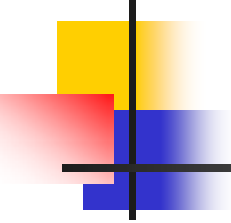


ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ



ΕΛΕΝΗ ΒΑΓΙΑΚΟΥ

Αναπληρώτρια Διευθύντρια
Μικροβιολογικού Εργαστηρίου ΓΝΑ
«Γ.Γεννηματάς»

- 
-
- **CLSI** (Clinical Laboratory Standards Institute)
 - **EUCAST** (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
 - BSAC, DIN, κ.α.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ (Kirby- Bauer)



ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Διάχυση του αντιβιοτικού από περιοχή μεγαλύτερης πυκνότητας σε περιοχή μικρότερης πυκνότητας → ζώνη αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου



ΣΤΑΔΙΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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



ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

■ Μη απαιτητικά βακτήρια

- Mueller-Hinton (MH) άγαρ

■ Απαιτητικά βακτήρια

- MH άγαρ με 5% απινιδωμένο αίμα προβάτου (στρεπτόκοκκοι, μηνιγγιτιδόκοκκοι)
- Haemophilus test medium (HTM)
- GC άγαρ + IsoVitalex (γονόκοκκο)



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

- ❖ Σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας
- ❖ Ομοιόμορφο πάχος θρεπτικού υλικού (4 mm)
- ❖ Διατήρηση τρυβλίων σε 2-8⁰ C (έως 7 ημέρες, έως 1 μήνα σε πλαστικές σακούλες)



ρΗ ΥΛΙΚΟΥ ΘΥΜΙΝΗ ΔΙΣΘΕΝΗ ΚΑΤΙΟΝΤΑ

- ✓ **pH:** 7,2-7,4
- ✓ Χαμηλή περιεκτικότητα σε **θυμίνη ή θυμιδίνη** (κυρίως για κοτριμοξαζόλη)
- ✓ Περίσσεια δισθενών κατιόντων **Ca, Mg** μειώνει τις ζώνες αναστολής σε αμινογλυκοσίδες σε στελέχη *P.aeruginosa* και αυξάνει τη ζώνη αναστολής στην Daptomycin



ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ

● **Θολερότητα 0,5 McFarland**

- Άμεσο εναιώρημα 4-5 μεμονωμένων και ομοιομόρφων αποικιών από μη εκλεκτικό υλικό σε 2 ml στείρο φυσιολογικό ορό ή θρεπτικό ζωμό
- Εναιώρημα λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης (για μη απαιτητικά βακτήρια με εξαίρεση το σταφυλόκοκκο) από καλλιέργημα 1-2 ημερών από εκλεκτικό ή μη υλικό, σε 4-5 ml θρεπτικό ζωμό (επώαση 2-8 h αεροβίως στους 35⁰ C)



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 ΔΙΣΚΩΝ 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**



ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ

- **Εισαγωγή στον κλίβανο:** εντός 15 min, ανεστραμμένο τρυβλίο
- **Μη απαιτητικά βακτήρια:** συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα στους 35⁰ C
- **Απαιτητικά βακτήρια:** συνθήκες 5-10% CO₂ στους 35⁰ C
- **Επώαση:** 16-18 h
- **Επώαση:** 20-24 h (*Streptococcus spp*, *N. meningitis*, *N.gonorrhoeae*)
- **Επώαση 24 h:** έλεγχος οξακιλλίνης σε σταφυλόκοκκο
βανκομυκίνης σε σταφυλόκοκκο και εντερόκοκκο
P.aeruginosa σε ασθενείς με ινοκυστική νόσο

ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ



- ✓ **Όριο ζώνης αναστολής:** το σημείο όπου δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι
- ✓ **Μέτρηση των ζωνών αναστολής (χάρακας, ειδικά όργανα):**
προσπίπτοντα φωτισμό
διελαύνοντα φωτισμό
- ✓ **Αγνοείται:** ο ερπυσμός μέσα στις ζώνες αναστολής του *Proteus spp* ή λεπτή ανάπτυξη μέχρι 20% ή και λιγότερο μέσα στη ζώνη αναστολής στις σουλφοναμίδες, τριμεθοπρίμη και το συνδυασμό τους
- ✓ **Μεμονωμένες αποικίες μέσα στη ζώνη αναστολής** → μικτό καλλιέργημα ή ανθεκτικοί μεταλλάκτες (ετερογένεια)



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ KIRBY-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 KIRBY-BAUER

- Προτυπωμένη για ορισμένα βακτήρια
- Αυστηρή εφαρμογή των οδηγιών
- **Προσδιορισμός MIC σε:**
 - Μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα
 - **Staphylococcus spp** με ζώνη αναστολής στη Vanco ≤ 14 mm
 - **Enterococcus spp** με ζώνη αναστολής στη Vanco 15-16 mm ή/και στη Genta H-L (120 μ g) 7-9 mm
 - **Πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι** από στείρες περιοχές
 - **Πνευμονιόκοκκος (ENY)** και όταν η ζώνη αναστολής στην oxacillin (1 μ g) ≤ 19 mm
 - **Μιनिγγιτιδόκοκκο** (έλεγχος Pen, Amp)
Μη ευαίσθητα βακτήρια (CLSI)



ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ KIRBY-BAUER

- ☑ Θεραπεία του ασθενούς με το κατάλληλο αντιβιοτικό
- ☑ Επιδημιολογική επιτήρηση της ανάπτυξης αντοχής
- ☑ Μηχανισμοί αντοχής
- ☑ Απαιτείται εσωτερικός και εξωτερικός έλεγχος ποιότητας (Quality control)



ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

- ① Kirby-Bauer
- ② Προσδιορισμός MICs με μέθοδο αραιώσεων σε ζωμό ή σε άγαρ ή με τη μέθοδο του E-test
- ③ Μοριακές μέθοδοι



ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΣΤΗ VANCOMYCIN

- ☀ **Κριτήρια ευαισθησίας *S.aureus* (CLSI,2006)**
- ① Ευαισθησία σε Vanco: MIC 0,5-2mg/L
- ② Μέτρια ευαισθησία MIC 4-8 mg/L (**VISA**)
- ③ Αντοχή MIC \geq 16 mg/L (**VRSA**)



ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ VANCOMYCIN *S.AUREUS*

- **E-test** (μικρομέθοδος, μακρομέθοδος)
Μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζυμό: ευαίσθητες για VISA, VRSA
- **Kirby-Bauer**: ευαίσθητη για **VRSA**
- **BHI agar + V6** (ευαισθησία για στελέχη με $MIC \geq 8 \mu g/ml$, **VISA, VRSA**)
- **Πληθυσμιακή ανάλυση** (η πλέον ευαίσθητη για MIC)

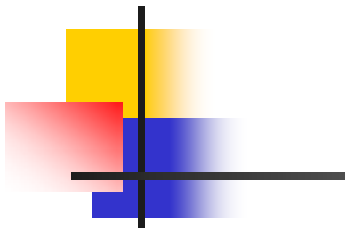
ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ *S. AUREUS*

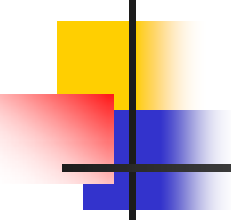
Γενικευμένες λοιμώξεις από MRSA	Εντοπισμένες λοιμώξεις από MRSA
MIC	Agar screen
Vanco ≥ 4 mg/L , Teico > 8 mg/L Πιθανή αντοχή	BHI agar + 6 mg/L Vanco > 1 αποικία Πιθανή αντοχή (VISA, VRSA)
Επιβεβαίωση	
E-test (κλασσική)	E-test (μακρομέθοδος)
MHI/0,5 MF/24 h (Vanco ≥ 6 mg/L)	BHI/2MF/48h (≥ 8 mg/L Vanco Teico ≥ 12 mg/L)

ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΣΕ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ, ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΝΕΣ, ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΙΝΗ Β

Φαινότυποι αντοχής

- **M-τύπος:** αντοχή μόνο Erythro
- MS-τύπος :αντοχή σε μακρολίδες και στρεπτογραμίνη (MS τύπος) (mrsA γονίδιο που κωδικοποιεί αντλία εκροής →(CoNS)→μοριακή μέθοδος
- **MLSB τύπος** (erm γονίδια)
Σταθερός → αντοχή Erythro, Clinda
Επαγωγίμος → αντοχή Erythro και φαινοτυπικά ευαισθησία Clinda →D-test)





ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΣΤΑ β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- ▶ Τροποποίηση του αντιβιοτικού
(σύνθεση β-λακταμάσης)
- ▶ Τροποποίηση του στόχου
(PBP_s-αντοχή στη methicillin)
- ▶ Τροποποίηση υπάρχουσας PBP_s
(πολύ μικρό ποσοστό)



ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ β- ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ

- ★ **Δίσκος νιτροσεφίνης** (χρωμογόνος κεφαλοσπορίνη)
Αποικίες βακτηρίου ενοφθαλμίζονται στο δίσκο
Θετικό αποτέλεσμα: κόκκινο χρώμα
- ★ **Έμμεσος τρόπος** από την ευαισθησία στη penicillin (10 IU)
E σε Pen → **E** στις υπόλοιπες πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, στους συνδυασμούς με αναστολείς
A σε Pen-E σε oxa → **A** στις πενικιλίνες (amp, amox, azlocillin, carbenicillin, pip, tic)
E στις ημισυνθετικές, στους συνδυασμούς με αναστολείς, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες



ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΗΙCΙLLIN

Ανίχνευση του *mecA* γονιδίου

Μοριακή μέθοδος (υβριδισμός, PCR, μικροσυστοιχίες) (Μέθοδος αναφοράς)

Συγκολλητινοαντίδραση (PBP2a, MRSA screen test, FDA)

Φαινοτυπική μέθοδος : διάχυση δίσκων σε άγαρ, με cefoxitin (30 µg)

Αντοχή

- CoNS Διάμετρος ζώνης αναστολής ≤ 24 mm
- *S.aureus*, *S.lugdunensis* ≤ 19 mm



ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΣΤΗ ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ

**Αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά,
συνδυασμούς με αναστολείς β-
λακταμασών, ιμιπενέμη, αζτρεονάμη**



ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ ΣΤΙΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ

Έλεγχος όλων των αμινογλυκοσιδών

Kirby-Bauer

A σε Genta A σε όλες τις αμινογλυκοσίδες

A σε Tobra A σε Kana, Amika

A σε Kana A σε Amika

Μοριακές μέθοδοι

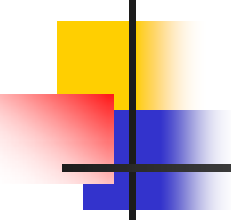


ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

- **Μέθοδος διάχυσης δίσκων σε άγαρ (Kirby-Bauer)**
(MH/agar, 0,5 MF/24h, 35°C)
Αντοχή Vanco (30μg) ≤14 mm, ενδιάμεση ευαισθησία (15-16 mm)
Teico(30 μg) ≤10 mm και ενδιάμεση ευαισθησία (11-13 mm)
- **BHI agar-V6**
10 μl → 0,5MF/24h, 35°C > 1 αποικία → αντοχή → MIC
- **MICs**
E-test ή μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό ή άγαρ

ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

- **Γενικευμένες λοιμώξεις**
- Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους-κινητικότητα – χρωστική
- MIC Vanco, Teico (αν Vanco $\geq 4\mu\text{g/ml}$ → πιθανό VRE)
↓
- Επιβεβαίωση με υβριδισμό (VanA, VanB)
E-test (MHA/0,5MF/24h-Vanco, Teico)



ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

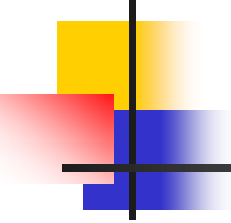
- **Εντοπισμένες λοιμώξεις
(ουρολοιμώξεις, φορεία)**
- ▶ Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους-κινητικότητα-χρωστική
- ▶ Kirby-Bauer ή BHI-V6 (>1 αποικία → πιθανό VRE)
- ▶ Επιβεβαίωση με E-test (MHA/0,5 MF/24h,
- ▶ Vanco, Teico)

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ *ENTEROCOCCUS spp* ΣΕ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ



Μηχανισμοί αντοχής

- Τροποποιημένη συγγένεια των PBPs (**κυρίως**)
A: αμπικιλίνη και συνδυασμούς των β-λακταμικών με ανστολείς
- **Σπάνια:** παραγωγή β-λακταμάσης (δίσκος νιτροσεφίνης)
A: μόνο στην αμπικιλίνη



ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΟΥ ΣΤΑ β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΕΚΤΟΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ (CLSI 2006, M-100-S16)

Μέθοδος δίσκων

- **Oxacillin 1μg**

Διάμετρος ≥ 20 mm → ευαίσθητο σε όλα τα β-λακταμικά

Διάμετρος ≤ 19 mm → **MIC** με E-test ή μέθοδο μικροαραιώσεων → Πενικιλίνη, κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη)

- **Μηχανισμός αντοχής:** Τροποποιημένες PBP_s

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΟΥ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ (CLSI, 2006, M100-S16)

Πενικιλίνη

MIC, E-test ή μέθοδος
μικροαραιώσεων

Κεφοταξίμη ή
κεφτριαζόνη

MIC, E-test ή μέθοδος
μικροαραιώσεων

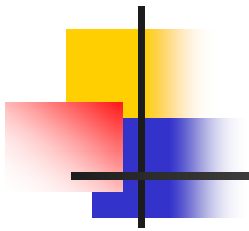
Βανκομυκίνη

MIC, E-test, μέθοδος
μικροαραιώσεων ή
διάχυσης δίσκων



ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΟΥ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ

- **Δοκιμασία ανταγωνισμού ερυθρομυκίνης (15μg) και κλινδαμυκίνης (2μg):** σε απόσταση 15-20mm σε MH agar (0,5MF/20-24h, CO₂ 3-5%) (**D-test**)
- **Ιδιοσυστατικός φαινότυπος (MLSBc):** A σε Erythro, Clinda*
- **Επαγωγίμος (MLSBi):** A στην Erythro και φαινοτυπικά ευαισθησία στην Clinda, D-test (+)*
 - *Τροποποίηση του στόχου δράσης (14μελείς, 15μελείς, 16μελείς)
- **Τύπος M :** A στην Erythro και κανονική άλως γύρω από την Clinda (αντλία εκροής, mef A, μόνο 14μελείς και 15μελείς μακρολίδες)



ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ *H. influenzae* ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- Μέθοδος διάχυσης δίσκων σε άγαρ (HTM, 0,5MF/5% CO₂, 35°C, 16-18h)
- **Δοκιμασία νιτροσεφίνης:** + → **A** σε amp. και **E** σε amox/clav, κεφαλοσπορίνες ισχύει η in vitro ευαισθησία
- **Σε στελέχη BLNAR** (υποψία επί μικρών ζωνών αναστολής και σε amox/clav) → **A** στην amp, amox/clav, pip/taz, tic/clav, κεφαλοσπορίνες 1^{ης}, 2^{ης} γενιάς
- **Σε μηνιγγίτιδα έλεγχος MIC** (E-test, μέθοδος μικροαραιώσεων)



ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ *N. gonorrhoeae* ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- Μέθοδος αραιώσεων αντιβιοτικών σε άγαρ
 - E-test
 - Kirby-bauer
- ΜΟΝΟ ΣΕ ΑΓΑΡ**

Δοκιμασία νιτροσεφίνης (β-λακταμάση)

- ❖ Στελέχη β-λακταμάση (+) → A: Pen, amp, amox
- ❖ Στελέχη β-λακταμάση (-) → έλεγχος στην Pen (χρωμοσωμιακή αντοχή) και τα λοιπά αντιβιοτικά με **Kirby-bauer**
- ❖ Στελέχη με **ενδιάμεση ευαισθησία** ελέγχονται με **E-test** και αποστολή σε κέντρα αναφοράς



ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ *N. meningitidis* ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- Kirby-Bauer
- Pen και Amp μόνο με E-test
- MIC: E-test και μέθοδος αραιώσεων σε ζωμό και άγαρ

- **Δοκιμασία νιτροσεφίνης**
(+): A σε pen, amp, amox
(-): A pen συνεπάγεται A σε όλα τα β-λακταμικά

- **Ναλιδιξικό οξύ:** ανιχνεύει μειωμένη ευαισθησία στις κινολόνες (ως χημειοπροφύλαξη) (30μg, ζώνη αναστολής $\leq 26\text{mm}$ ή $\text{MIC} \geq 8\mu\text{g}$)

ΚΑΤΑΤΑΞΗ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΣΕ ΤΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑ Amplifier

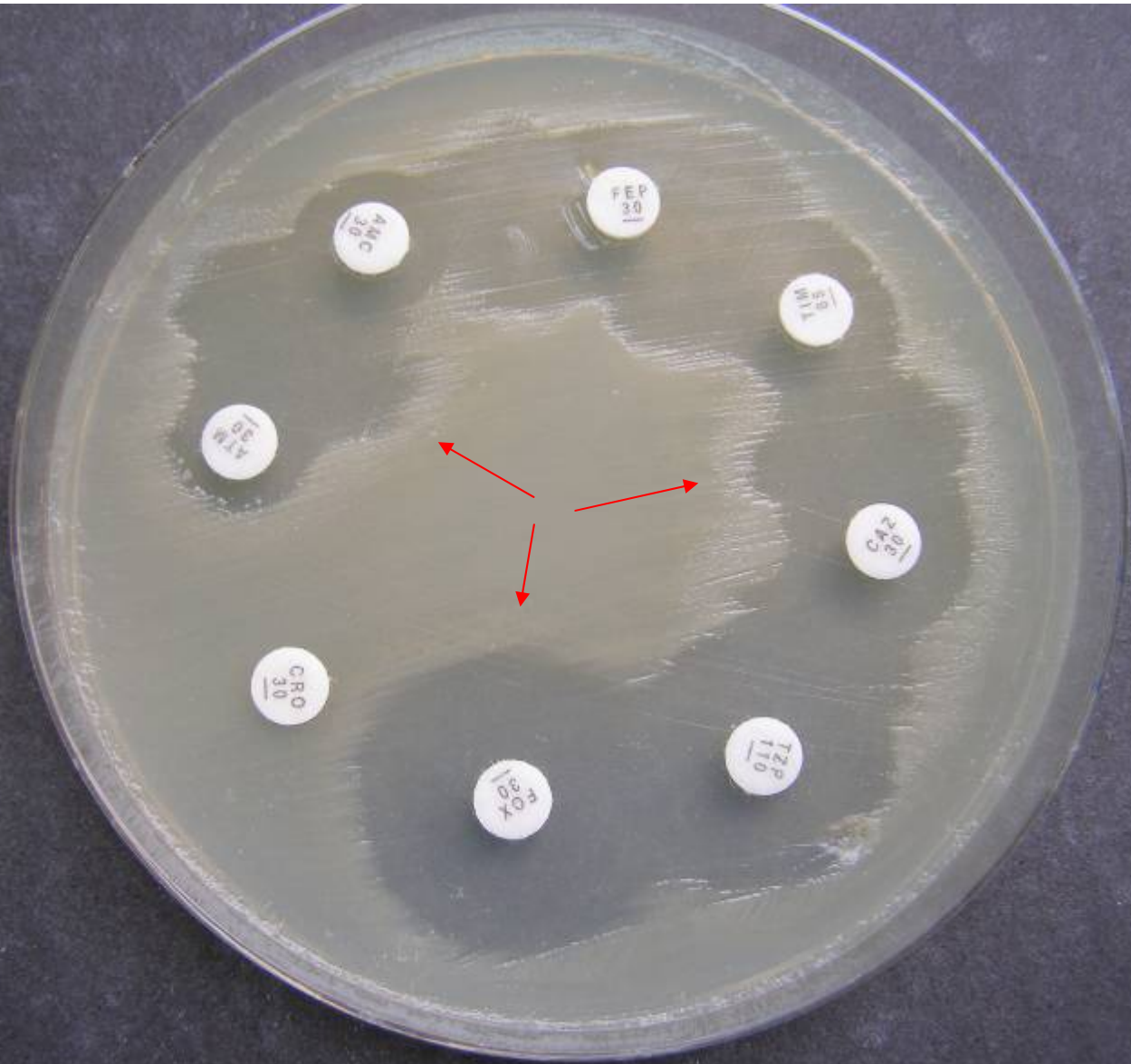
β-λακταμάσες	Ομάδες	Υδρόλυση	Αναστολή από κλαβ.οξύ	Τάξη
Ευρέος φάσματος	TEM 1,2 SHV-1	Pen,Κεφαλοσπ.1 ^{ης} γενιάς	+++	A
	OXA		+	D
Εκτεταμένου φάσματος	TEM,SHV	CTX,CAZ	++++	A
	CTX-M	FEP	++++	A
	OXA	Pen(oxa), Κεφαλοσπ. 1 ^{ης} ,2 ^{ης} ,3 ^{ης} γενιάς, μονομπακτάμη	+	D
	PER,BES,GES,IBC,SF O,TLA,VEB	Pen(oxa), Κεφαλοσπ.1 ^{ης} ,2 ^{ης} ,3 ^{ης} γενιάς, μονομπακτάμη	++++	A
AmpC	ACC,ACT,CFE,CMX, DHA,FOX,LAT,MIR, MOX	Pen, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες,	0	C
Καρβαπενεμάσες	IMP,VIM,GIM,SMP(μ εταλλοένζυμα)	Pen, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες ,καρβαπενέμες	0	B
	KPC-1,KPC-2,KPC-3	Pen, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες	+++	A
	OXA-23 έως 27,40,48	Pen, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες	+	D

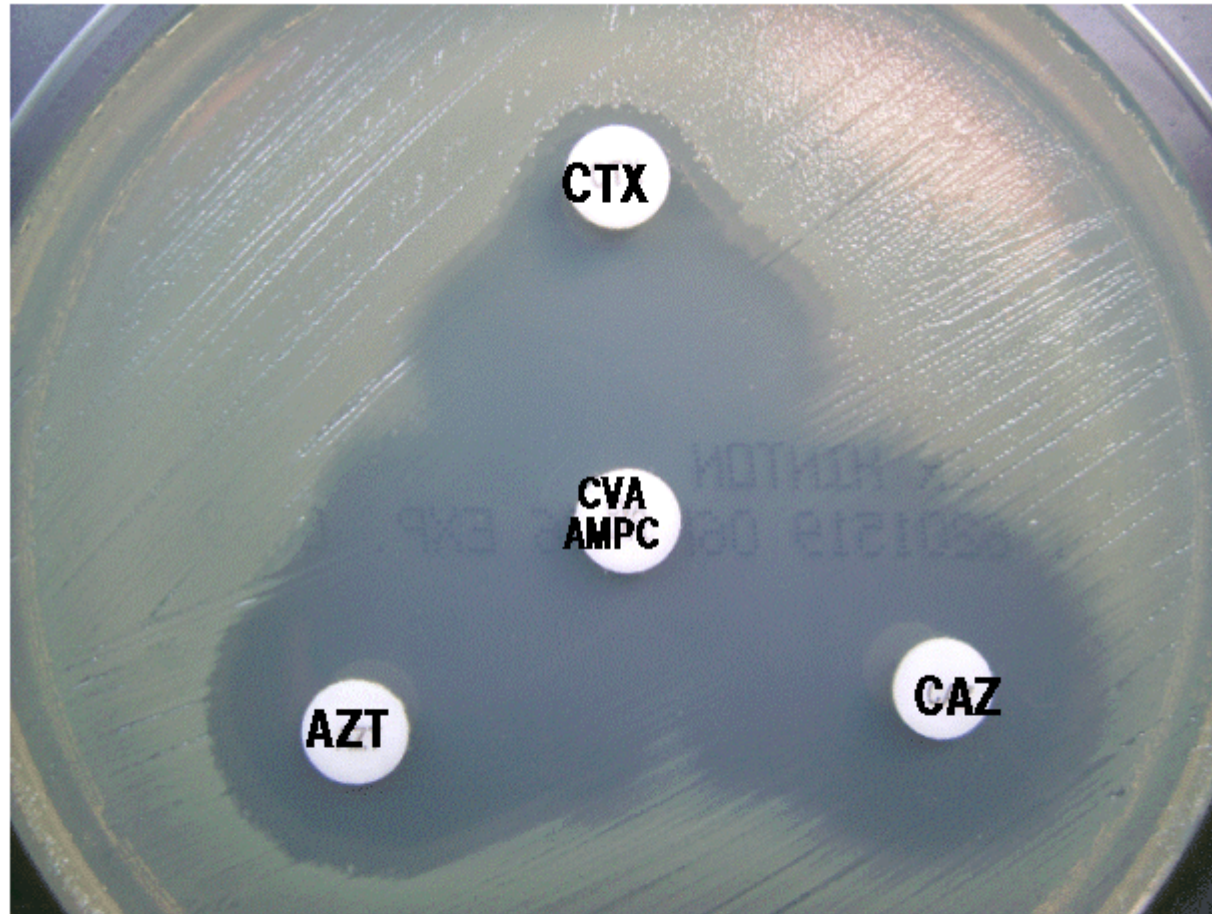
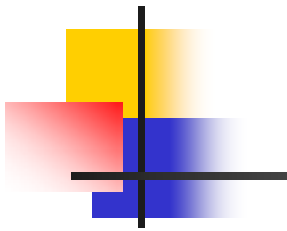


ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ESBL

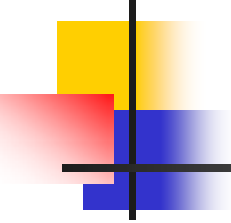
Αρχή της μεθόδου

- Οι αναστολείς των β-λακταμασών (κλαβουλανικό οξύ) αναστέλλουν τη δράση των ESBL





☒. Double-disk synergy test



ΠΡΟΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΛΕΓΧΟ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ESBL ΣΤΕΛΕΧΩΝ E.coli, K.pneumoniae, K.oxytoca (CLSI M100-S17)

Διάμετρος αναστολής

MIC

(mm)

(mg/L)

Κεφταζιδίμη (CAZ)

≤22

≥1

Κεφοταξίμη (CTX)

≤27

≥1

Κεφτριαξόνη (CRO)

≤25

≥1

Αζτρεονάμη (ATM)

≤27

≥1



ΠΡΟΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΛΕΓΧΟ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ESBL ΣΤΕΛΕΧΩΝ *P.mirabilis* (CLSI M100-S17)

	Διάμετρος αναστολής (mm)	MIC (mg/L)
Κεφταζιδίμη (CAZ)	≤22	≥1
Κεφοταξίμη (CTX)	≤27	≥1



ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ESBL

- **Kirby-Bauer**

Διάμετρος αναστολής **Caz** ή **CTX** $\leq 5\text{mm}$ από
διάμετρο **Caz+Cla** ή **Ctx+Cla**

- **Μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζυμό**

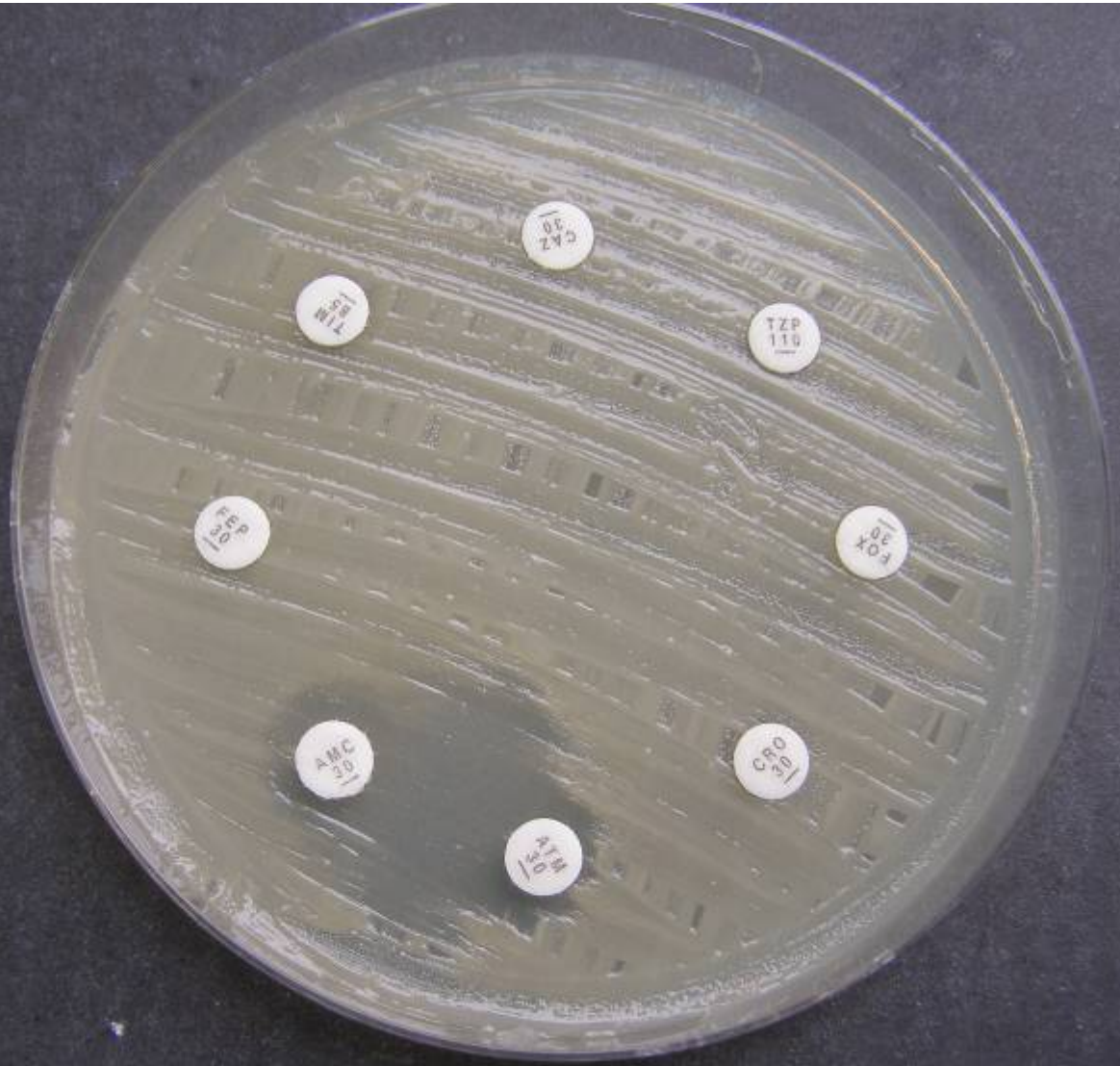
MIC **Caz** ή **Ctx** ≥ 3 αραιώσεις από MIC **Caz+Cla** ή
Ctx+Cla αντίστοιχα

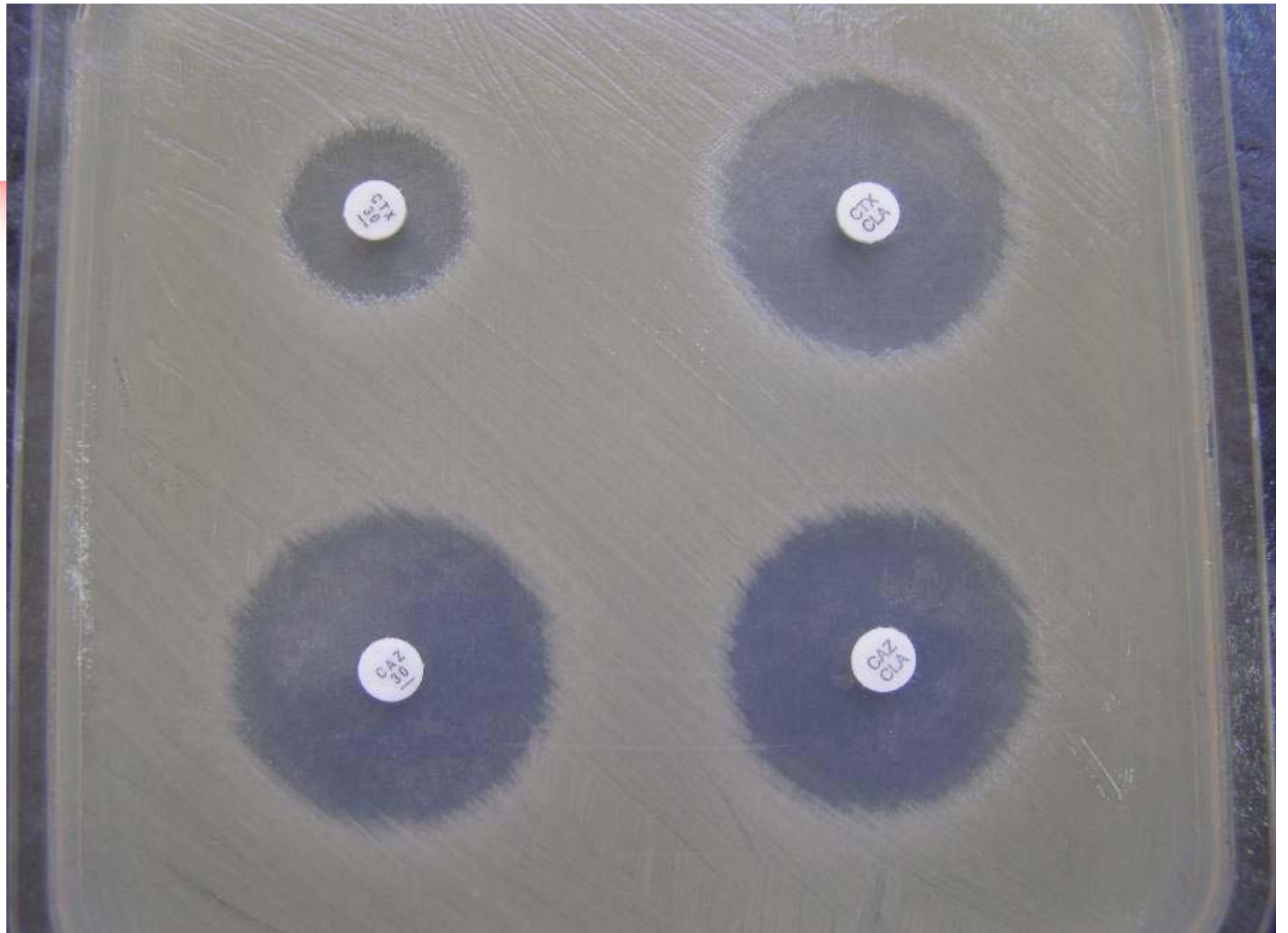
- Προτυπιομένη μέθοδος για *E.coli*, *Klebsiella*
spp, *P.mirabilis* (ευαισθησία 98%)



ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ESB_L(+)

- **Αντοχή:** Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες, Αζτρεονάμη (ανεξάρτητα από το αντιβιογράμμα)
- **Ανάλογα με το αντιβιογράμμα :** Συνδυασμοί αναστολέων, κεφαμυκίνες (cefoxitin), καρβαπενέμες

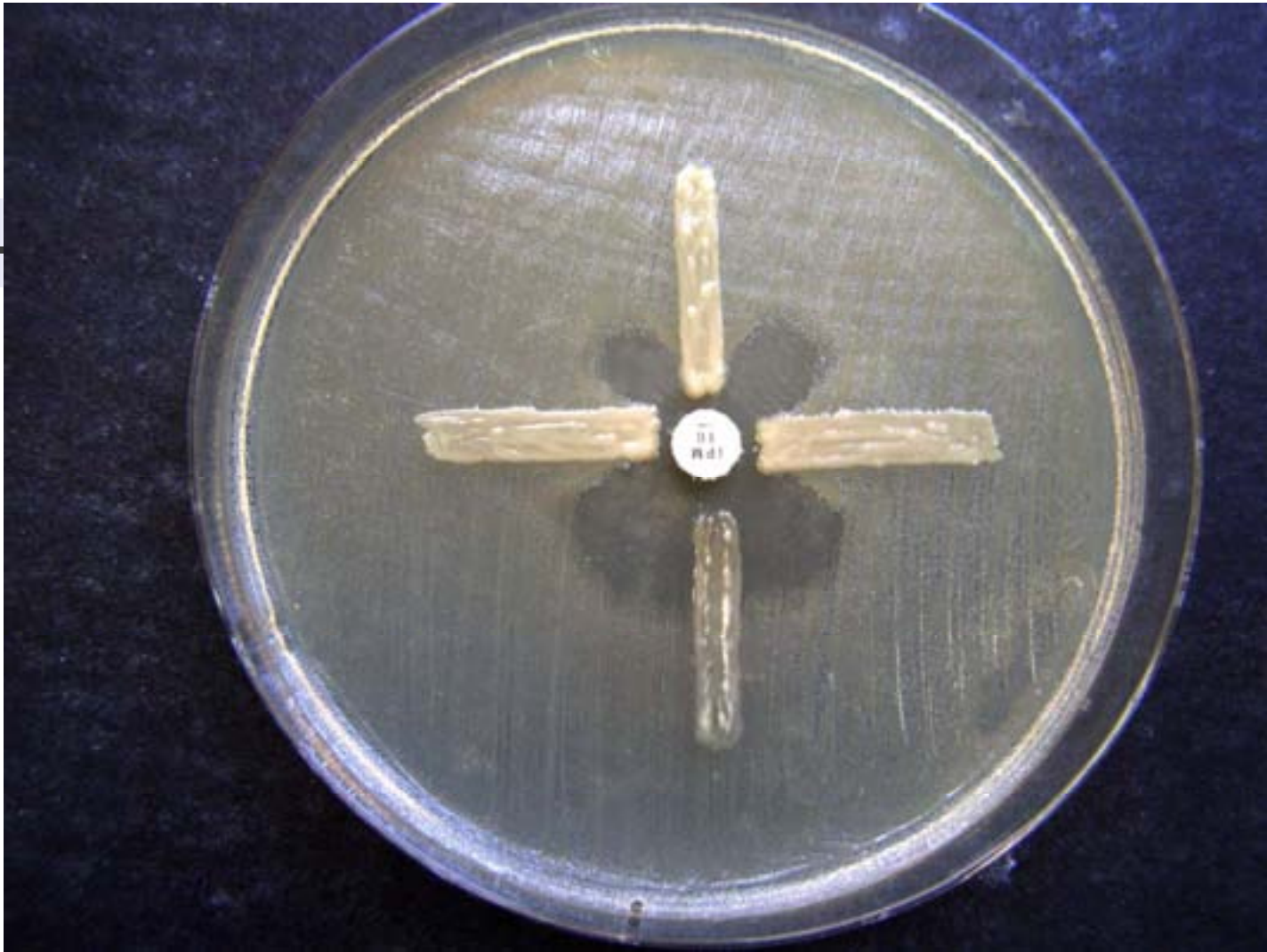






ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ

- ◆ **Μεταλλοένζυμα MBL (VIM,IMP):** υδρόλυση πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες
όχι αναστολή από κλαβουλανικό
όχι υδρόλυση αζτρεονάμης
- ◆ **Ένζυμα τύπου σερίνης (KPC):** υδρόλυση πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες, αζτρεονάμη
αναστολή από κλαβουλανικό
- ◆ **Ένζυμα τύπου σερίνης (OXA):** :υδρόλυση πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες
πτωχή αναστολή από κλαβουλανικό



Hodge test

Έλεγχος παραγωγής καρβαπενεμάσης



ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΒΛ

Αρχή μεθόδου

Το EDTA σε συνδυασμό με καρβαπενέμη αναστέλλει τη δράση της καρβαπενεμάσης

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ MBL ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ

■ **DDST** (Double Disc Synergy Test)

Τοποθέτηση δισκίου ιμιπενέμης (**IMP 10μg**) σε απόσταση 20 mm από κενό δισκίο ή δισκίο IMP στο οποίο ενσταλλάζονται 10μl διαλύματος **EDTA 0,5 MF, pH 8**

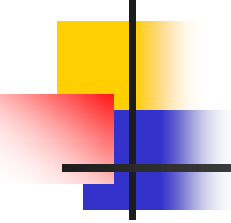
Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των διαμέτρων αναστολής **MBL (+) διαφορά τουλάχιστον 5 mm**

■ **E-test-MBL**

IMP και IMP+EDTA στην ίδια ταινία

Θετική δοκιμασία:

Ο λόγος των MIC_{IP}/IPI ≥8 ή διαφορά ≥3 λογαριθμικές αραιώσεις



ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ MBL ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ

- **Αντοχή:** Όλα τα β-λακταμικά εκτός της αζτρεονάμης (δίδεται το αποτέλεσμα του αντιβιογράμματος, εφόσον επιβεβαιωθεί ότι δεν παράγει ESBL)
- Απαραίτητος ο προσδιορισμός MIC με E-test ή με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό της ιμιπενέμης (στελέχη με MIC $\geq 16\mu\text{g/ml}$ δεν απαντούν στη θεραπεία με ιμιπενέμη)



ΠΑΡΑΓΩΓΗ AmpC β-λακταμάσης ΣΕ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ

- **Υδρόλυση:** Πενικιλίνη, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνη
- Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ
- **Αρχή μεθόδου:** Το βορονικό οξύ (APB) αναστέλλει την AmpC λακταμάση
- **Κριτήρια διαλογής στελεχών:** Αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία στη Fox

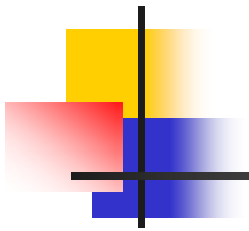


ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ AmpC β-λακταμάσης ΣΕ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ

- Τοποθέτηση δίσκων Caz ή/και Fox (10 µg) μόνα και με την προσθήκη 10µl διάλυμα APB → ↑διαμέτρος αναστολής στο δίσκο με συνδυασμό Fox+APB ή/και Caz+APB
- Μη προτυπωμένη μέθοδος
- Όχι οδηγία για την προσαρμογή του αντιβιογράµματος
- Η ceferime μπορεί να είναι δραστική στα στελέχη εφόσον είναι ESBL-

Έλεγχος AmpC κεφαλοσπορινάσης με βορονικό οξύ





Εντεροβακτηριακά που παράγουν KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) β-λακταμάση

- Υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά, καρβαπενέμες, αζτρεονάμη
- Αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών
- Ανήκουν στην ομάδα των τάξης A καρβαπενεμασών (σερίνη στο ενεργό κέντρο)
- Κυρίως στην *K.pneumoniae*. *P.aeruginosa*
- **Υποψία**: αντοχή ή μέτρια ευαισθησία στις καρβαπενέμες
αντοχή στην ερταπενέμη
θετικό Hodge test
αρνητικό EDTA test



Υποψία παρουσίας ΚΡC ενζύμων

Hodge test	EDTA test	Πιθανό ένζυμο
+	+	Μεταλλοένζυμο (VIM)
+	-	Καρβαπενεμάση τύπου ΚΡC*
-	-	Αρνητικό για καρβαπενεμάση

* Επιβεβαίωση με PCR



ΑΝΤΟΧΗ *P.aeruginosa* ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ

- **Μη ενζυμικοί μηχανισμοί:**

1. Μειωμένη διαπερατότητα (μειωμένη έκφραση ή απώλεια πορίνης OprD) → αντοχή μόνο IMP

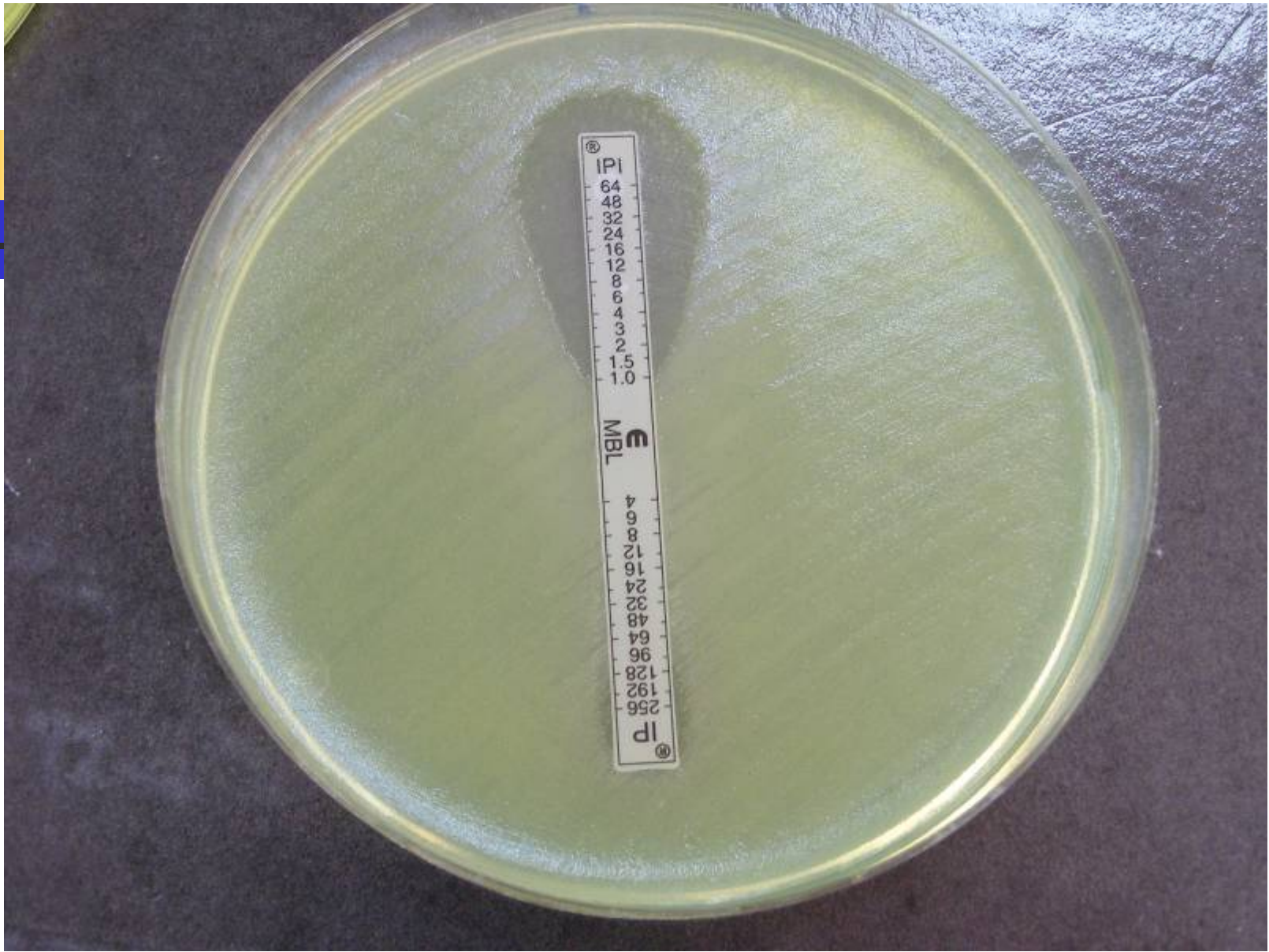
2. Υπερέκφραση **αντλιών ενεργητικής εκροής** → αντοχή μόνο **MER**, κινολόνες, αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες (συνήθως **δεν επηρεάζεται η CAZ, IMP** εκτός και αν συνυπάρχει και μειωμένη διαπερατότητα)

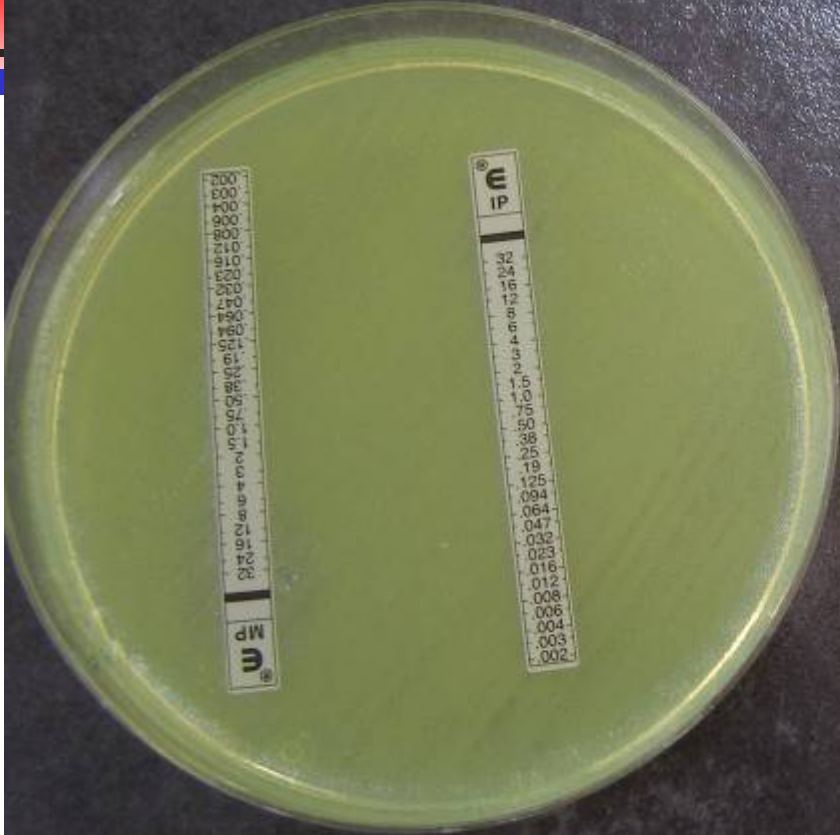
- **Ενζυμικοί μηχανισμοί:**

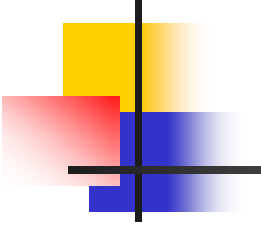
1. Παραγωγή καρβαπενεμασών (τάξη A)

2. Παραγωγή καρβαπενεμασών (τάξη D, Oxa β-λακταμάσες) → αντοχή IMP, MER

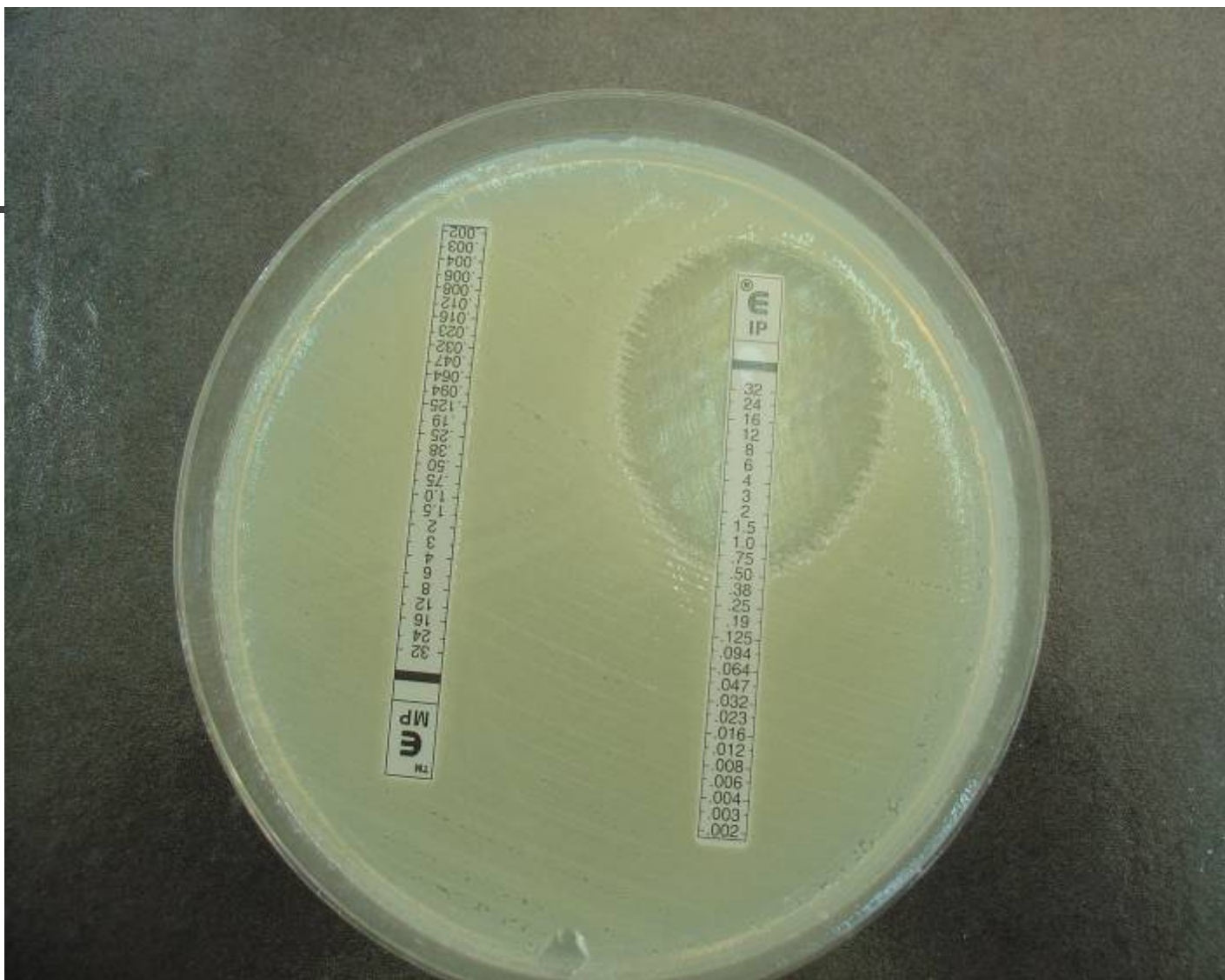
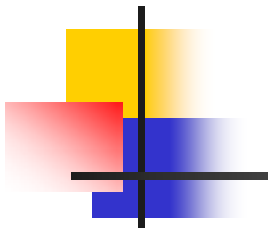
3. Παραγωγή καρβαπενεμασών (τάξη B) → **μεταλλο-β-λακταμάσες** → **υδρόλυση όλων των β-λακταμικών αντιβιοτικών εκτός ATM**











MP
32
24
16
12
8
6
4
3
2
1.5
1.0
0.75
0.50
0.38
0.25
0.19
0.12
0.08
0.06
0.04
0.03
0.02

IP
32
24
16
12
8
6
4
3
2
1.5
1.0
0.75
0.50
0.38
0.25
0.19
0.12
0.08
0.06
0.04
0.03
0.02



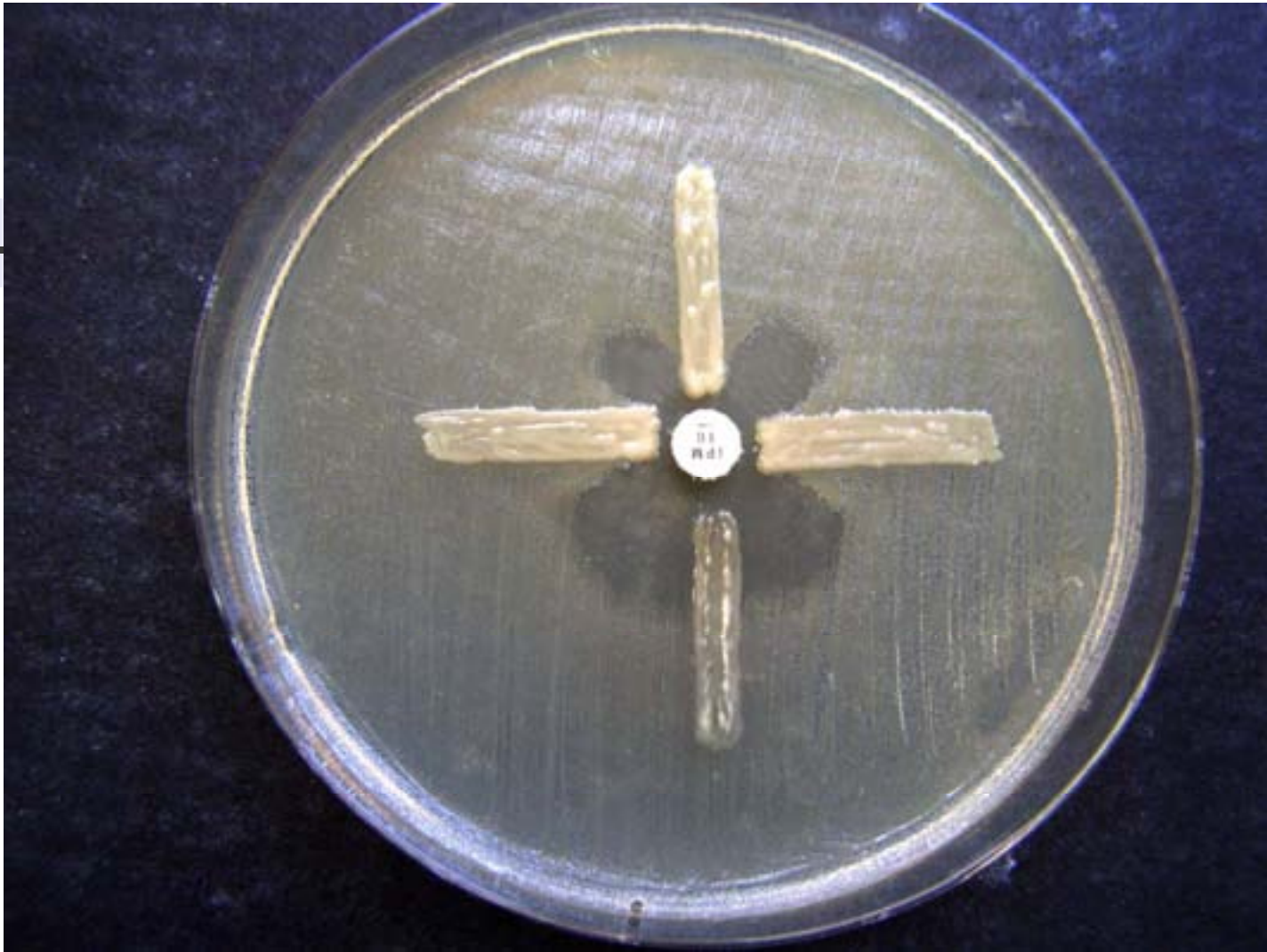
ΑΝΤΟΧΗ *A.baumannii* ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- **Ενδογενής αντοχή:**
 1. Μειωμένη διαπερατότητα
 2. Παραγωγή β-λακταμασών (Χρωμοσωμικές μη επαγωγίμες- AmpC, OXA με δράση καρβαπενεμάσης)
 3. Σύστημα αντλίας ενεργητικής αποβολής
- **Επίκτητη αντοχή:** οφείλεται σε γονίδια που βρίσκονται σε μεταθετά στοιχεία (πλασμίδια, τρανζποζόνια, ιντεγκρόνια) ή σε παραγωγή ενζύμων, τροποποίηση των στόχων δράσης, μειωμένη διαπερατότητα και υπερέκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής



ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ *A.baumannii* ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

- **Ενζυμικοί μηχανισμοί: (Kirby-Bauer, MIC, Μοριακές μέθοδοι)**
 1. Υπερπαραγωγή β-λακταμασών (AmpC, OXA-51)→υψηλού επιπέδου αντοχή σε CAZ (AmpC) ή καρβαπενέμες (OXA)
 2. Παραγωγή καρβαπενεμασών τάξης B (Μεταλλο-β-λακταμάσες MBLs). Στην Ελλάδα δεν έχουν βρεθεί
 3. Παραγωγή καρβαπενεμασών τάξης D (οξακιλλινάση με σερίνη στο ενεργό κέντρο). Αναστέλλονται ελάχιστα από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη
- **Μη ενζυμικοί μηχανισμοί:**
 1. Απώλεια ή τροποποίηση πορινών EM→αντοχή σε καρβαπενέμες
 2. Υπερέκφραση αντλίας ενεργητικής εκροής→αντοχή σε καρβαπενέμες και άλλα αντιβιοτικά
 3. Τροποποίηση PBP_s



Hodge test

Έλεγχος παραγωγής καρβαπενεμάσης