

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ -ΣΥΝΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ



Ελένη Α. Βαγιάκου

**Αν/τρια Διευθύντρια Μικροβιολογικού
Εργαστηρίου ΓΝΑ <<Γ.Γεννηματάς>>**

17/03/2010



ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- Πιο συχνές και πολύ σημαντικές εξετάσεις για τον καθορισμό της αντιμικροβιακής αγωγής των ασθενών με λοιμώξεις
- Απαιτείται συχνή βελτίωση των τεχνικών ελέγχου της μικροβιακής ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (CLSI, EUCAST)
- Επιλογή των πλέον κατάλληλων μεθόδων και ορθή εκτέλεση εφαρμόζοντας συνεχή έλεγχο ποιότητας (Quality Control)
- Διεξαγωγή τακτικά στατιστικών μελετών για την αντοχή των μικροβίων



ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΗΛΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ

- Εξαρτάται από:
 - Το ελεγχόμενο μικρόβιο
 - Από την εστία λοίμωξης
 - Από την ύπαρξη αντοχής
 - Από καταστάσεις εκ μέρους του ασθενούς (αλλεργία)



ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

- **Επιλογή του σωστού αντιβιοτικού και ερμηνεία του αντιβιογράμματος με βάση:**
 1. **Τα αποτελέσματα των εργαστηριακών μεθόδων**
 2. **Τις διεθνώς αποδεκτές οδηγίες ειδικών επιτροπών όπως CLSI ,EUCAST , BSCAC, DIN κ.ά**
 3. **Τους μηχανισμούς αντοχής**
 4. **Τις ασυμφωνίες μεταξύ των in vitro αποτελεσμάτων ευαισθησίας των μικροβίων και της κλινικής αποτελεσματικότητας των αντιβιοτικών**



ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (Kirby-Bauer μέθοδος)
- Μέθοδοι αραίωσης αντιβιοτικών σε υγρά και στερεά θρεπτικά υλικά
 - ➔ Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του αντιβιοτικού (ΕΑΠ, Minimum Inhibitory Concentration, MIC)
 - ➔ Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου πυκνότητας (ΕΒΠ, Minimum Lethal Concentration, MBC)
- Ειδικές μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας

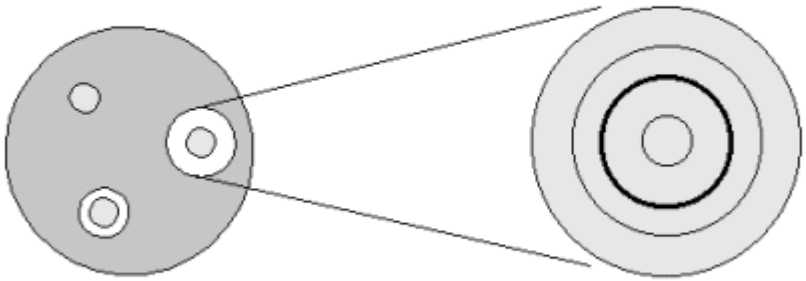


ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

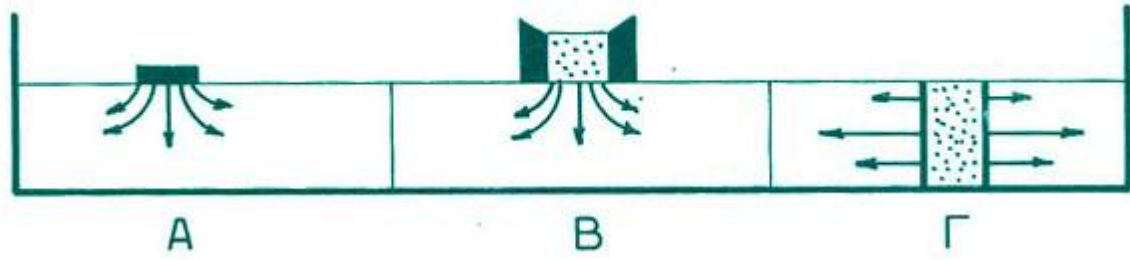
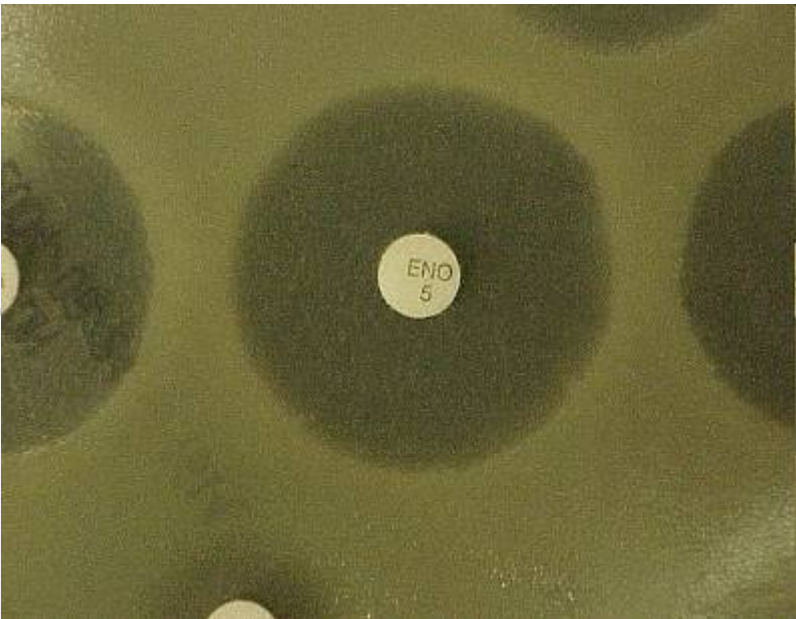
- Κατάλληλα εναιωρήματα μικροβίων ενσωματώνονται ή τοποθετούνται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού και εν συνεχεία τοποθετούνται τα αντιβιοτικά

- Standard seeding, agar and disks
- 24+ hour incubation



Kirby-Baur Plate

Radial Diffusion Zones



Σχήμα 2. Τοποθέτηση του αντιβιοτικού στο άγαρ. Α: σε δίσκο. Β: σε κύλινδρο. Γ: σε δύθισμα που γίνεται στο άγαρ.



ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ

Διαμόρφωση της ζώνης αναστολής

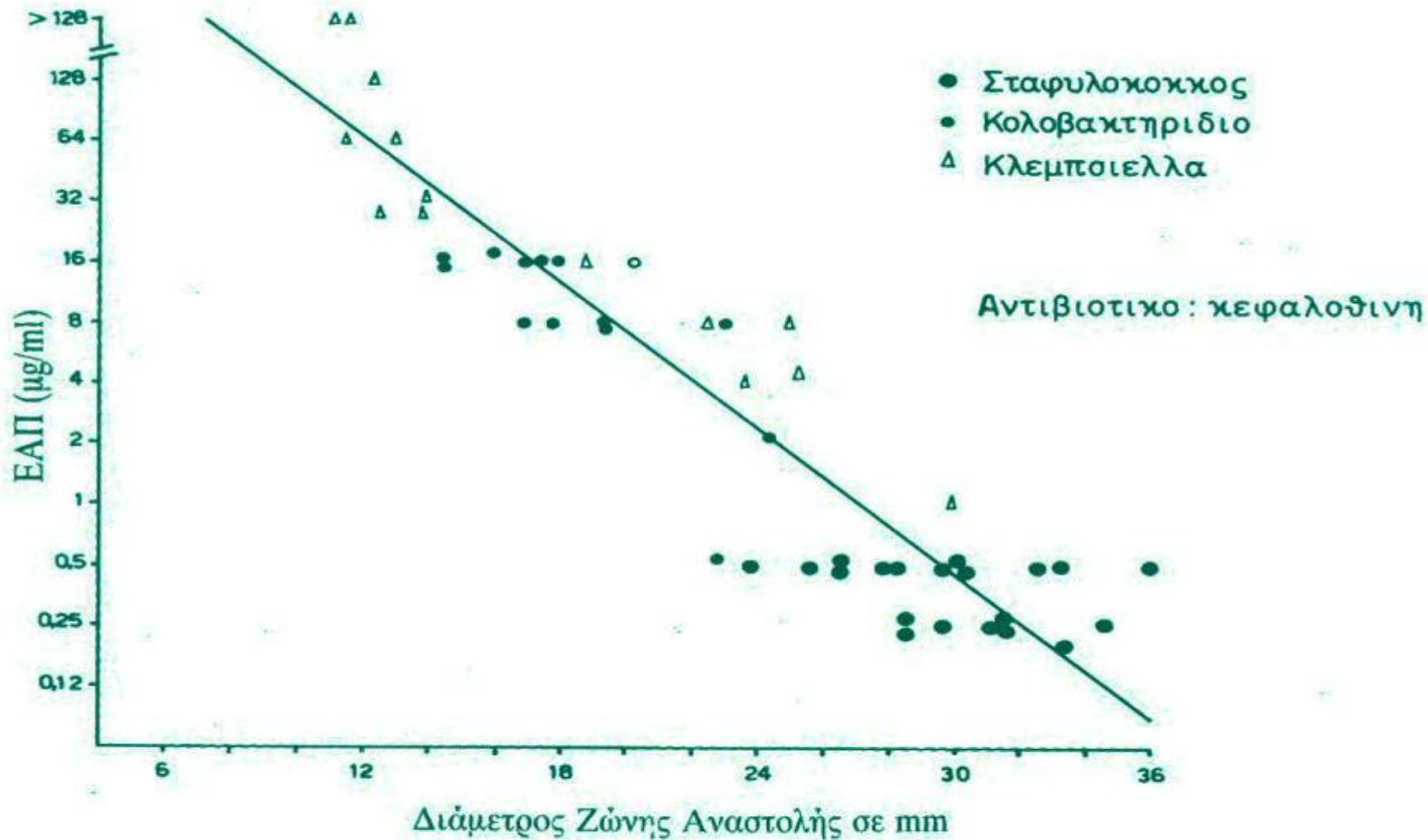
- Διάχυση του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό που έχει ενοφθαλμιστεί το εξεταζόμενο μικρόβιο, από περιοχή μεγαλύτερης πυκνότητας σε περιοχή μικρότερης πυκνότητας ώστε να δημιουργηθεί ζώνη αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου



ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ

Διαμόρφωση της ζώνης αναστολής

- Η ζώνη αναστολής σχηματίζεται όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, ίση ή μεγαλύτερη από την ΕΑΠ, επιδρά σ'ένα αρκετά μεγάλο βακτηριακό πληθυσμό για να επιτύχει την αναστολή του

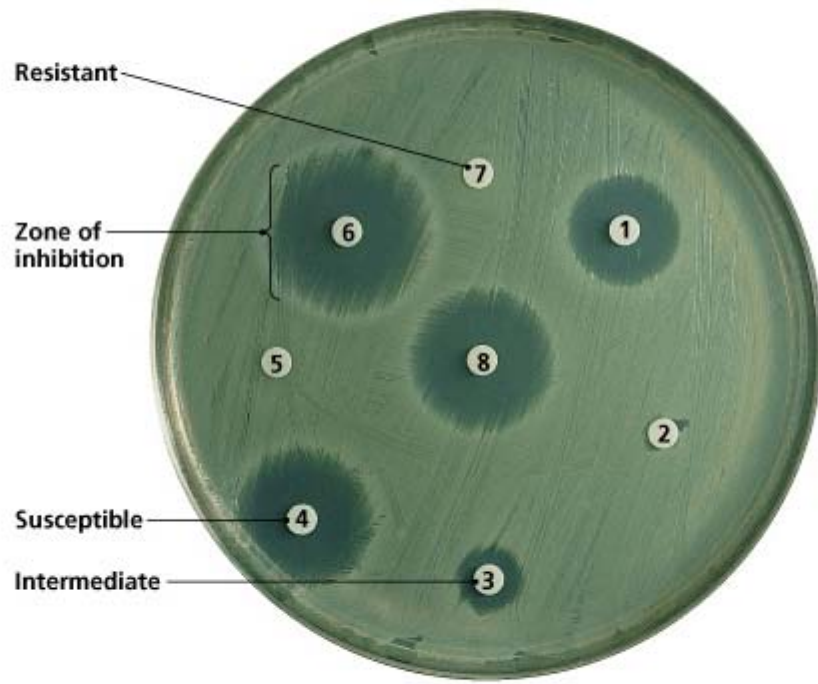


Σχήμα 3. Σχέση μεταξύ της διαμέτρου της ζώνης αναστολής και της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας.



ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΖΩΝΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ

- **Ευαίσθητο** (διάμετρος της ζώνης αναστολής **ίση ή μεγαλύτερη** από αυτή του **προτύπου** στελέχους)
- **Μέτρια ευαίσθητο** (μικρότερη τουλάχιστον κατά **2 mm** σε σύγκριση με το πρότυπο στέλεχος)
- **Ανθεκτικό** (δεν υπάρχει ζώνη αναστολής ή είναι πολύ μικρή)





ΣΤΑΔΙΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου 10^8 κύτταρα/ ml)
- Ενοφθαλμισμός στο θρεπτικό υλικό
- Τοποθέτηση των αντιβιοτικών
- Επώαση
- Ανάγνωση των αποτελεσμάτων
- Αναφορά των αποτελεσμάτων στους κλινικούς γιατρούς (επιστημονική ονοματολογία των αντιβιοτικών)



ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑ

- **Το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος** είναι ο κυριότερος παράγοντας για την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (μεγάλο μέγεθος οδηγεί σε ζώνες αναστολής μικρότερης διαμέτρου)
- **Θολερότητα ίση με 0,5 McFarland** (περίπου 10^8 κύτταρα/ ml)



ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

- **Μη απαιτητικά βακτήρια** (Mueller-Hinton άγαρ, ΜΗΑ)
- **Απαιτητικά βακτήρια**
 - ΜΗΑ με 5% απινιδωμένο αίμα προβάτου (στρεπτόκοκκοι, μηνιγγιτιδόκοκκοι)
 - Haemophilus test medium (ΗΤΜ)
 - GC άγαρ με 1% supplement (γονόκοκκο)



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

- Σύμφωνα με τις οδηγίες
- Ομοιόμορφο πάχος 4 mm (60-70 ml για τρυβλία διαμέτρου 150mm, 25-30 ml για διαμέτρου 100 mm) ώστε η διάχυση να γίνει προς 3 διευθύνσεις
- Διατήρηση των τρυβλίων στους 2-8°C (έως 7 ημέρες και έως 4 εβδομάδες τυλιγμένα σε πλαστική σακούλα)



ρΗ ΥΛΙΚΟΥ-ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΥΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΔΙΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ

- ρΗ 7,2-7,4 σε θερμοκρασία δωματίου (έλεγχος με ηλεκτρόδιο επιφανείας)
- Χαμηλή περιεκτικότητα σε θυμίνη ή θυμιδίνη
- Περίσσεια δισθενών κατιόντων Ca,Mg ελαττώνει τις ζώνες αναστολής σε αμινογλυκοσίδες (*P.aeruginosa*), τετρακυκλίνη και τις αυξάνει σε δαπτομυκίνη



ΔΙΣΚΟΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Συντήρηση στους -20 έως 4°C (τα β -λακταμικά θα πρέπει να καταψύχονται όπως ιμιπενέμη, κεφακλόρη, κλαβουλανικό)
- Φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου 1-2 ώρες πριν χρησιμοποιηθούν
- Προσοχή στην ημερομηνία λήξεως



ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

- Εντός 15 min από την παρασκευή του μικροβιακού εναιωρήματος
- Εμβάπτιση στείρου βαμβακοφόρου σπειλεού στο μικροβιακό εναιώρημα και απομάκρυνση της περίσσειας με πίεση στα τοιχώματα
- Επίστρωση σε 3 διευθύνσεις με περιστροφή του τρυβλίου κάθε φορά κατά 60°



ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Εντός 5-15 min από την επίστρωση του υλικού με διανεμητή ή αποστειρωμένη λαβίδα σε απόσταση 24 mm κέντρο με κέντρο
- Τετράγωνα τρυβλία (120x120 mm):έως 16 δίσκοι
- Τρυβλία διαμέτρου 150 mm:έως 12 δίσκοι
- Τρυβλία διαμέτρου 100 mm:έως 5 δίσκοι
- Όχι μετακίνηση των αντιβιοτικών μετά την τοποθέτησή τους



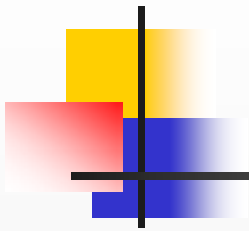
ΕΠΩΑΣΗ

- Στους 35-37°C για 16-18 ώρες
- το αργότερο 15 min μετά την τοποθέτηση των δίσκων για να αποφευχθεί η υπερδιάχυση του αντιβιοτικού
- σε αερόβια ατμόσφαιρα (το CO₂ μπορεί να αλλάξει το pH του θρεπτικού υλικού και τη δραστικότητα μερικών αντιβιοτικών)



ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Ως όριο ζώνης αναστολής ορίζεται το σημείο όπου δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι
- Μέτρηση των ζωνών αναστολής με διαβήτη με προσπίπτοντα φωτισμό στην πίσω πλευρά του τρυβλίου
- Αγνοείται ο ερπυσμός μέσα στις ζώνες αναστολής του *Proteus* spp και η λεπτή ανάπτυξη μέχρι 20% ή και λιγότερο του ταπητίου ανάπτυξης μέσα στη ζώνη αναστολής στις σουλφοναμίδες, τριμεθοπρίμη και το συνδυασμό τους
- Μεμονωμένες αποικίες μέσα στη ζώνη αναστολής → μικτό καλλιέργημα ή ανθεκτικοί μεταλλάκτες





ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- **Σταφυλόκοκκοι:** αντοχή στην οξακιλλίνη ή κεφοξιτίνη → αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά
- **ESBL_s (+) στελέχη *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*,** αντοχή σε πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη με εξαίρεση την κεφοξιτίνη που χαρακτηρίζεται ανάλογα με την in vitro συμπεριφορά
- Για *Salmonella spp*, *Shigella spp* δεν γίνεται έλεγχος σε κεφαλοσπορίνες 1ης, 2ης γενιάς, κεφαμυκίνες, αμινογλυκοσίδες
- Για *Enterococcus spp* δεν γίνεται έλεγχος σε κεφαλοσπορίνες, κλινδαμυκίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη, αμινογλυκοσίδες (χαμηλής περιεκτικότητας)



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΚΙ RBY-BAUER

- Απλή τεχνικά-γρήγορα αποτελέσματα
- Μεγάλη επαναληψιμότητα
- Σχετικά φθηνή
- Δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό
- Δυνατότητα επιλογής αντιβιοτικών
- Ανάδειξη μηχανισμών αντοχής (ESBL, D-zone→επαγώγιμη αντοχή στην κλινδαμυκίνη, Double disk synergy test, Hodge test)



ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΚΙ RBY-BAUER

- Δίδει **ποιοτικά** αποτελέσματα
- Δεν δίδει αξιόλογα αποτελέσματα για βακτήρια με **βραδύ** ρυθμό ανάπτυξης (πνευμονιόκοκκοι, αιμόφιλοι, ναισσέριες)
- Αν απαιτείται παρουσία CO₂ πρέπει να δοκιμάζονται και στελέχη γνωστής ευαισθησίας
- Η ετερογένεια των σταφυλοκόκκων πρέπει να ελέγχεται στους 30°C (oxacillin 1μg)
- Δεν δίδει ιδιαίτερα αξιόπιστα αποτελέσματα για τον έλεγχο δραστηριότητας σε κατιοντικά πολυκυκλικά αντιβιοτικά (πολυμυξίνες)
- Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα πρέπει να ελέγχεται με πρότυπα στελέχη



ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ (ποιοτικός έλεγχος)

- Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα πρέπει να ελέγχεται με **πρότυπα στελέχη** (*E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *P.aeruginosa* ATCC 27853)
- Εξέταση **καθημερινά**, εκτός εαν επί 30 συνεχόμενες ημέρες τα αποτελέσματα κρίνονται ικανοποιητικά, οπότε εξετάζονται **μια φορά την εβδομάδα**
- Για β-λακταμικά αντιβιοτικά μαζί με αναστολέα της β-λακταμάσης χρησιμοποιείται το στέλεχος *E.coli* ATCC 35218 που παράγει β-λακταμάση



ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

- Στους 4-8⁰C για μία εβδομάδα και μετά γίνονται ανακαλλιέργειες (διατήρηση για περισσότερο χρόνο στους -20⁰C, υγρό άζωτο ή λυοφιλοποιημένα)
- Ο έλεγχος ευαισθησίας γίνεται μετά από ανακαλλιέργεια



ΑΜΕΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

- Δίδει **προκαταρκτικές πληροφορίες, όχι όμως πολύ αξιόπιστες**
- **Μόνο σε επείγουσες καταστάσεις** (Gram χρώση ΕΝΥ, άλλων υγρών δείχνει μεγάλο αριθμό βακτηρίων ενός είδους)
- Προκαταρκτικά αποτελέσματα (**πάντα ακολουθεί απομόνωση του μικροβίου και αντιβιογράμμα**)



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΡΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΕΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- **ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

- Έκθεση του μικροβιακού εναιωρήματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού
- **MIC**: Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροβίου in vitro
- **Η MIC δεν** είναι απόλυτος αριθμός
- Η πραγματική τιμή της **MIC** βρίσκεται μεταξύ της τιμής της **MIC** που αναστέλλει την μικροβιακή ανάπτυξη και της τιμής της αμέσως υποδιπλάσιας αραίωσης που επιτρέπει την μικροβιακή ανάπτυξη



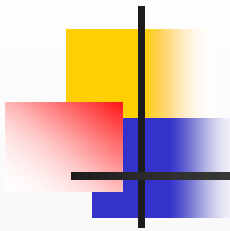
ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΤΥΓΧΑΝΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΤΩΝ MIC

- **Ευαίσθητα (Susceptible, S):** αναστολή μικροβίων από πυκνότητες αντιβιοτικού που επιτυγχάνονται στο αίμα από την **συνήθη** θεραπευτική χορήγηση
- **Μέτρια ευαίσθητα (Intermediate I):** αναστολή μικροβίων επί χορηγήσεως του αντιβιοτικού **στη μέγιστη ανεκτή δόση**
- **Ανθεκτικά (Resistant R):** μη αναστολή μικροβίων από πυκνότητες αντιβιοτικού που επιτυγχάνονται **συνήθως** στο αίμα



ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

- $MI C_{50}$: Η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη 50% των ελεγχόμενων στελεχών του ίδιου είδους
- $MI C_{90}$: Η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη 90% των ελεγχόμενων στελεχών του ίδιου είδους



ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- ✓ **Μέθοδος αραιώσεων των αντιβιοτικών σε ζωμό
(broth dilution method)
(Μέθοδος αναφοράς για CLSI)**
- Μακρομέθοδος (macrodilution)
- Μικρομέθοδος (microdilution)
- **Μέθοδος αραιώσεων των αντιβιοτικών σε άγαρ
(agar dilution method)**



ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Το αποτέλεσμα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες (θρεπτικό υλικό, pH, θερμοκρασία, χρόνο επώασης, κατάσταση αντιβιοτικών)
- **Πλεονέκτημα:** δεν επηρεάζονται τόσο πολύ από το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος (εξαίρεση σουλφοναμίδες, β-λακταμικά)
- **Μειονέκτημα:** οι σταφυλόκοκκοι, που παράγουν β-λακταμάση, αναστέλλονται από πυκνότητες των β-λακταμικών που βρίσκονται στα όρια ευαισθησίας του μικροβίου



ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ MIC

- **Πρότυπα στελέχη**
- Το **ιδεώδες** πρότυπο στέλεχος πρέπει να έχει **MIC** που να βρίσκεται στη **μέση** του εύρους των συγκεντρώσεων που εξετάζονται (αν εξετάζονται **7** αραιώσεις, το ιδεώδες πρότυπο στέλεχος πρέπει να έχει MIC στην αραιώση **4**, αλλά και στελέχη με τελικά σημεία στις αραιώσεις 3 ή 5 είναι αποδεκτά)



ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- **Αντιβιοτικά**
- **Μικροβιακό εναιώρημα**
(0,5 McFarland θολερότητα που αντιστοιχεί σε $1-2 \times 10^8$ CFU/mL για E.coli ATCC 25922)



ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- **Πρότυπες ουσίες** (παρασκευάστρια εταιρεία)
 - Περιεκτικότητα σε δραστική ουσία ή δραστηριότητα ($\mu\text{g}/\text{mg}$ ή I U/mg)
 - Δεν χρησιμοποιούνται κλινικά σκευάσματα (δεν είναι ακριβή, προσμίξεις)
 - Ημερομηνία λήξης
 - Συντήρηση: $\leq -20^{\circ}\text{C}$, παρουσία ξηραντικής ουσίας, σε κενό



ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- **Παρασκευή μητρικού διαλύματος**
 - Άνοιγμα του φιαλιδίου όταν έλθει σε θερμοκρασία δωματίου (συμπύκνωση υδρατμών, καταστροφή των β-λακταμικών αντιβιοτικών)
 - Διατήρηση στο σκοτάδι (ριφαμπικίνη, πολυμυξίνη Β)
 - Παρασκευάζονται αρχικά πυκνά διαλύματα σε συγκέντρωση 1000μg/mL ή δεκαπλάσια της μεγαλύτερης συγκέντρωσης που θα χρησιμοποιηθεί
 - Ζύγισμα της σκόνης σε ακριβή ζυγό
 - Υπολογισμός του όγκου του διαλύτη ανάλογα με το βάρος της σκόνης



ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- **Συντήρηση μητρικού διαλύματος**
- Όχι αποστείρωση (ειδικά φίλτρα)
- Κατανομή σε μικρές ποσότητες σε σωληνάρια με πώμα από πολυ-προπυλένιο, πολύ-αιθυλένιο, πολύ-στυρένιο
- Συντήρηση σε θερμοκρασία $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (6 μήνες)
- Καλή ανάδευση προ της χρήσης
- Αποφυγή απόψυξης



ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

**Όγκος (mL) = ποσότητα που ζυγίστηκε(mg) x δραστικότητα (μg/mL)
επιθυμητή συγκέντρωση (μg/mL)**

Διάλυση αντιβιοτικού σε οργανικό διαλύτη

**Βάρος(mg) = όγκος (mL) x συγκέντρωση(μg/mL)
δραστικότητα (μg/mL)**

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ (ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ)

- Προσδιορίζονται: MIC (ΕΑΠ), MBC (ΕΒΠ)
- Απαραίτητες επί θετικών αιμοκαλλιεργειών ή υγρών στείρων περιοχών, σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή, σε αποτυχία της θεραπείας ή υποτροπή της λοίμωξης, επί ύπαρξης αντοχών
- Μακρομέθοδος (όγκοι $\geq 1\text{ml}$)
- Μικρομέθοδος (όγκοι 0,05-0,2ml)



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

- **Μακρομέθοδος:** σωληνάρια (όγκος ζωμού για κάθε αντιβιοτικό $\geq 1\text{mL}$, 13 σωληνάρια 100 mm). Επίπονη και πολυδάπανη
- **Μικρομέθοδος:** πλάκες τιτλοποίησης (0,1mL). Ταχεία και οικονομική



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

■ Μακρομέθοδος

- MHB (Mueller-Hinton broth) (Ph 7,2-7,4.Θερμοκρασία 25°C,προσθήκη αν χρειάζεται 10 mg/ml Ca⁺⁺, Mg⁺⁺)
- 10 σωληνάρια (100 mm):διαδοχικές αραιώσεις του αντιβιοτικού (για κάθε αντιβιοτικό θετικός μάρτυρας για την ανάπτυξη του μικροβίου)
- Προσθήκη μικροβιακού εναιωρήματος (1-2x10⁸cfu/ml),(άμεσο εναιώρημα αποικίας σε φ.ο ή ζωμό από πρόσφατο καλλιέργημα 18-24 ωρών από μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για απαιτητικά βακτήρια ή εναιώρημα λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης για μη απαιτητικά βακτήρια εκτός των σταφυλοκόκκων)
- Επώαση 35±2°C,16-20 h, O₂, 5% CO₂για N.meningitidis (20-24 h)
- (παράταση επώασης έως 24h για Acinetobacter, Haemophilus, S.pneumoniae και για έλεγχο αντοχής στην oxacillin σε Staphylococcus, στη βανκομυκίνη σε Enterococcus,στη γενταμυκίνη (HL) σε Enterococcus)

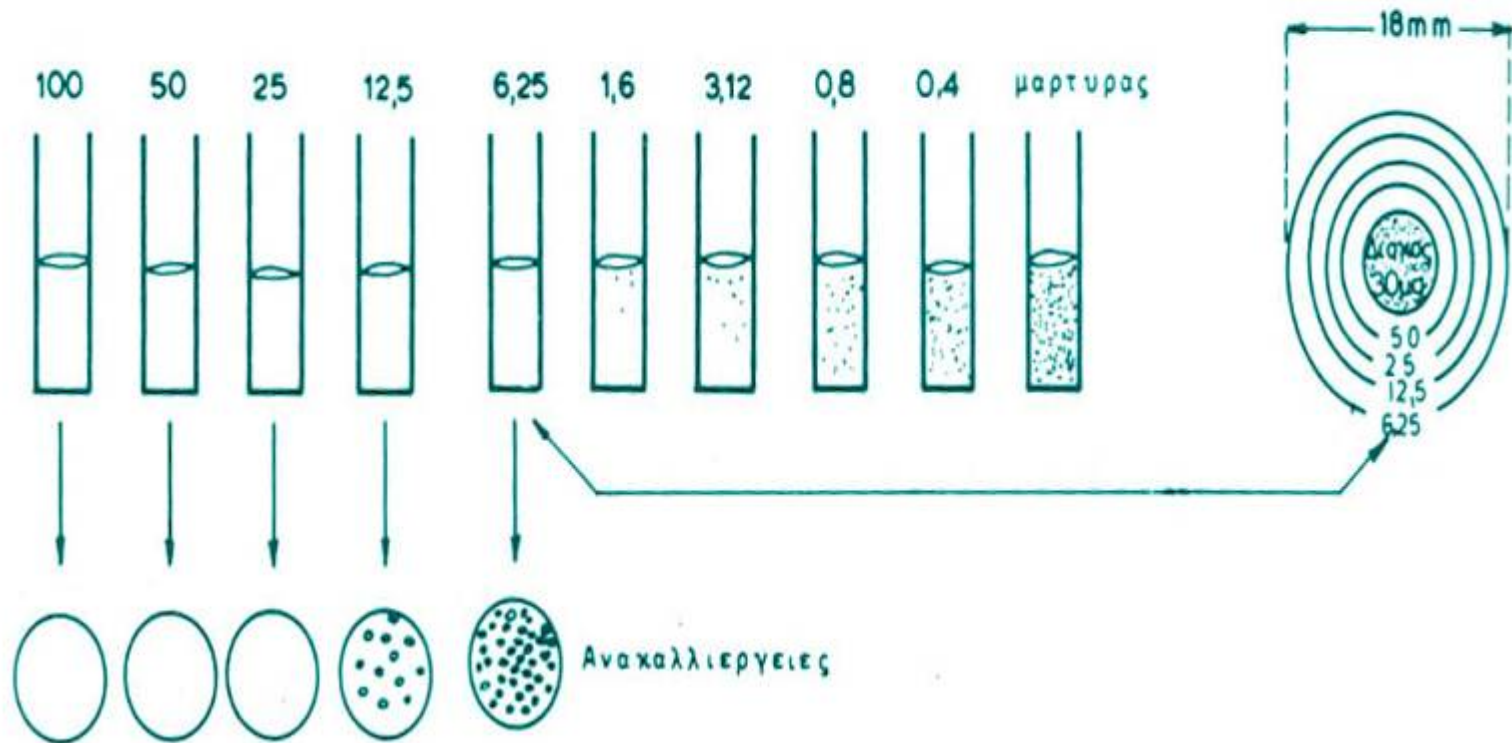
| Σωληνάριο | Ζωμός(ml) | Αντιβιοτικό | Ενοφθάλμισμα (ml) | Τελική συγκ.αντιβ. (IU, μg/ml) |
|-----------|-----------|-----------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| 1 | 0 | 1 mlδιάλυμα εργασίας(200Ιή μg/ml) | 1 | 100 |
| 2 | 1 | 1 mlδιάλυμα εργασίας | 1 | 50 |
| 3 | 1 | 1 ml από σωλ.2 | 1 | 25 |
| 4 | 1 | 1 ml από σωλ.3 | 1 | 12,5 |
| 5 | 1 | 1 ml από σωλ.4 | 1 | 6,25 |
| 6 | 1 | 1 ml από σωλ.5 | 1 | 3,125 |
| 7 | 1 | 1 ml από σωλ.6 | 1 | 1,56 |
| 8 | 1 | 1 ml από σωλ.7 | 1 | 0,78 |
| 9 | 1 | 1 ml από σωλ.8 | 1 | 0,39 |
| 10 | 1 | Τίποτε | 1 | 0 |



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

- **Ανάγνωση αποτελεσμάτων**
 - Εξέταση των σωληναρίων μακροσκοπικά για ανάπτυξη του μικροβίου με την εμφάνιση θολερότητας
 - **Διαυγές σωληνάριο:** η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν δείχνει ανάπτυξη του μικροβίου (MI C_μg/mL)

Συγκέντρωση αντιβιοτικού (μg/ml)

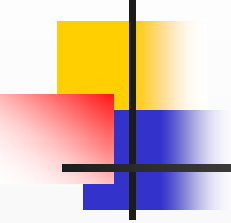


Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση της μεθόδου αραιώσεων σε ζωμό (ΕΑΠ = 12,5 μg/ml, ΕΒΠ = 25 μg/ml). Συσχέτιση με τη μέθοδο διαχύσεως στο άγαρ (μέθοδο δίσκων).



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

- **Μικρομέθοδος**
- **Πλάκες μικροτιτλοποίησης (96 βυθίσματα)**
 - ✓ Υποδιπλάσιες αραιώσεις των αντιβιοτικών
 - ✓ Προσθήκη μικροβιακού εναιωρήματος
 - ✓ Επώαση $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ για 20-24 h
- **MI C: το πρώτο βύθισμα που δεν έχει ανάπτυξη**



ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ (Kirby-Bauer)

- **MHB** εμπλουτισμένος με Ca^{++} , Mg^{++}
- Προσθήκη **αίματος αλόγου** και όχι προβάτου σε μηνιγγιτιδόκοκκο, πνευμονιόκοκκο
- **Χρόνος επώασης έως 20 ώρες** (όχι 18 ώρες)
- Όχι επώαση σε 5% CO_2 για αιμόφιλο και πνευμονιόκοκκο



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ

- Μέθοδος αναφοράς
- Έλεγχος ταυτόχρονα πολλών μικροβίων
- Καλή αναπαραγωγιμότητα



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ

- **Τρυβλία ΜΗΑ** με ενσωματωμένο το αντιβιοτικό σε διάφορες συγκεντρώσεις (διατήρηση σε πλαστικές σακούλες στους 4°C για 1 μήνα)
- pH: 7,2-7,4
- **Όχι εμπλουτισμός με Mg⁺⁺, Ca⁺⁺**
- **Προσθήκη NaCl 2%** (για έλεγχο αντοχής σταφυλοκόκκου σε oxacillin)
- **Προσθήκη 5% αίμα προβάτου** (N.meningitidis, στρεπτοκόκκων εκτός πνευμονιοκόκκου) ή αίμα αλόγου για έλεγχο αντοχής των στρεπτοκόκκων στις σουλφοναμίδες και της λιστέριας



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ

- Ενοφθαλμισμός 1 μl μικροβιακού εναιωρήματος (10^7 - 10^8 CFU/mL)σε κάθε τρυβλίο με τη μορφή κηλίδας 5-8 mm (10^4 CFU/κηλίδα)
- Πρώτα εμβολιάζεται τρυβλίο ΜΗΑ χωρίς αντιβιοτικό και μετά τρυβλία με αντιβιοτικό, αρχίζοντας από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη συγκέντρωση.Στο τέλος εμβολιάζεται και πάλι τρυβλίο χωρίς αντιβιοτικό
- Επώαση $35\pm 2^\circ\text{C}$ για 16-20h σε ατμόσφαιρα O_2



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ

- **Ανάγνωση αποτελεσμάτων**
 - Μία αποικία δεν λαμβάνεται υπόψη
 - Επανάληψη αν υπάρχει ανάπτυξη μικρού αριθμού αποικιών σε πυκνότητες που απέχουν πολύ από την MIC καθώς και αν υπάρχει αναστολή ανάπτυξης στις μικρές συγκεντρώσεις και ανάπτυξη στις μεγαλύτερες
 - MIC: η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλει την ανάπτυξη του μικροβίου



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Χρησιμοποιούνται **2-3 κρίσιμες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (break points)**
 - Η **μία** συγκέντρωση είναι η **ίδια** με αυτή που επιτυγχάνεται στον ορό με τη συνηθισμένη χορήγηση του φαρμάκου και η άλλη **4 φορές μεγαλύτερη**
 - Όταν το μικρόβιο αναπτύσσεται **και στις 2 συγκεντρώσεις θεωρείται ανθεκτικό**
 - Όταν το μικρόβιο αναπτύσσεται **μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση θεωρείται ενδιάμεσης ευαισθησίας** και όταν **δεν αναπτύσσεται σε καμία συγκέντρωση θεωρείται ευαίσθητο**



ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)

■ MBC

- Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού (μg/ml) όπου μετά την επώαση **δεν** παρατηρείται ανάπτυξη μικροβίου (φονεύονται τουλάχιστον τα 99,9% των μικροβίων)



ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)

- ✓ Προσδιορισμός MIC (μακρο ή μικρομέθοδος)
- ✓ **Αραιώσεις του αντιβιοτικού** οκταπλάσια έως $\frac{1}{2}$ ή $\frac{1}{4}$ της αναμενόμενης MIC (συγκεντρώσεις 128-0,06 $\mu\text{g/mL}$)
- ✓ Αρνητικός μάρτυρας (θρεπτικός ζωμός) και θετικός μάρτυρας (μόνο εναιώρημα μικροβίου)
- ✓ **Εμβολιασμός μικροβιακού εναιωρήματος και επώαση** (24 h για Gram-, 48 h για στα σταφυλόκκους, εντερόκοκκους, 72 h για άλλα βακτήρια)
- ✓ **Ανακαλλιέργεια** 10 μl ζωμού σε στερεό θρεπτικό υλικό από τα σωληνάρια ή πηγαδάκια χωρίς ορατή μικροβιακή ανάπτυξη
- ✓ Προσδιορισμός του **αριθμού αποικιών σε κάθε τρυβλίο**



ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)

- **Υπολογισμός του κρίσιμου αριθμού αποικιών κάτω** από τον οποίο η αντίστοιχη συγκέντρωση του αντιβιοτικού θα θεωρηθεί **βακτηριοκτόνος**
- **Υπολογισμός εναιωρήματος (CFU/mL)** του σωληναρίου χωρίς αντιβιοτικό
(CFU/mL=αριθμός αποικιώνxποσότητα ενοφθαλμίσματος
χαραίωση του μάρτυρα ανάπτυξης)
- **Ο αριθμός των** CFU/mL αντιστοιχίζεται σε πίνακα (Pearson) και βρίσκεται ο κρίσιμος αριθμός αποικιών

- **MBC: Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που δίδει αριθμό αποικιών μικρότερο του κρίσιμου**



ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)

- Όχι προτυπωμένη
- Βαριές λοιμώξεις (ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα, λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους)
- Είναι πλησίον της MIC
 - **Βακτηριοκτόνο** αντιβιοτικό: $MBC/MIC < 4$
 - **Βακτηριοστατικό** αντιβιοτικό: $MBC/MIC > 4$



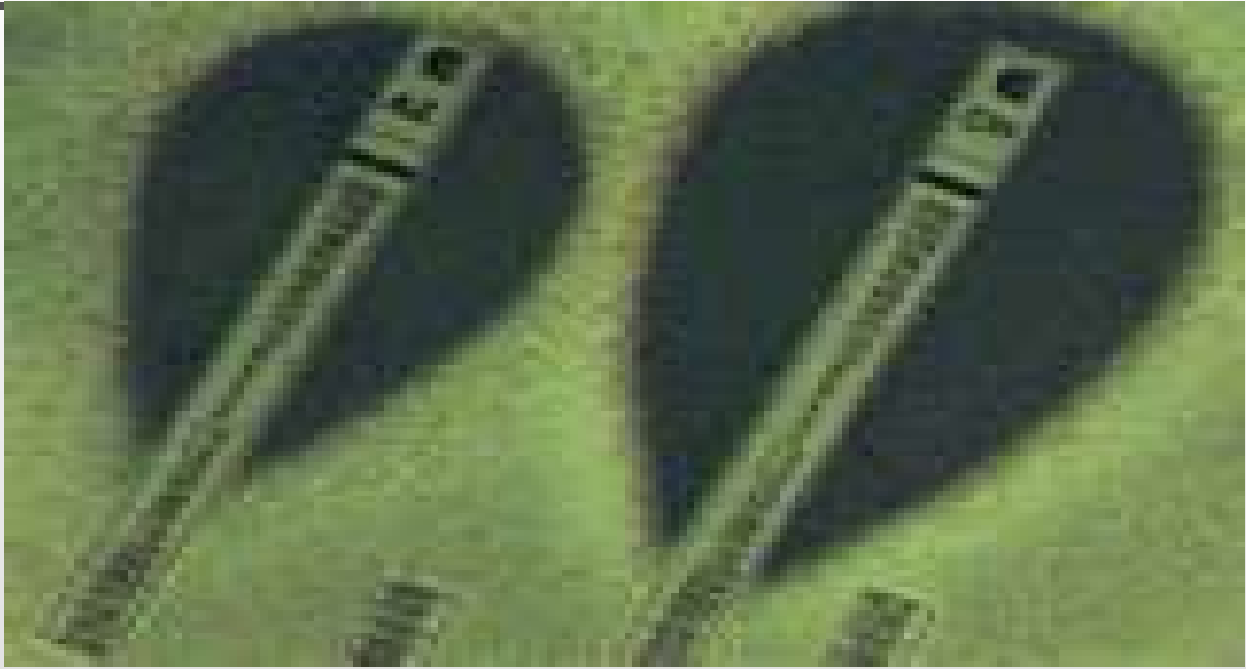
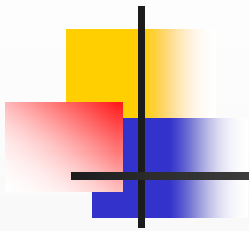
ΕΤΟΙΜΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΙC

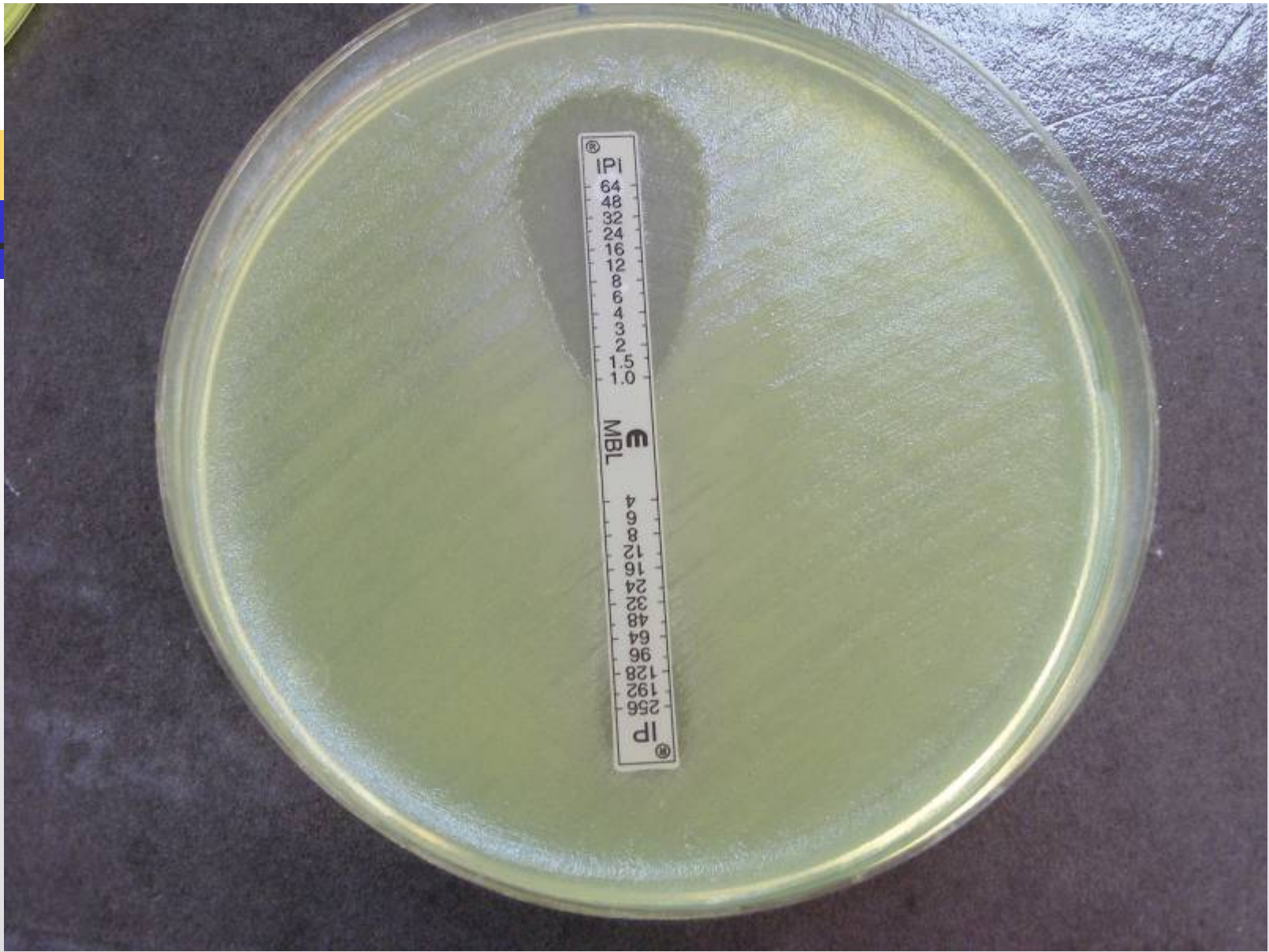
- E-test
- Ημιαυτόματα συστήματα (MicroScan, Wider I , ATB system)
- Αυτόματα συστήματα (Vitek II System, Phoenix System, MicroScan System)



E-test (AB Biodisk)

- Μέθοδος κλιμακωτής διάχυσης του αντιβιοτικού (15 συγκεντρώσεις)
- ✓ Ενοφθαλμισμός συγκεκριμένου μικροβιακού εναιωρήματος σε ΜΗΑ
- ✓ Μετά 15 min τοποθέτηση της ταινίας
- ✓ Επώαση $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 18-24h, αεροβίως
- ❖ **MIC:** Σημείο όπου η έλλειψη συναντά την ταινία







E-test (AB Biodisk)

- Βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά: Πλήρης αναστολή της ανάπτυξης
- Βακτηριοστατικά αντιβιοτικά: 80% αναστολή της ανάπτυξης



MI CROSCAN (Dade Behring)

- Έτοιμες πλάκες μικροτιτλοποίησης για ταυτοποίηση και προσδιορισμό MI C
- Αποτελέσματα σε 16-18 h
- Εύκολος εμβολιασμός κάθε πλάκας
- Ανάγνωση με το μάτι εύκολα
- Αποθήκευση πληροφοριών



Wider I system

- **Ημιαυτόματο σύστημα** ΠΟΥ χρησιμοποιεί εικόνα για ταυτοποίηση και έλεγχο ευαισθησίας σε πλάκες με αραιώσεις αντιβιοτικών

Vitek II System (BioMerieux)

- **Μέθοδος μικροαραιώσεων** με κάρτες που διαθέτουν 64 μικρουποδοχείς (μία υποδοχή για έλεγχο ανάπτυξης του μικροβίου και υποδοχείς συγκεκριμένων ποσοτήτων περίπου 20 αντιβιοτικών)

Vitek II System (BioMerieux)

- Εναιώρημα μικροβίου συγκεκριμένης θολερότητας
- Τοποθέτηση της κάρτας στην επώαση
- Ανά 15 min ελέγχεται φθορισμός, θολερότητα, παραγωγή χρώματος
- MIC σε 4-18h
- Advanced Expert System για ερμηνεία και διόρθωση αποτελεσμάτων



PHOENIX system (BD)

- Μικρομέθοδος
- Ταυτοποίηση και αντιβιόγραμμα
- Για το αντιβιόγραμμα έχει 84 βυθίσματα και ένα βύθισμα ως μάρτυρα ανάπτυξης
- Τρόπος ανάγνωσης: **θολερότητα** (δείκτης ανάπτυξης) και **χρώμα** (αντίδραση μεταβολισμού)
- Σύστημα BDΧpert TM για ερμηνεία και διόρθωση αποτελεσμάτων



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ MIC

- *S. aureus*: oxacillin I
- *Staphylococcus*: vancomycin ≤ 14 mm
- *Enterococcus* με μέτρια ευαισθησία σε vancomycin, gentamicin HL
- *Haemophilus*: επί μη ευαισθησίας σε καρβαπενέμες, μονοπακτάμες, μακρολίδες, κινολόνες
- *N. meningitidis*: επί μη ευαισθησίας σε ampicillin, penicillin, κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς, καρβαπενέμες
- *N. gonorrhoeae*: επί μη ευαισθησίας σε penicillin, κεφαλοσπορίνες τρίτης και τέταρτης γενιάς
- *S. pneumoniae*: από ENY ή άλλη περιοχή αν η oxacillin ≤ 19 mm
- Στρεπτόκοκκοι: πρασινίζοντες από στείρες περιοχές, β -αιμολυτικοί μη ευαίσθητοι σε penicillin, vancomycin. linezolid



ΟΧΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙC

- *Salmonella-Shigella* για κεφαλοσπορίνες πρώτης, δεύτερης γενιάς και αμινογλυκοσίδες
- Μεθικιλίνη ανθεκτικοί σταφυλόκοκκοι για β-λακταμικά αντιβιοτικά
- Εντερόκοκκοι για κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκοσίδες (εκτός των HL), κλινδαμυκίνη, κοτριμοξαζόλη
- *K. pneumoniae, K. oxytoca, E. coli, P. mirabilis* για ESBL+ στελέχη σε κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη



ΕΙΔΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

- ❖ Έλεγχος βακτηριοκτόνου δράσης του αντιβιοτικού στον ορό
- ❖ Συνέργεια αντιβιοτικών



ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ ΣΤΟΝ ΟΡΟ

- Προσδιορισμός της **MBC** του αντιβιοτικού
- Προσδιορισμός των **επιζώντων βακτηρίων** σε ορισμένη συγκέντρωση αντιβιοτικού (Καμπύλη θανάτου)
- Προσδιορισμός του **βακτηριοκτόνου τίτλου** του ορού



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MBC ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ

- Η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που μετά την επώαση έχει φονεύσει τουλάχιστον το 99,9% του αρχικού ενοφθαλμίσματος (επιζεί το πολύ 1 στα 1000 βακτήρια)
- Στηρίζεται στη μέθοδο αραιώσεων στο ζυμό και έχει ως οδηγό την MIC
- Ένδειξη σε **ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα** κ.λ.π



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΒC ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ

- Μακρομέθοδος αραιώσεων σε ζυμό (2ml)
- Προσδιορισμός MIC(α/α από το σωληνάριο χωρίς ορατή ανάπτυξη μετά από ανάδευση 0,1 ml σε ΜΗΑ) 24 h επώαση
- *MBC*:οι αποικίες της αραιώσης που είναι < 10 (0,1 % του ενοφθαλμίσματος $10^6 cfu/ml$)



ΚΑΜΠΥΛΗ ΘΑΝΑΤΟΥ (Killing curve)

- Χρήσιμη στην αξιολόγηση και σύγκριση νέων αντιβιοτικών και στη μελέτη των αλλαγών ευαισθησίας κλινικά σημαντικών στελεχών
- **Μετράει αλλαγές στο χρόνο** και αντιπροσωπεύει μια δυναμική εικόνα δράσης του αντιβιοτικού αλλά σπάνια χρησιμοποιείται για ρύθμιση της χημειοθεραπείας
- **Ο αριθμός των επιζώντων βακτηρίων σε ωρισμένη συγκέντρωση αντιβιοτικού**



ΚΑΜΠΥΛΗ ΘΑΝΑΤΟΥ (Killing curve)

- Ελέγχεται **μόνο μία συγκέντρωση του αντιβιοτικού** (ο μέσος όρος αυτής που επιτυγχάνεται στο αίμα). Κατά περιοδικά διαστήματα της επώασης και στους χρόνους 0,4,8,24 h με δειγματοληψία μετρώνται οι αποκίες (καμπύλη με τον αριθμό αποικιών στη τεταγμένη και το χρόνο στην τετμημένη)
- Σωληνάρια (10 ml MHB) που αντιστοιχούν στους χρόνους δειγματοληψίας (0,4,8,24h) και την επιλεγείσα συγκέντρωση αντιβιοτικού, εμβολιάζονται με 0,1 ml ενοφθαλμίσματος (5×10^7 Cfu/ml → πυκνότητα 5×10^5 Cfu/ml)



ΚΑΜΠΥΛΗ ΘΑΝΑΤΟΥ (Killing curve) (συνέχεια)

- Στους αντίστοιχους χρόνους εμβολιάζονται **0,1 ml καλλιέργηματος σε λειωμένο άγαρ** και παρασκευάζονται **τροβλία**
- Χρησιμοποιείται και σωληνάριο και τροβλίο χωρίς αντιβιοτικό (μάρτυρας ανάπτυξης του μικροβίου). Εναλλακτικά το παραπάνω καλλιέργημα επιστρώνεται σε τροβλία με άγαρ
- **Επώαση και αρίθμηση των επιζώντων στελεχών**



ΚΑΜΠΥΛΗ ΘΑΝΑΤΟΥ (Killing curve) (συνέχεια)

- Καμπύλη σε ημιλογαριθμικό χαρτί, με τον αριθμό των αποικιών στην τεταγμένη και το χρόνο στην τετμημένη
- Καμπύλες για διάφορα μικρόβια σε ένα αντιβιοτικό ή για διάφορα αντιβιοτικά σε ένα μικρόβιο, βρίσκουμε το πιο ευαίσθητο μικρόβιο ή το πιο βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό αντίστοιχα



ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ (Serum Bactericidal Testing)

- Η μεγαλύτερη αραίωση του ορού που προκαλεί θάνατο των μικροβίων
- Εφαρμόζεται για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας της θεραπείας
- Κυρίως σε ασθενείς με σήψη, ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα



ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ (Serum Bactericidal Testing)

- ❖ Λήψη αίματος τη στιγμή που αναμένονται τα **μέγιστα επίπεδα αντιβιοτικού στο αίμα** (30 min μετά την IV, 1h μετά την ενδομυϊκή, 2 1h μετά την από του στόματος χορήγηση)
- ❖ **Αραίωση του ορού** από $1/2$ - $1/256$ σε θρεπτικό ζωμό ή MHB
- ❖ Προσθήκη σε όλες τις αραιώσεις **ίσης ποσότητας μικροβιακού εναιωρήματος** (10^5 cfu/ml) από το μικρόβιο που απομονώθηκε από τον ασθενή
- ❖ Μάρτυρας ανάπτυξης με ζωμό και ενοφθάλμισμα, χωρίς ορό ασθενούς



ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ (Serum Bactericidal Testing) (συνέχεια)

- ❖ **Επώαση 16-18 h σε 35-37 βαθμούς C**
ελέγχεται η μικροβιακή ανάπτυξη σε διάφορες αραιώσεις του ορού
- ❖ **Μέγιστη ανασταλτική αραιώση:** η μεγαλύτερη αραιώση του ορού που **αναστέλλει** τη μικροβιακή ανάπτυξη
- ❖ **Μέγιστη μικροβιοκτόνος αραιώση του ορού** (α/α σωληναρίων όπου είχε παρατηρηθεί αναστολή ανάπτυξης μικροβίου): **η μεγαλύτερη** αραιώση του ορού που προκαλεί **θάνατο** του μικροβίου



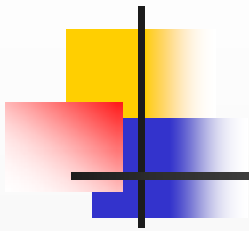
ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ (Serum Bactericidal Testing) (συνέχεια)

- **Μέγιστη μικροβιοκτόνος αραίωση του ορού** (α/α σωληναρίων όπου είχε παρατηρηθεί αναστολή ανάπτυξης μικροβίου): **η μεγαλύτερη αραίωση του ορού που προκαλεί θάνατο του μικροβίου**
- Αυτό αντιστοιχεί στην αραίωση όπου υπάρχει **ελάττωση** του αρχικού ενοφθαλμίσματος κατά **99,9% ή λιγότερο από 10 αποικίες στο αιματούχο άγαρ** από την α/α των σωληναρίων χωρίς ορατή ανάπτυξη



ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ (Serum Bactericidal Testing) (συνέχεια)

- Αποτελεσματική θεραπεία:
- μικροβιοστατικός ορός σε αραίωση $\geq 1:8$
- μικροβιοκτόνος σε αραίωση $\geq 1:4$



ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ (ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ) ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Χρησιμοποιείται στη **πρόληψη εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών (φυματίωση)**
- Σε μακροχρόνια θεραπεία (ενδοκαρδίτιδα, σήψη)
- **Μείωση τοξικότητας** από τη μικρότερη δοσολογία (αμινογλυκοσίδες, σουλφοναμίδες)
- Αντιμετώπιση **πολυμικροβιακών λοιμώξεων**
- Για την επίτευξη **συνεργικού αποτελέσματος** (όπως συνδυασμός τριμεθοπρίμης και σουλφαμεθοξαζόλης για ανθεκτικά στελέχη *S. typhi* ή καρβενικιλίνης με γενταμυκίνη για *Ps. aeruginosa*)



ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- **Η αναστολή βακτηριακών ενζύμων**
(συνδυασμοί β-λακταμικών με αναστολείς β-λακταμασών)
- **Η δράση σε διαφορετικούς στόχους**
(συνδυασμοί β-λακταμικών με αμινογλυκοσίδες έναντι εντεροκόκκων ή σταφυλοκόκκων)
- **Η αναστολή διαδοχικών αντιδράσεων σε κοινό βιοχημικό μονοπάτι** (συνδυασμός σουλφοναμίδης με τριμεθοπρίμη)



ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Η παρεμπόδιση δράσης του βακτηριοκτόνου από βακτηριοστατικό αντιβιοτικό (πενικιλίνη-τετρακυκλίνη)
- Η κατάληψη κοινού βιολογικού στόχου (μακρολίδες, λινκοσαμίνες, χλωραμφαινικόλη που ενώνονται με την 50S υπομονάδα του ριβοσώματος)
- Η παρεμπόδιση εισόδου του αντιβιοτικού στο βακτήριο (παρεμπόδιση εισόδου αμινογλυκοσίδης από χλωραμφαινικόλη)
- Η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού από ένζυμα (επί συνδυασμού β-λακταμικών π,χ κεφοξιτίνη με κεφοταξίμη)



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- **Συνεργικό**: το αποτέλεσμα του συνδυασμού είναι **μεγαλύτερο** από το άθροισμα των αποτελεσμάτων καθενός αντιβιοτικού χωριστά
- **Αθροιστικό**: το αποτέλεσμα του συνδυασμού είναι **ίσο** με το άθροισμα των επιμέρους αποτελεσμάτων
- **Αδιάφορο**: το αποτέλεσμα του συνδυασμού είναι **ίσο** με το αποτέλεσμα του **δραστικότερου**
- **Ανταγωνιστικό**: ο συνδυασμός είναι **σαφώς λιγότερο** δραστικός από το **δραστικότερο** αντιβιοτικό του συνδυασμού



ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Με βάση την **MIC** ή **MBC** του συνδυασμού (ελάττωση=συνέργεια, αύξηση=ανταγωνισμός)
- Με βάση τις **κλασματικές MIC** (**FIC**=Fractional Inhibitory Concentration) που είναι ο λόγος της συγκέντρωσης (που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης) του ενός (A) ή του άλλου (B) αντιβιοτικού στο συνδυασμό δια της MIC του αντιβιοτικού μόνο του
- **Ισοβόλογραμμα**



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- **Αθροιστικό ή αδιάφορο αποτέλεσμα:**

$$FIC_A + FIC_B = 1.0$$

- **Συνέργεια:** $FIC_A + FIC_B \leq 0,5$

- **Ανταγωνισμός:** $FIC_A + FIC_B > 1.0$



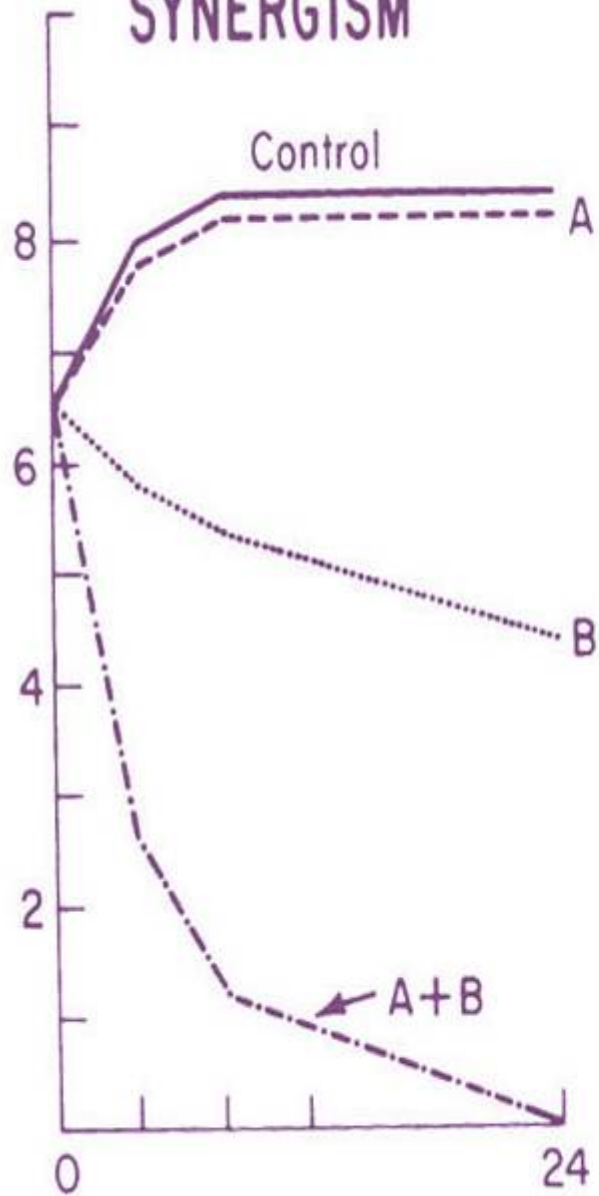
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

■ **Ισοβολόγραμμα**

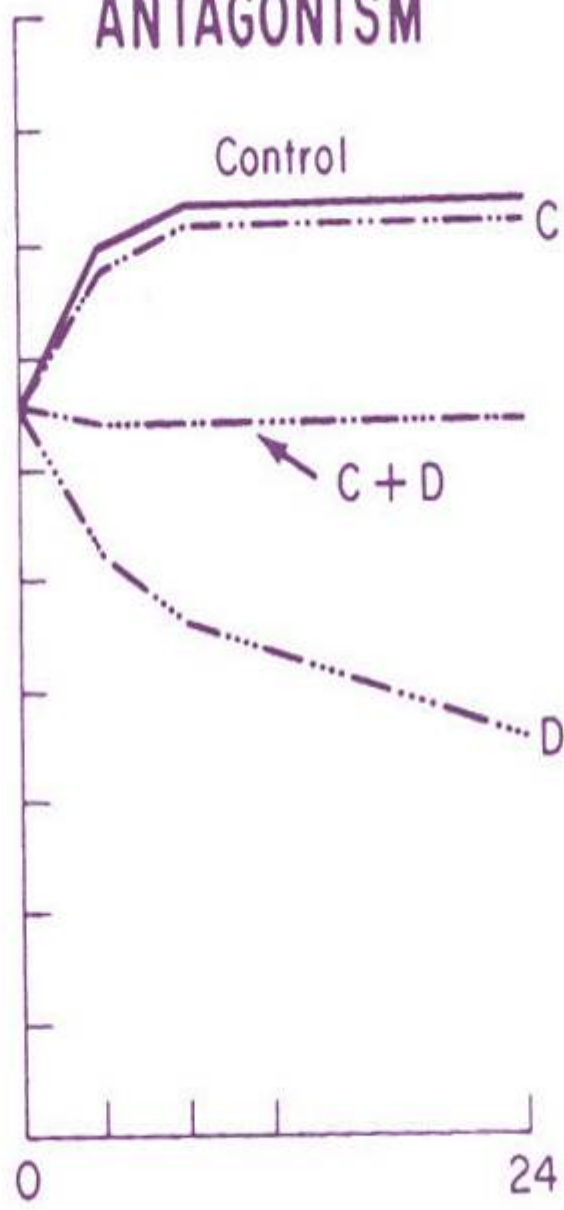
- Σε άξονες χ,ψ καταγράφονται οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού και ανάλογα με τη μορφή ανάπτυξης σχηματίζεται καμπύλη
- **Κυρτή**: ανταγωνιστικό αποτέλεσμα
- **Ευθεία** : αθροιστικό αποτέλεσμα
- **Κοίλη**: συνεργικό αποτέλεσμα

LOG NO. VIABLE ORGANISMS

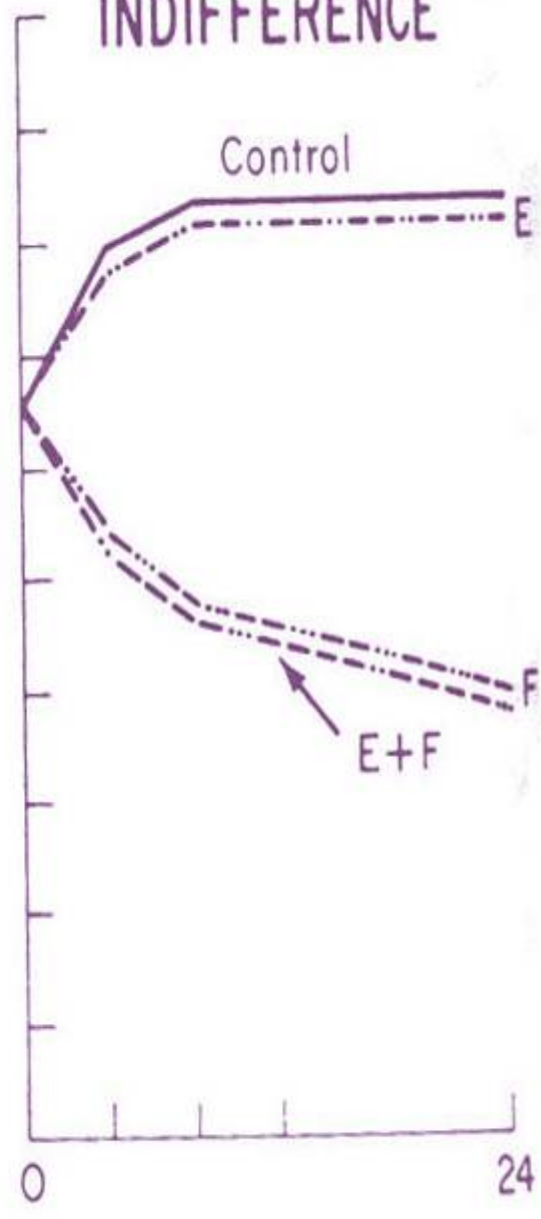
SYNERGISM



ANTAGONISM



INDIFFERENCE



HOURS



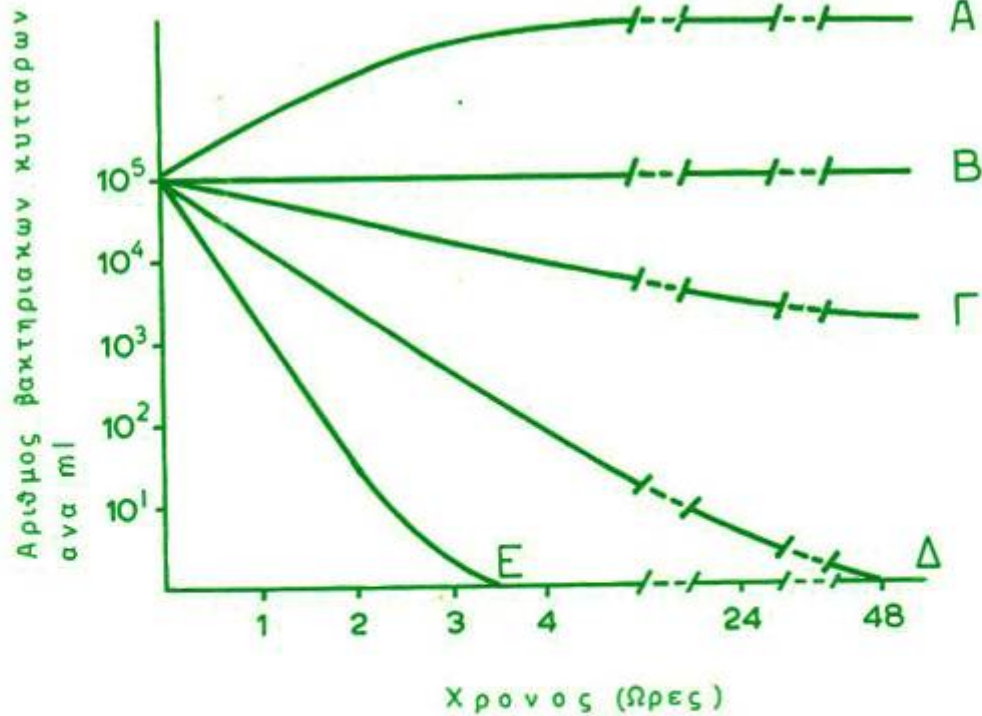
ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Ρυθμός θανάτου (Killing curves)
- Μέθοδος σκακιέρας (ντάμας ή checkerboard)
- Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δίσκους ή ταινίες



ΡΥΘΜΟΣ ΘΑΝΑΤΟΥ

- ❖ **Σχεδιάζονται οι καμπύλες με κάθε αντιβιοτικό χωριστά και με το συνδυασμό**
- Το βακτήριο εμβολιάζεται σε ζωμό χωρίς αντιβιοτικό, σε ζωμό που περιάχει κάθε αντιβιοτικό χωριστά και σε ζωμό που περιέχει το συνδυασμό των αντιβιοτικών
- Σε ωρισμένα χρονικά διαστήματα γίνεται δειγματοληψία από κάθε καλλιέργεια, αραιώνεται και γίνεται α/α από όπου αριθμούνται τα ζώντα βακτήρια



Σχήμα 6. Αποτελέσματα συνδυασμού αντιβιοτικών (Καμπύλες θανάτου). A=Μάρτυρες (χωρίς αντιβιοτικά). B=Ανταγωνισμός των αντιβιοτικών Γ και Δ. Γ=Ένα αντιβιοτικό. Δ=Δεύτερο αντιβιοτικό. E=Συνέργεια των αντιβιοτικών Γ και Δ.



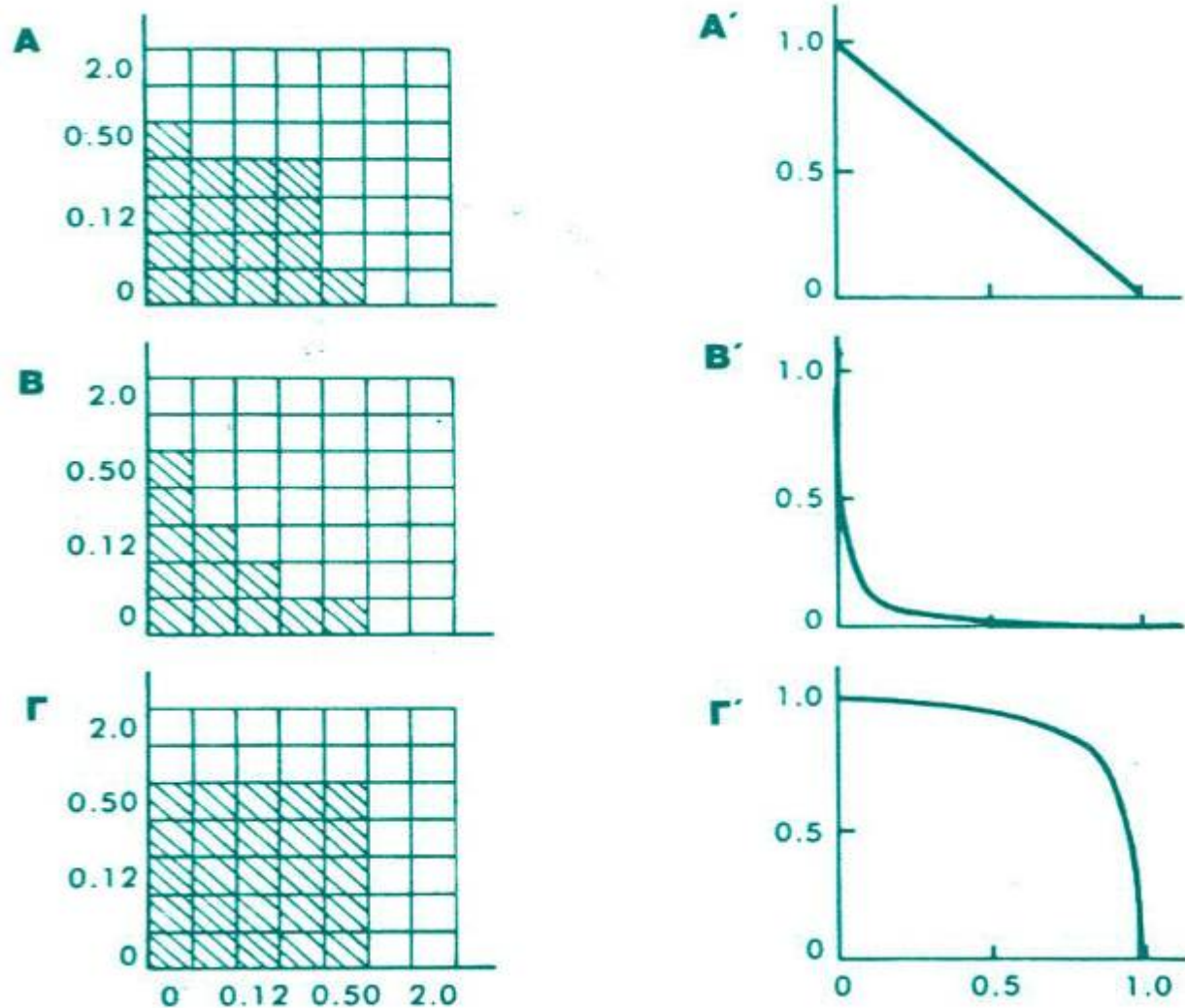
ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΚΑΚΙΕΡΑΣ (ΝΤΑΜΑΣ)

- Εξετάζονται **πολλαπλές αραιώσεις συνδυασμού αντιβιοτικών** σε συγκεκριμένο βακτήριο και τα αποτελέσματα εκφράζονται με γραφική παράσταση
- Σε σωληνάρια (ή πλάκες μοκροτιτλοποίησης) γίνονται υποδιπλάσιες αραιώσεις αντιβιοτικών και προστίθεται ωρισμένο ενοφθάλμισμα



ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΚΑΚΙΕΡΑΣ (ΝΤΑΜΑΣ) (συνέχεια)

- Σε άξονα συντεταγμένων τοποθετούνται **οι αραιώσεις των αντιβιοτικών και έτσι σχηματίζεται σκακιέρα**
- Μετά ωρισμένο χρόνο επώασης σημειώνονται **οι αραιώσεις κάθε αντιβιοτικού και του συνδυασμού αυτών που αναστέλλουν την ανάπτυξη**



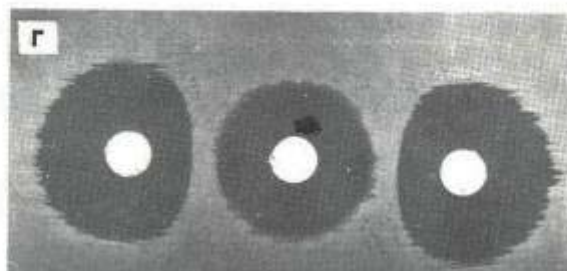
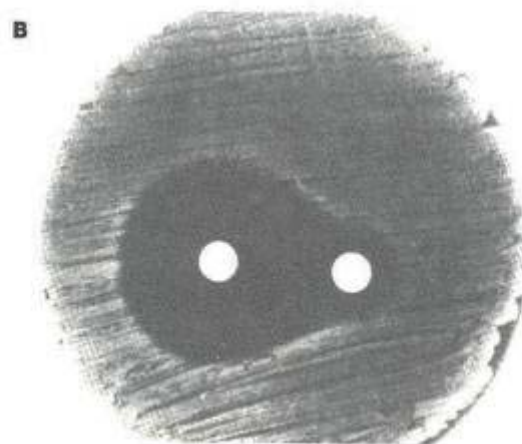
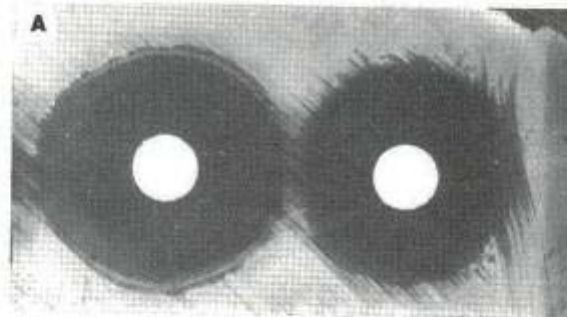
Σχήμα 7. Έλεγχος συνδυασμού αντιβιοτικών με τη μέθοδο της ντάμας. Α, Β, Γ=αραιώσεις των δύο αντιβιοτικών σαν πολλαπλάσια της ΕΑΠ. Σκίαση=ορατή ανάπτυξη μετά την επώαση. Α',Β',Γ'=αντίστοιχα ισοβολογράμματα. Α,Α'=αδιάφορο αποτέλεσμα (αθροιστικό). Β,Β'=συνέργεια. Γ,Γ'=ανταγωνισμός.

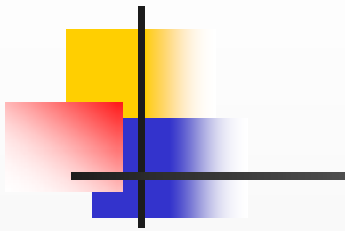


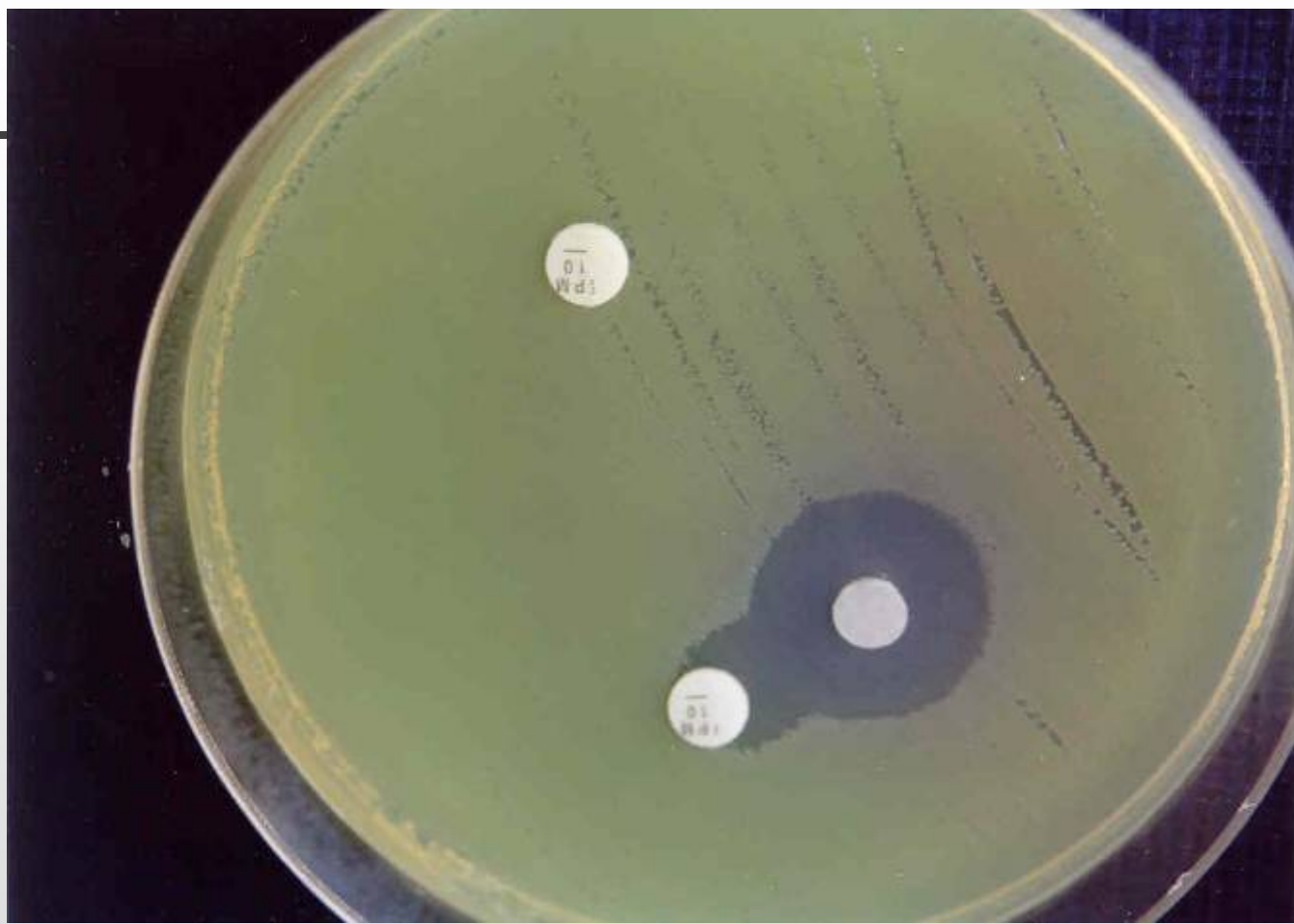
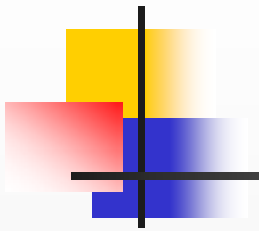
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΣΕ ΑΓΑΡ ΜΕ ΔΙΣΚΟΥΣ Ή ΤΑΙΝΙΕΣ

- **Δίσκοι ή ταινίες εμποτισμένες με αντιβιοτικό** που τοποθετούνται στην επιφάνεια άγαρ εμβολιασμένου με το βακτήριο
 - Στην κάθε περίπτωση σχηματίζονται **χαρακτηριστικές ζώνες αναστολής**
 - Οι συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού από τη διάχυση δεν σχετίζονται σαφώς με αυτές που επιτυγχάνονται στο αίμα

4.3. Απλούστεροι τρόποι ελέγχου της αλληλεπίδρασης του συνδυασμού δύο φαρμάκων είναι με δίσκους ή ταινίες εμποτισμένες με αντιβιοτικό, που τοποθετούνται στην επιφάνεια άγαρ εμβολιασμένου με το βακτήριο. Στην κάθε περίπτωση σχηματίζονται χαρακτηριστικές ζώνες αναστολής (Σχήμα 8). Οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου από τη διάχυση δεν σχετίζονται σαφώς με αυτές που επιτυγχάνονται στο αίμα.









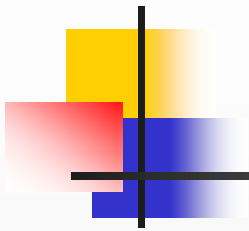
ΔΙΑΦΩΝΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

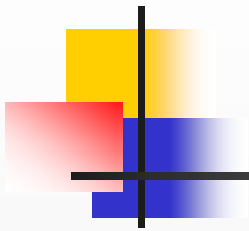
- Οι δοκιμασίες ευαισθησίας των μικροβίων στα αντιβιοτικά είναι χρήσιμος και πολύτιμος οδηγός στην αντιμικροβιακή θεραπεία
- Σε μερικές περιπτώσεις όμως παρατηρούνται **διαφωνίες** μεταξύ των εργαστηριακών δεδομένων και της κλινικής ανταπόκρισης στη θεραπεία



ΑΙΤΙΑ ΑΣΥΜΦΩΝΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΙΝ VITRO ΚΑΙ ΙΝ VIVO ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Αποτυχία του αντιβιοτικού να φθάσει στη θέση λοίμωξης
- Μειωμένη ανάπτυξη του μικροβίου in vivo λόγω αύξησης του χρόνου διπλασιασμού (γενεάς) από 20' π.χ σε 70
- Ανταγωνισμός των αντιβιοτικών στη θέση λοίμωξης
- Ανάγκη χρήσης βακτηριοκτόνου αντί βακτηριοστατικού αντιβιοτικού (μηνιγγίτιδα)
- Ανάπτυξη αντοχής κατά τη διάρκεια της θεραπείας

- 
-
- Για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων των ασθενών απαιτείται συνεργασία κλινικών και εργαστηριακών ιατρών
 - Οι πρόοδοι στη μεθοδολογία ελέγχου της μικροβιακής ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έχουν συμβάλλει στην ορθή αντιμετώπιση των ασθενών με λοιμώξεις



ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ