men denne metode kan kun anvendes for et mindre antal antibiotika.  $\beta$ -laktam-antibiotika (penicilliner, cefalosporiner) kan inaktivieres med enzymet  $\beta$ -laktamase. Tetracyklin kan inaktivieres ved chelering med  $Mg^{++}$  tilsat substratet. Streptomycin-aktivitet kan elimineres ved tilsætning af semicarbazid-hydroklorid til substratet. Sulfonamid kan inaktivieres ved tilsætning af p-aminobenzoesyre til substratet og både sulfonamider og trimetoprim ved tilsætning af thymidin. Polymyxin og  $\beta$ -laktam-antibiotika kan måles i tilstedeværelse af aminoglykosider, hvis pH i substratet sænkes til 5,5–6,0 (Sabath et al. 1971; Malmborg 1974).

3) En tredie, sjældnere brugt metode er at separere de forskellige antibiotika i blandingen, fx. ved kromatografi eller elektroforese, før målingen (se Malmborg 1974).

Med agardiffusionsmetoden måles kun mængden af aktivt stof, men ikke de inaktive metaboliseringsprodukter. Når agardiffusionsmetoden anvendes til koncentrationsmålinger er man fri for de standardiseringsproblemer, som er en følge dels af væksten (inoculum, lag-fase og væksthastighed), dels af diffusionen når metoden anvendes til resistensbestemmelse. Man anbringer nemlig ved hver undersøgelse kendte oplosninger af det pågældende antibiotikum på pladen sammen med den ukendte prøve, så man får bestemt standardkurven (ligning (11), kap. 38) og derved bliver i stand til, efter at have bestemt den ukendte prøves hæmningszone, at interpolere sig til prøvens antibiotikumindhold. Det er naturligvis en betingelse, at der er anvendt samme slags biologisk væske til standardopløsningerne af antibiotikum som til prøven, og det vil i de fleste tilfælde sige serum.

### Valg af metode

Selv om der er udarbejdet mange varianter af agardiffusionsmetoden til bestemmelse af antibiotikumkoncentrationer, bygger de på samme princip og adskiller sig hovedsageligt kun ved mængden af det prøvemateriale, der kræves, samt ved følsomheden og væksthastigheden af den anvendte tekstbakterie. Den nødvendige prøvemængde kan nedsættes ved at bruge disc i stedet for agarcup. Når der anvendes disc, vil metodens følsomhed men også risikoen for en øget usikkerhed stige ved anvendelse af tynde plader. Metodens hurtighed øges, hvis man bruger hurtigt voksende bakterier, men da de fleste toksiske antibiotika kun gives hver 8. time, er et hurtigt svar ikke så påkrævet. I det følgende beskrives en agarcup-metode og en disc-metode, som begge anvendes i antibiotika-afdelingen.

### Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### *Agarcup- og disc-metoden (Rosdahl et al. 1969)*

**Prøvemateriale:** Blod uden tilslætning eller serum, urin, spinalvæske, sekret og andre legemsvæske. Blod tages ved venepunktur i Seruminstituttets silikonerede plastrør med grønt skruelåg, og andre legemsvæske forsendes i samme slags prøverør. Til agarcup-metoden ønskes ca. 2 ml serum eller andet prøvemateriale. Til disc-metoden tages blod i 4 hepariniserede kapillærrør fra øreflip, fingerpulpa eller hæl. Hvert rør giver 25-30 µl serum. Prøverne opbevares og forsendes ved 4°C, hvor antibiotika er holdbare i mindst 24 timer. Efter centrifugering afpipetteres serum, som anvendes til koncentrationsbestemmelsen. Det er ligegyldigt, om serum udvindes med det samme eller 24 timer efter prøvetagningen, og prøvematerialet behøver ikke at være steril, men mikrobiel vækst må dog selvfølgelig undgås.

*Substrat og andet udstyr*

Seruminstituttets resistensplader (se kap. 39 side 390)

6 mm filterpapirdiscs (se kap. 39 side 391)

Propbor, ø: 9 mm

Penase (Leo), 100.000 enh/ml

Standardopløsninger af antibiotika i poolt humant serum

Bakteriestammer med kendt selektiv følsomhed (teststammer)

*ad standardopløsninger af antibiotika:* Disse fremstilles som stamopløsninger i steril destilleret vand eller speciel solvens (penicilliner og cefalosporiner), fx. 1000 µg/ml af antibiotikumpræparationer særligt beregnet til dette formål, og opbevares ved -20°C i små portioner. Antibiotika til klinisk brug er ofte tilsat preserveringsmiddel og kan derfor ikke bruges. Stamopløsningernes holdbarhed ved -20°C fremgår af tabel 3. Standardopløsningerne fremstilles i poolt humant serum eller i steril fysiologisk saltvand til henholdsvis måling af antibiotika i serum eller fx. spinalvæske, hvor dog Hammerberg et al. (1978) hævder, at serum er det bedste. Urinprøver fortyndes med serum (1+9), hvorefter en serumstandard kan bruges. Standardrækkerne med serum holder sig for de fleste antibiotikas vedkommende i 1 uge ved 4°C, bortset fra penicilliner, cefalosporiner og tetracykliner, der kun er holdbare 1 dag. Standardrækken består af 4 forskellige koncentrationer, fx. i 3-foldsfortyndinger, som dækker de klinisk relevante koncentrationer. Eksempelvis kan anføres gentamycin i serum: 1,1-3,3-10-30 µg gentamycinbase/ml serum.

*ad teststammerne:* Et sæt af teststammerne opbevares frysetørret. Til daglig kan følgende fremgangsmåde anvendes: Stammerne opbevares på plade ved 4°C og omsås ugentligt. Herfra tilsås bouillonkulturer 2 gange ugentligt. Efter fremvækst opbevares disse bouillonkulturer ved 4°C, og herfra laves fortyndinger til tilsåning af koncentrationsmålingspladerne. Der udarbejdes en "journal" for hver teststamme med angivelse af hæmningszonestørrelse over for alle de anvendte antibiotika og oplysninger om stammens særlige anvendelsesområde. Resistensmønstret kontrolleres af og til og de nye hæmningszonediametre indføres i journalen.

Tabel 3: Holdbarhed af antibiotikaopløsninger til brug ved koncentrationsmåling

Antibiotika i destilleret vand eller solvens	Holdbarhed ved -20°C
Colimycin-sulfat i vand	1 år
Cefalotin i solvens	1 år
Cefalexin i vand	10 mdr.
Clindamycin i vand	10 mdr.
Erytromycin i vand	6 mdr.
Gentamycin-sulfat i vand	1 år
Fucidin i vand	1 år
Kanamycin-sulfat i vand	1 år
Kloramfenikol i vand	1 år
Lincomycin i vand	1 år
Polymyxin-sulfat i vand	1 år
Streptomycin-sulfat i vand	1 år
Dihydrostreptomycin i vand	1 år
Tobramycin i vand	1 år
Trimetoprim i vand	1 år
Vancomycin i vand	1 år

Penicilliner opløst i solvens er ikke stabile i længere tid ved -20°C, men er holdbare i 1 uge ved 4°C. Tetracykliner opløst i vand er ligeledes holdbare i 1 uge ved 4°C, men ikke i længere tid ved -20°C.

### Prøvens udførelse

#### *Agarcup-metoden*

Substratet tilsås ved flydning med 3-5 ml af en passende suspension af teststammen, som er følsom for det antibiotikum, der skal måles, og resistent over for eventuelle andre antibiotika i prøven. Der tilstræbes en tæt, men ikke sammenflydende vækst, og for at opnå dette skal fx. en døgngammel bouillonkultur af en gramneg. stavbakterie fortyndes  $10^{-3}$  til  $10^{-4}$  og *S. aureus* og enterokokker  $10^{-2}$  inden tilsåningen (det svarer til ca.  $10^5$  til  $10^6$ , henholdsvis  $10^7$  kim/ml). Overskydende væske suges fra med pasteurpipette, og pladen stilles til tørring ved 35-37°C i ca.  $\frac{1}{2}$  time. Når pladen er tør, udstanses med et flamberet afkølet propbor 7 huller ( $\phi$ : 0,9 cm) tværs gennem agaren ikke nærmere end 2 cm fra kanten af skålen og 4 cm fra hinanden. Eventuelt kan anvendes et specielt bor tilsluttet luftsug og en skabelon til de 7 huller

for at lette arbejdet (Bang & Bentzen 1947). Bunden af hullerne kan eventuelt forsegles med 2 dråber smeltet agar, men det er i reglen ikke nødvendigt. De fire standardopløsninger og prøven pipetteres hurtigt efter hinanden i hullerne, som skal fyldes til randen (ca. 0,3 ml). (Der laves tredobbelts bestemmelse af prøvens antibiotikumindhold, dvs. prøven fyldes i 3 huller fordelt mellem de 4 huller med standardopløsningerne). Pladen henstår i 15 min. eller længere ved stuetemperatur (det er ikke nødvendigt, men det øger hæmningszonerernes størrelse) og inkuberes herefter ved 35–37°C på vandret underlag med låget opad.

#### *Disc-metoden*

Substratet tilsås som ovenfor, men i stedet for huller i agaren anbringes 16 filtrerpapirdiscs på agaroverfladen, og 20 µl standard eller prøve pipetteres hurtigt med Carlsberg-pipette på hver disc, inden disse suger væske fra pladen. Inkubering som ovenfor anført.

#### *Inaktivering af β-laktam-antibiotika med penase*

Ved agarcup-metoden fyldes prøvehullet med 100.000 enh./ml penase (dvs. ca. 30.000 enheder i hullet), og efter 5–10 minutters diffusion suges resten af penasen op af hullerne, hvorefter prøverne og standarderne pipetteres i. Det er ikke nødvendigt at komme penase i standardrækernes huller. Ved discs-metoden dyppes hver disc i en oplosning af 100.000 enh. penase/ml dest. vand og tørres i ca.  $\frac{3}{4}$  time ved 37°C. Hver disc vil så indeholde ca. 5000 enh. penase, og disc'ene er nu klar til anbringelse på pladen og påpipettering af prøven og standarderne. Discs til standardrækken skal også imbiberes med penase. Større portioner af imbiberede og tørrede discs kan evt. opbevares i lukkede flasker i flere måneder ved -20°C (Justesen 1973).

#### *Inaktivering af sulfonamid*

Til dette formål anvendes plader med det almindelige resistensbestemmelses-substrat tilsat p-aminobenzoesyre (20 µg/ml), som bestilles specielt fra substratafdelingen.

De andre inaktiveringssmetoder bruges ikke i praksis på Seruminstittutet.

#### *Afløsning*

Hæmningszonerne aflæses (se tidligere under resistensbestemmelse i kap. 39), og gennemsnittet af de tre målinger for den ukendte prøve udregnes. Resultaterne fra standardrækken tegnes ind på semilogaritmisk papir (koncentrationen afsættes ud ad den logaritmiske akse og zonediameteren i mm ud ad den aritmetiske akse). Punkterne forbinder, og herved fås en ret, eller næsten ret linie (standardkurven fig. 1), idet det egentlig er kvadratet på zone-radius (eller kvadratet på zonediameter) der er lineært relateret til log. konc. Standardkurven kan også beregnes ud fra ligning (11) eller ved hjælp af ”mindste kva-

draters metode" (Malmborg 1974). Antibiotikumkoncentrationen i den ukendte prøve findes ved interpolation på standardkurven eller ved beregning. Ekstrapolering ved forlængelse af standardkurven uden for højeste og laveste standardkoncentration undgås, og i stedet for anføres, at prøvens koncentration er større, henholdsvis lavere end denne værdi. Aflæsning kan foretages efter 6-8 timer, afhængig af stammens væksthastighed.

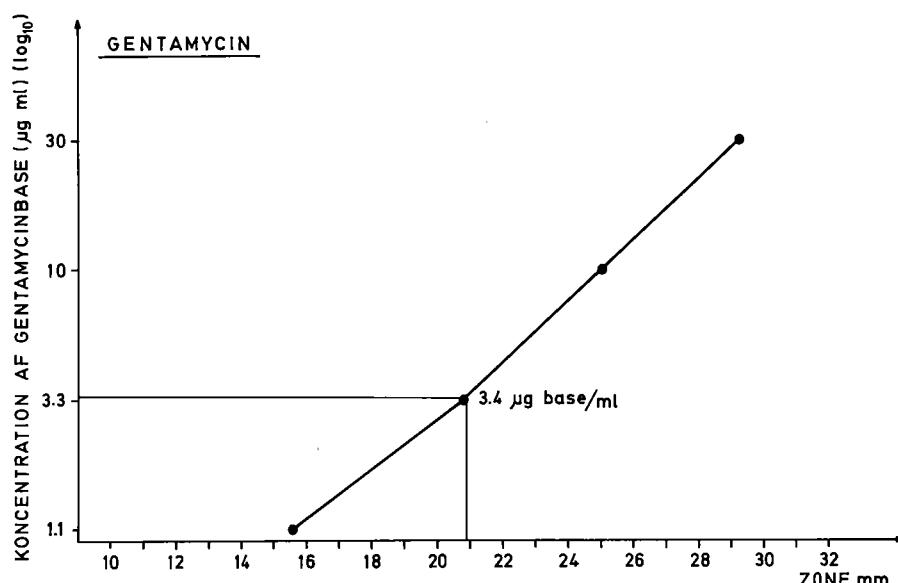


Fig. 1: Eksempel på koncentrationsbestemmelse af gentamycin i serum.

	Zonediameter (mm)	Koncentration af gentamycinbase ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Standard 1:	29,3	30
Standard 2:	25,1	10
Standard 3:	20,8	3,3
Standard 4:	15,6	1,1
Prøve:	20,9	
Prøve:	21,0	
Prøve:	20,8	
Prøvegennemsnit:	20,9	3,4 $\mu\text{g}$ gentamycinbase/ml serum

### *Fejlkilder*

(1) Hvis oplysninger om anden antibiotisk terapi mangler, vil man risikere at få forkerte høje koncentrationer, idet andre antibiotika kommer med i bestemmelsen, hvis teststammen er følsom for dem.

(2) Ved fejlagtigt valg af teststamme, som ikke er følsom for det pågældende antibiotikum, vil prøvens (og standardernes) indhold blive bestemt til 0.

(3) Ved måling af antibiotikum i sekreter fra slimhinder kan tilstedeværende lysozym og laktoferrin give hæmningszoner, der fejlfortolkes som antibiotisk aktivitet. Dette kan der korrigeres for ved tillige at måle med en teststamme, som er resistent over for det antibiotikum, der skal måles, men har samme følsomhed for lysozym og laktoferrin (Malmborg 1974).

(4) Hvis diffusionen ikke foregår på vandret underlag, kan der optræde skæve zoner.

(5) Citratblod giver større tetracyklinzoner på grund af binding af divalente katjoner.

(6) Heparin hæmmer aminoglykosiders aktivitet og nedsætter derfor deres zoner. Er prøven heparinplasma, bør standarderne også være fremstillet i heparinplasma.

### *Følsomhed*

1 µg/ml eller betydeligt derunder, afhængigt først og fremmest af testbakteriens følsomhed, men også af depotets størrelse og for dics-metoden af pladens tykkelse.

### *Fortolkning*

Fortolkningen af resultatet er helt afhængig af oplysninger om tidspunkt for sidste indgift af antibiotikum og for prøvetagningen, dosisstørrelse, dosegangsinterval, administrationsmåde (i.v., i.m., peroralt), anden antibiotisk terapi inden for de sidste 3 døgn og nyrefunktionen. Forudsat at disse oplysninger foreligger, fremgår det af resultatet: 1) om patienten har tilstrækkelig høj koncentration i serum af det pågældende antibiotikum til at et godt terapeutisk resultat kan forventes, eller 2) om patienten har for høj en koncentration i serum af det pågældende antibiotikum eller akkumulerer dette med risiko for toksiske bivirkninger. Betingelsen for på korrekt måde at udnytte disse oplysninger ved vurdering af måleresultatet er, at prøvetagningen er sket på passende tidspunkt i forhold til tidspunkterne for antibiotikumindgift. Der er to forskellige fremgangsmåder at vælge imellem: Den almindeligste er at tage en prøve umiddelbart før næste indgift af antibiotikum for at få oplysning om akkumulering af antibiotika. Derefter tages en prøve 15–30 min.

efter i.v., 1 (evt. 2) timer efter i.m. eller 2 timer efter peroral indgift for at se, dels om terapeutisk niveau er nået, dels om toksisk niveau overskrides. Den anden fremgangsmåde er at bestemme koncentrationen fx.  $1\frac{1}{2}$  time og 3 timer efter i.m. indgift og derefter beregne halveringstiden for det pågældende antibiotikum hos patienten. Resultaterne fra hver af disse to fremgangsmåder anvendes så til tilpasning af antibiotikumdosering i den nærmest følgende tid.

Det skal understreges, at de angivne metoder måler den totale (frie og proteinbundne) koncentration af aktivt antibiotikum, såfremt standarde er fremstillet i samme slags væske som prøven. Ydermere at resultatet kun siger noget om koncentrationen i den pågældende væske, men intet direkte om koncentrationen på infektionsstedet.

*Tabel over toksiske grænseværdier for de hyppigst målte antibiotika 2 timer efter i.m. indgift*

Penicilliner:	12 enheder i spinalvæske
Streptomycin:	40 µg/ml i serum
Kanamycin:	50 "
Gentamycin:	10 "
Tobramycin:	10 "
Colistin:	10 " (= 300 enh/ml)
Vancomycin:	40 "

*Terapeutisk niveau* for antibiotikakoncentrationer i serum afhænger dels af bakterieartens MIC, dels af infektionens lokalisering. I almindelighed regner man med, at den maximale serumkoncentration skal være mindst 5 gange højere end bakterieartens MIC for at opnå klinisk effekt ved generelle infektioner. Der henvises i øvrigt til tabel 2 og kap. 39 p. 384.

#### Sikkerhedsforanstaltninger

Ingen særlige, men husk at mundpipettering ikke må finde sted.

**Samlet referenceliste for kapitlerne 38-40**

- Abraham, E.P. & Chain, E.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146: 837, 1940.
- Abraham, E.P., Chain, E., Fletcher, C.M., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A. & Florey, H.W.: Further observations on penicillin. *Lancet* 2: 177, 1941.
- Alicino, J.F.: Iodometric method for the assay of penicillin preparations. *Industrial and engineering Chemistry* 18: 619, 1946.
- Bang, J. & Bentzen, O.: A more rapid and reliable technique for preparing "agar cups" especially in soft media. *Acta pharmacol.* 3: 252, 1947.
- Bang, J.: Zone formation in the agar-cup method for determining resistance to antibiotics. *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 111: 192, 1955.
- Bang, J.: Formation of the inhibition zone in the sensitivity test (agar diffusion technique). Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy. Proc. 6th Int. Congr. Chemotherapy 2: 945, 1970a.
- Bang, J.: The effect of a long prediffusion period on the sensitivity test. *Ibid.* 2: 947, 1970b.
- Bechhold, H. & Ehrlich, P.: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionswirkung. Ein Beitrag zum Studien der "innern Antiseptis". *Hoppe-Seyl. Z.* 1906 (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, N.Y. III: 64, 1960).
- Beer, E.J. de & Sherwood, M.B.: The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances. *J. Bact.* 50: 459, 1945.
- Behring, E.: Ueber Desinfection, Desinfectionsmittel und Desinfectionsmethoden. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 9: 395, 1890.
- Bratton, A.C. & Marshall, E.K., jr.: A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. biol. Chem.* 128: 537, 1939.
- Brodersen, R.: Inactivation of Penicillin in Aqueous Solution. *Disputats*, Munksgaard, Copenhagen 1949.
- Brown, D.F.J. & Kothari, D.: The reliability of methicillin sensitivity tests on four culture media. *J. clin. Path.* 27: 420, 1974.
- Brown, D.F.J. & Kothari, D.: Comparison of tablets and paper discs for antibiotic sensitivity testing. *J. clin. Path.* 28: 983, 1975.
- Buchner, H.: Ueber die bakterientödende Wirkung des zellefreien Blutserums. *Centralbl. Bakt.* 5: 817, 1889.
- Buchner, H.: Ueber die bakterientödende Wirkung des zellefreien Blutserums. *Centralbl. Bakt.* 6: 1, 1889.
- Chain, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J. & Sanders, A.G.: Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 2: 226, 1940.
- Colebrook, L., Buttle, G.A.H. & O'Meara, R.A.Q.: The mode of action of p-aminobenzenesulphonamide and prontosil in haemolytic streptococcal infections. *Lancet* 2: 1323, 1936.
- Cooper, K.E. & Woodman, D.: The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *J. Path. Bact.* 58: 75, 1946.
- Cooper, K.E. & Gillespie, W.A.: The influence of temperature on streptomycin inhibition zones in agar cultures. *J. gen. Microbiol.* 7: 1, 1952.

- Cooper, K.E. & Linton, A.H.: The importance of the temperature during the early hours of incubation of agar plates in assays. *J. gen. Microbiol.* 7: 8, 1952.
- Cooper, K.E., Linton, A.H. & Sehgal, S.N.: The effect of inoculum size in inhibition zones in agar media using staphylococci and streptomycin. *J. gen. Microbiol.* 18: 670, 1958.
- Cooper, K.E.: The Theory of Antibiotic Inhibition Zones. In: Kavanagh, F. (ed.): *Analytical microbiology*. Acad. Press Inc. New York 1963, p. 1.
- Domagk, G.: Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch. med. Wschr.* 1: 250, 1935.
- Dons, N.: Eksperimentelle og kliniske undersøgelser over effekten af penicillin overfor infektioner med penicillinasedannende stafylokokker. Disputats, København 1966.
- Dornbusch, K., Nord, C.-E. & Olsson, B.: Antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria by the standardized disc diffusion method with special reference to *Bacteroides fragilis*. *Scand. J. infect. Dis.* 7: 59, 1975a.
- Dornbusch, K., Nord, C.-E. & Olsson, B.: Regression line analysis for five antibiotics with strains of *Clostridium* species. *Scand. J. infect. Dis.* 7: 135, 1975b.
- Dornbusch, K., Ericson, C., Kallings, L.O., Kamme, C., Nordbring, F., Norrby, R. & Wallmark, G.: Resistensbestämning av bakterier mod antibiotika. Förslag till känslighet-gruppering m.m. Rapport från "Referensgruppen för Antibiotikafrågor", Stockholm, oktober 1977.
- Dragsted, P.J.: Det teoretiske grundlag for indgift og dosering af penicillin belyst ved kliniske og eksperimentelle undersøgelser. Disputats, Munksgaard, København 1949.
- Dragsted, P.J. & Erichsen, I.: Technique for direct resistance determination of the bacterial flora in sputa. *Acta path. microbiol. scand.* 32: 383, 1953.
- Ehrlich, P. & Shiga, K.: Farbentherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. *Berl. klin. Wschr.* 1904. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, N.Y. III: 24, 1960).
- Ehrlich, P. & Gonder, R.: Chemotherapie. In: Kolle, W. & Wassermann, A. von (Eds.): *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Band III. Gustav Fischer, Jena 1913. p. 22.
- Ehrlich, P. & Gonder, R.: Experimentelle Chemotherapie. In: Barth (ed.) *Handb. path. Protozoen*, Leipzig 1914. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, N.Y. III: 559, 1960).
- Ericsson, H., Höglman, C. & Wickman, K.: A paper disk method for determination of bacterial sensitivity to chemotherapeutic and antibiotic agents. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 6: Suppl. 11: 23, 1954.
- Ericsson, H. & Svartz-Malmberg, G.: Determination of bacterial sensitivity in vitro and its clinical evaluation. *Antibiotica et Chemotherapia* 6: 41, 1959.
- Ericsson, H.: Rational use of antibiotics in hospitals. Thesis, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 12: Suppl. 50, 1960.
- Ericsson, H. & Sherris, J.C.: Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta path. microbiol. scand. B*, Suppl. 217, 1971.
- Eriksen, K. Riewerts: Penicillinresistente stafylokokker. Deres egenskaber og opståelsesmåde samt det teoretiske grundlag for behandling af stafylokokinfektioner med antibiotika. Disputats, København 1965.
- Erlanson, P.: Determination of the sensitivity in vitro of bacteria to chemotherapeutic agents with special reference to routine tests. Thesis, *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 85, 1951.

- Espersen, E.: Undersøgelser over streptomycinresistente tuberkelbacilstammer, virkning af paraaminosalicylsyre (PAS) på tuberkelbaciller og kombineret virkning af streptomycin-penicillin, streptomycin-sulfathiazol samt streptomycin-PAS på tuberkelbaciller. Disputats, Munksgaard, København 1951.
- Felke, H.: Das Verhalten der Gonokokken gegenüber der Chemotherapie. (Ein Beitrag zum Problem der sogenannten Versager). *Klin. Wschr.* 18: 568, 1939.
- Ferone, R., Bushby, S.R.M., Burchall, J.J., Moore, W.D. & Smith, D.: Identification of Harper-Cawston factor as thymidine phosphorylase and removal from media of substances interfering with susceptibility testing to sulfonamides and diaminopyrimidines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 91, 1975.
- Finney, D.J.: Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. Univ. Press, Cambridge 1947.
- Fleming, A.: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. roy. Soc. B* 93: 306, 1922.
- Fleming, A.: A comparison of the activities of antiseptics on bacteria and on leucocytes. *Proc. roy. Soc. B* 96: 171, 1924.
- Fleming, A.: On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. exp. Path.* 10: 226, 1929.
- Fleming, A.: The antibacterial action in vitro of 2-(*p*-aminobenzenesulphonamido) pyridine on pneumococci and streptococci. *Lancet* 2: 74, 1938.
- Fleming, A.: In-vitro tests of penicillin potency. *Lancet* 1: 732, 1942.
- Foster, J.W.: Quantitative estimation of penicillin. *J. biol. Chem.* 144: 285, 1942.
- Foster, J.W. & Woodruff, H.B.: Microbiological aspects of penicillin. I. Methods of assay. *J. Bact.* 46: 187, 1943.
- Foster, J.W. & Woodruff, H.B.: Microbiological aspects of penicillin. VI. Procedure for the cup assay for penicillin. *J. Bact.* 47: 43, 1944.
- Fuller, A.T.: Is *p*-aminobenzenesulphonamide the active agent in prontosil therapy? *Lancet* 1: 194, 1937.
- Gallardo, E.: Sensitivity of bacteria from infected wounds to penicillin. II. Results in one hundred and twelve cases. *War Med.* 7: 100, 1944.
- Gotschlich, E.: Desinfektionslehre (Bakteriologischer Teil.). In: Kolle, W. & Wassermann, A. von (Eds): *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Band III, Gustav Fischer, Jena, 1913, p. 443.
- Guttmann, P. & Ehrlich, P.: Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berl. klin. Wschr.* 1891. (Collected Papers of Paul Ehrlich, Pergamon Press, N.Y. III: 9, 1960).
- Hagerman, G.: Studien zur Chemoresistenz der Gonokokken. Mittels einer neuen Methode zur Bestimmung der Chemoresistenz in vitro. Thesis, *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 46, 1942.
- Hammerberg, S., Sinai, R. & Marks, M.I.: Serum standards for the bioassay of aminoglycosides in cerebrospinal fluid. *J. clin. Path.* 31: 172, 1978.
- Heatley, N.G.: A method for the assay of penicillin. *Biochem. J.* 38: 61, 1944.
- Herriott, R.M.: A spectrophotometric method for the determination of penicillin. *J. biol. Chem.* 164: 725, 1946.
- Hoyt, R.E. & Levine, M.G.: A method for determining sensitivity to penicillin and streptomycin. *Science*, 106: 171, 1947.
- Humphrey, J.H. & Lightbown, J.W.: A general theory for plate assay of antibiotics with some practical applications. *J. gen. Microbiol.* 7: 129, 1952.

- Jensen, K.A., Møller, K.O. & Overgaard, K.: Studies on the excretion of penicillin through the kidneys and the mechanism of this process. *Acta pharmacol.* 1: 184, 1945.
- Jensen, K.A. & Kiær, I.: Problems concerning the estimation of the chemosensitivity of microbes and measuring of penicillin and streptomycin concentrations in the blood and spinal fluid. *Separatum Acta path.* Vol. 25: 146, 1948. Proc. of the 8. Scand. Path. Congr. Uppsala July 7-9, 1947).
- Jensen, K.A.: Streptomycin. Resistensbestemmelser. — Fordelingen og anvendelsen af streptomycin. *Ugeskr.* Læg. 111: 259, 1949.
- Jensen, K.A., Dragsted, P.J. & Kiær, I.: Undersøgelser af penicillinpræparer og doseringsmåder — II. *Ugeskr.* Læg. 112: 1075, 1950.
- Kirby, W.M.M., Yoshihara, G.M., Sundsted, K.S. & Warren, J.H.: Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics Annual* 1956-1957, p. 892.
- Koch, R.: Über Desinfektion. *Mitt. Kaiserl. Gesundheitsamte* Bd. I, 1881. (Gesammelte Werke von Robert Koch, I. Band, p. 287, Leipzig, 1912).
- Kwok, Y.-Y., Tally, F.P., Sutter, V.L. & Finegold, S.M.: Disc susceptibility testing of slow-growing anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 1, 1975.
- Laveran, A. & Mesnil, F.: Recherches sur le traitement et la prevention du Nagana. *Ann. Inst. Pasteur* 16: 785, 1902.
- Lechevalier, H.A. & Solotorovsky, M.: Three Centuries of Microbiology. Dover Publications Inc., New York 1974, p. 429.
- Linton, A.H.: Influence of inoculum size on antibiotic assays by the agar diffusion technique with *Klebsiella pneumoniae* and streptomycin. *J. Bact.* 76: 94, 1958.
- Linton, A.H.: Interpreting antibiotic sensitivity tests. *J. med. Lab. Technol.* 18: 1, 1961.
- Lund, E., Funder-Schmidt, B., Christensen H. & Dupont, A.: Sensitivity test with the tablet method. *Acta path. microbiol. scand.* 29: 221, 1951.
- Lundsteen, E., Vermehren, E. & Vermehren, M.: Bestemmelse af sulfanilamid i blod og urin. Med angivelse af en mikrometode. *Ugeskr.* Læg. 100: 530, 1938.
- Maclean, I.H., Rogers, K.B. & Fleming, A.: M. & B. 693 and pneumococci. *Lancet* 1: 562, 1939.
- Malmborg, A. S.: Assay of Antibiotics, Single or in Combination, by Agar Diffusion Technique. A study of penicillins, tetracycline, streptomycin and rifampicin. Thesis, Stockholm 1974.
- Marshall, E.K. jr., Emerson, K., jr. & Cutting, W.C.: Para-aminobenzenesulfonamide absorption and excretion: method of determination in urine and blood. *J. Amer. med. Ass.* 108: 953, 1937.
- Mitchison, D.A. & Spicer, C.C.: A method of estimating streptomycin in serum and other body fluids by diffusion through agar enclosed in glass tubes. *J. gen. Microbiol.* 3: 184, 1949.
- Murayama, O.: Fundamental study on the disc method of antibiotic sensitivity test. *J. Antibiot. (Tokyo)* 12: 263, 1959.
- Murtaugh, J.J. & Levy, G.B.: Chemical method for the determination of penicillin. *J. Amer. chem. Soc.* 67: 1042, 1945.
- Nuttall, G.: Experimente über die bacterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körpers. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 4: 353, 1888.
- Rammekamp, C.H.: A method for determining the concentration of penicillin in body fluids and exudates. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* 51: 95, 1942.

- Reddish, G.F.: Methods of testing antiseptics. *J. Lab. clin. Med.* 14: 649, 1929.
- Reymann, F.E. & Schmith, K.: Gonokokkers kemoresistens og sulfatiazolbehandling. *Ugeskr. Læg.* 104: 1043, 1942.
- Reyn, A., Korner, B. & Bentzon, M.W.: Effects of penicillin, streptomycin, and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and in 1957. *Brit. J. vener. Dis.* 34: 227, 1958.
- Reyn, A., Bentzon, M.W. & Ericsson, H.: Comparative investigations of the sensitivity of *N. gonorrhoeae* to penicillin. *Acta path. microbiol. scand.* 57: 235, 1963.
- Rosdahl, V. Thamdrup, Vejlsgaard, V., Rosdahl, N. & Vejlsgaard, R.: A micromethod for determination of antibiotics in serum. *Dan. med. Bull.* 16:133, 1969.
- Rose, S.B. & Miller, R.E.: Studies with the agar cup-plate method I. A standardized agar cup-plate technique. *J. Bact.* 38: 525, 1939.
- Ruehle, G.L.A. & Brewer, C.M.: Methods of testing antiseptics and disinfectants. United States Food and Drug Administration. Circular 198, U.S. Dept. of Agriculture, Wash. 1931, p. 1.
- Sabath, L.D., Casey, J.I., Ruch, P.A., Stumpf, L.L. & Finland, M.: Rapid microassay of gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, and vancomycin in serum or plasma. *J. Lab. clin. Med.* 78: 457, 1971.
- Sapico, F.L., Kwok, Y.-Y., Sutter, V.L. & Finegold, S.M.: Standardized antimicrobial disc susceptibility testing of anaerobic bacteria: in vitro susceptibility of *Clostridium perfringens* to nine antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2: 320, 1972.
- Schmith, K. & Reymann, F.E.: Experimentelle og kliniske Undersøgelser over Gonococcers Følsomhed overfor Sulfapyridin. *Nord. Med.* 8: 2493, 1940.
- Scudi, J.V.: A colorimetric method for the determination of penicillin. *J. biol. Chem.* 164: 183, 1946.
- Scudi, J.V. & Jelinek, V.C.: A rapid micromethod for the fluorometric determination of penicillin. *J. biol. Chem.* 164: 195, 1946.
- Sievers, O.: K.A. Jensens metod för bestämning av bakteriers resistens. *Svenska Läk.-Tidn.* 45: 1650, 1948.
- Sindbjerg-Hansen, V.: Om moderne kemoterapeuticas virkning in vitro. Oversigt og egne undersøgelser. *Nord. Med.* 7: 1171, 1940.
- Staun, J.: Experimentelle undersøgelser over streptomycinvirkning og immunitet belyst ved infektionsforsøg med *P. pseudotuberculosis rodentium*. Disputats, Pharmakon, København 1959.
- Sykes, R.B. & Matthew, M.: The  $\beta$ -lactamases af Gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. antimicrob. Chemother.* 2: 115, 1976.
- Thomas, A.R. jr., Levine, M. & Vitagliano, G.R.: Simplified procedures for ascertaining concentration of and bacterial susceptibility to penicillin. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 55: 264, 1944.
- Thomas, H.W.: Some experiments in the treatment of trypanosomiasis. *Brit. med. J.* 1: 1140, 1905.
- Thomsen, V. Frølund: Om teknikken ved resistensbestemmelse med særligt henblik på anvendelse af prædiffusion. Disputats, Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck, København 1967.
- Tréfouël, J., Tréfouël, Mme J., Nitti, F. & Bovet, D.: Activité du p-aminophénylsulfamide sur les infections streptococciques, expérimentales de la souris et du lapin. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 120: 756, 1935.

- Tung, S.L.: Studies on a direct method for estimation of bacterial resistance to antibiotics. *Acta path. microbiol. scand.* 29: 182, 1951.
- Vesterdal, J.: Studies on the inhibition zones observed in the agar cup method for penicillin assay. *Acta path. microbiol. scand.* 24: 272, 1947a.
- Vesterdal, J.: Maaling og Standardisering af Penicillin. Disputats, Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck, Kjøbenhavn 1947b.
- Vincent, J.G. & Vincent, H.W.: Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 55: 162, 1944.
- Wld Hlth Org. Techn. Rep. Ser., 1961, 210: Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests. Second Report of the Expert Committee on Antibiotics.
- Wld Hlth Org. Expert Committee on Biological Standardization: Proposed requirements for antibiotic susceptibility tests. WHO/BS/76.1129, 1976.
- Wright, A.E.: New principles in therapeutic inoculation. *Lancet* I: 365, 1923.