



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ/ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΟΡΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

ΑΣΗΜΙΝΑ ΣΑΦΑΡΙΚΑ

ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ-ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ

Δ' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ

ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΔΥΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΕΘΝΩΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΟΙ

- **CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) ΗΠΑ**
- **EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)**



ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ (KIRBY-BAUER ΜΕΘΟΔΟΣ)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΖΩΝΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ

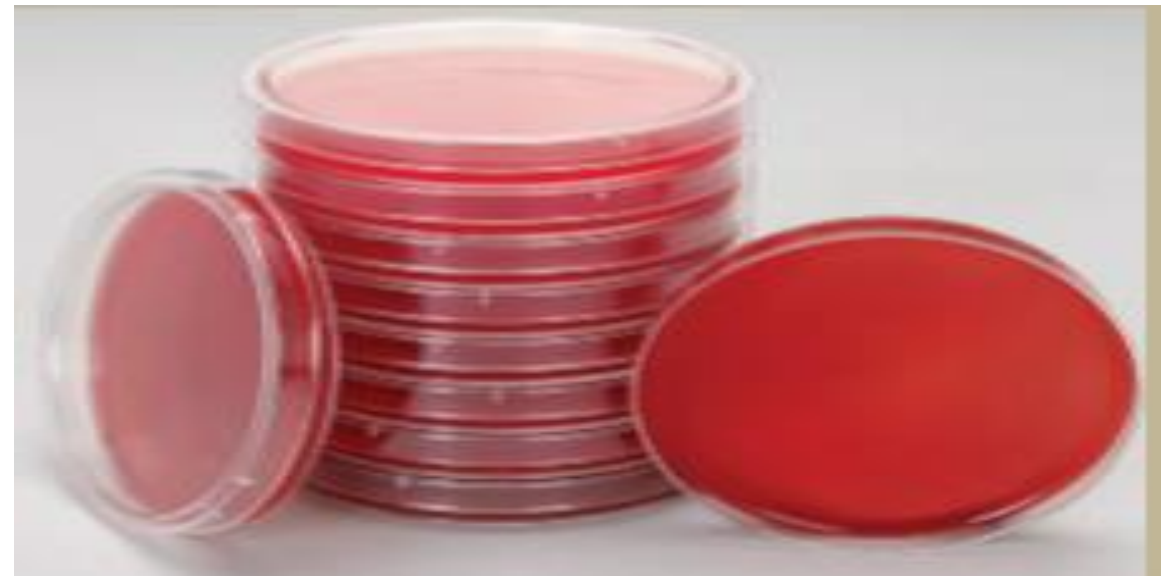
- Διάχυση του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό που έχει ενοφθαλμιστεί το εξεταζόμενο μικρόβιο, από περιοχή μεγαλύτερης πυκνότητας σε περιοχή μικρότερης πυκνότητας ώστε να δημιουργηθεί ζώνη αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου
- Η ζώνη αναστολής σχηματίζεται όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, ίση ή μεγαλύτερη από την ΕΑΠ, επιδρά σ' ένα αρκετά μεγάλο βακτηριακό πληθυσμό για να επιτύχει την αναστολή του

ΣΤΑΔΙΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου $1-2 \times 10^8$ cfu/ ml)
- Ενοφθαλμισμός στο θρεπτικό υλικό
- Τοποθέτηση των αντιβιοτικών
- Επώαση
- Ανάγνωση των αποτελεσμάτων
- Αναφορά των αποτελεσμάτων στους κλινικούς γιατρούς (επιστημονική ονοματολογία των αντιβιοτικών)

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

- Μη απαιτητικά βακτήρια :Mueller Hinton άγαρ(ΜΗΑ)
- Απαιτητικά βακτήρια: ΜΗΑ με 5% μηχανικά απινιδωμένο αίμα αλόγου και β-NAD 20 mg/L



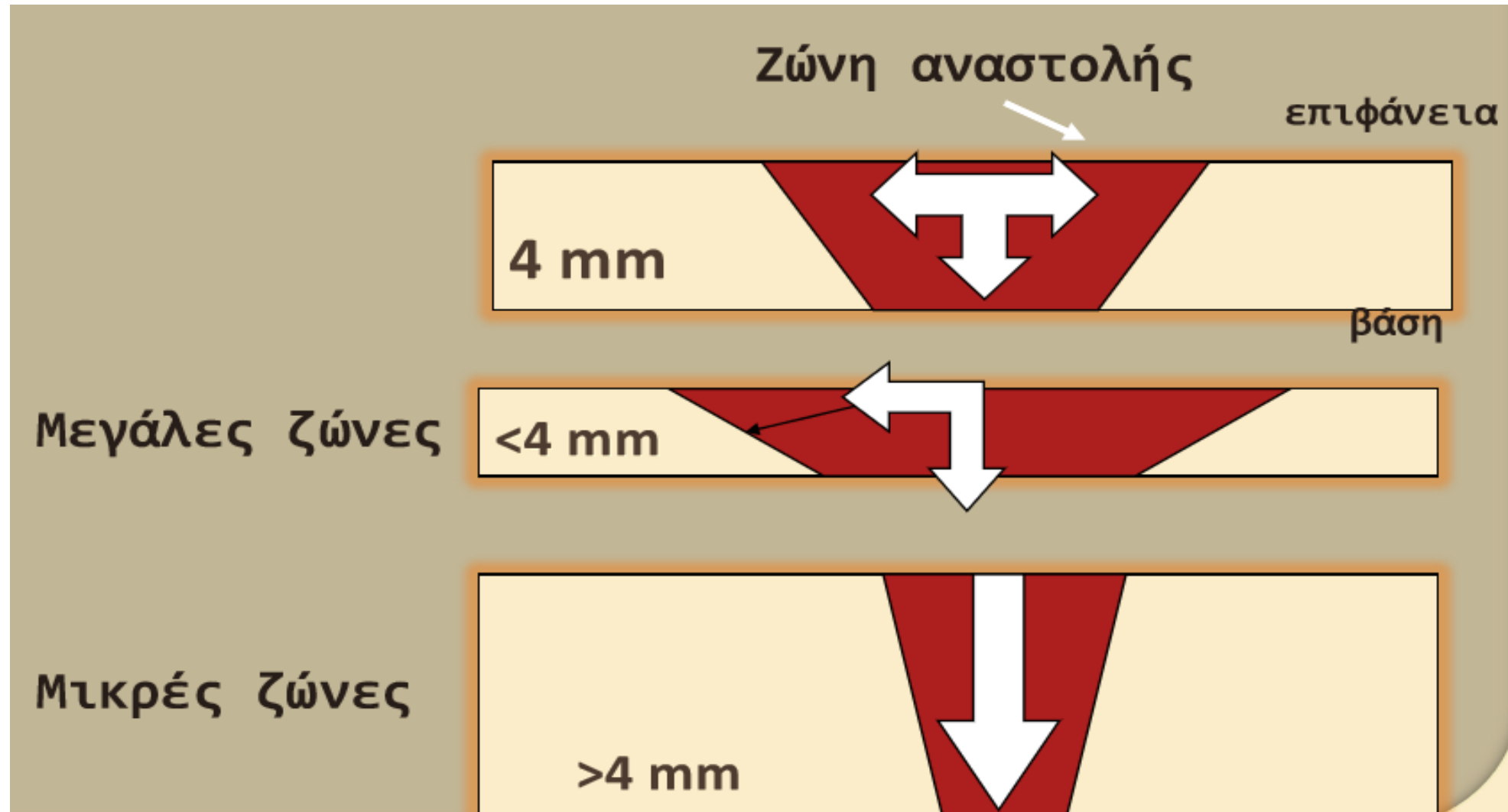
<p>Μη απαιτητικοί μικροοργανισμοί: <i>Enterobacterales, Pseudomonas spp., Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia, Acinetobacter spp., Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Aeromonas spp.</i></p>	<p>Mueller Hinton Agar (MHA)</p>
<p>Απαιτητικοί μικροοργανισμοί <i>Streptococci group A,B,C,G ,S. pneumoniae Viridans group streptococci, Haemophilus spp., M.catarrhalis, N.meningitidis, L. monocytogenes, Corynebacterium spp, C. jejuni ,Campylobacter coli, Kingella</i></p>	<p>MH-Fastidious Agar (MHF)</p>
<p>Άλλοι απαιτητικοί μικροοργανισμοί</p>	<p>Pending</p>

ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ

- **ΔΕΝ** χρησιμοποιούμε **αίμα προβάτου**: Όλα τα breakpoints έχουν καθορισθεί στο MH-F με αίμα αλόγου 5% και 20% θυμιδίνη .Ο *H. influenzae* **ΔΕΝ** αναπτύσσεται στο MH-F με **αίμα προβάτου**
- Πρέπει να χρησιμοποιούμε β-NAD καθαρότητας ίσης ή μεγαλύτερης του 98%- για την ανάπτυξη του *H. Influenzae*
- **Σημαντικό** Η απινίδωση του αίματος να γίνεται μηχανικά και όχι χημικά- ζώνες εκτός ορίων- και προσοχή στη λύση των ερυθρών

IN-HOUSE ΤΡΙΒΛΙΑ

Καθοριστικός παράγοντας το πάχος του υλικού



IN-HOUSE ΤΡΥΒΛΙΑ

- Πάχος του υλικού τεσσάρων χιλιοστών
 - I. 25 ml υλικού στα τρυβλία διαμέτρου 90 mm
 - II. 31 ml σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm
 - III. 40 ml στα τετράγωνα τρυβλία των 100 mm
 - IV. 71 ml στα τρυβλία διαμέτρου 150 mm
- Το pH του υλικού να είναι 7,2-7,4
- Να μην τοποθετείται το αίμα και το NAD πριν το υλικό φθάσει στους 42-45°C
- Καλή ανάμειξη, άμεση τοποθέτηση στα τρυβλία

ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

- Όταν χρησιμοποιούνται τα τρυβλία δεν θα πρέπει να έχουν υγρασία
- **Όχι over-dried**
- Η συντήρηση των τρυβλίων που παρασκευάζονται στο εργαστήριο καθορίζεται ανάλογα με τις δυνατότητες του εργαστηρίου
- Οι συνθήκες συντήρησης των εμπορικών τρυβλίων ορίζεται από την κατασκευάστρια εταιρεία

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΑ

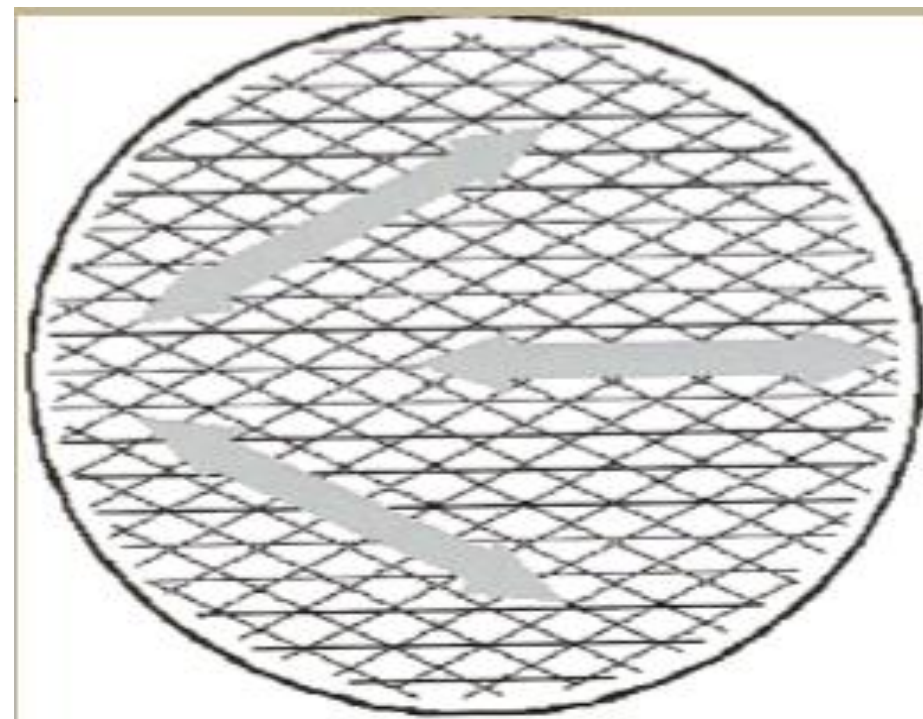
- Το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος είναι ο κυριότερος παράγοντας για την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (μεγάλο μέγεθος οδηγεί σε ζώνες αναστολής μικρότερης διαμέτρου)
- Θολερότητα ίση με 0,5 McFarland (περίπου $1-2 \times 10^8$ CFU/ ml)
- Εξαίρεση: Ο *S.pneumoniae* αν έχει απομονωθεί σε:

Αιματούχο άγαρ :θολερότητα ίση με 0,5 MacFarland

Σοκολατόχρωμο άγαρ: θολερότητα ίση με 1 MacFarland

ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ

- Χρησιμοποιώ στείρο βαμβακοφόρο στυλεό τον οποίον βυθίζω στο μικροβιακό εναιώρημα.
- Κάνω επίστρωση σε όλη την επιφάνεια του τριβλίου και προς τις τρεις κατευθύνσεις.
- Κατόπιν εντός 15 λεπτών τοποθετούνται σταθερά στο άγαρ οι δίσκοι των αντιβιοτικών



ΔΙΣΚΟΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, η ιμιπενέμη και το κλαβουλανικό οξύ : διατηρούνται αυστηρά σε κατάψυξη -20°C
- Η μετρονιδαζόλη, η χλωραμφαινικόλη και οι φθοριοκινολόνες: ευαίσθητες στο φώς
- Φυλάσσονται σε ειδικούς περιέκτες που συνοδεύονται με αφυγραντική ουσία
- Τα δισκία μεταφέρονται από το ψυγείο ή τον καταψύκτη 1-2 ώρες πριν από τη χρήση τους
- Απαιτείται προσοχή στην ημερομηνία λήξης

Συγκέντρωση αντιβιοτικού	EUCAST	CLSI
Benzylpenicillin	1 unit	10 units
Ampicillin	2 και 10 µg	10
Amoxicillin-clavulanate	2–1 και 20–10 µg	20–10 µg
Piperacillin	30 µg	100 µg
Piperacillin-tazobactam	30–6 µg	100–10 µg
Cefotaxime	5 µg	30 µg
Ceftaroline	5 µg	30 µg
Ceftazidime	10 µg	30 µg
Netilmicin	10 µg	30 µg
Gentamicin (για HLAR, high-level aminoglycoside resistance)	30 µg	120 µg
Vancomycin	5 µg	30 µg
Linezolid	10 µg	30 µg
Nitrofurantoin	100 µg	300 µg
Amp	2µg για <i>H. influenzae</i> , <i>P. multocida</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. saprophyticus</i> και <i>viridans streptococci</i>	
Amox/clav	2–1 µg για <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> και <i>P. multocida</i> .	

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΠΩΑΣΗΣ

Τα τρυβλία επωάζονται:

- **MHA** : στους $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, σε αερόβιες συνθήκες για 16-20 ώρες ,
24 ώρες για τα γλυκοπεπτίδια στους εντεροκόκκους
- **MHF** στους $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, σε συνθήκες CO_2 $5\pm 1\%$, για 16-20 ώρες

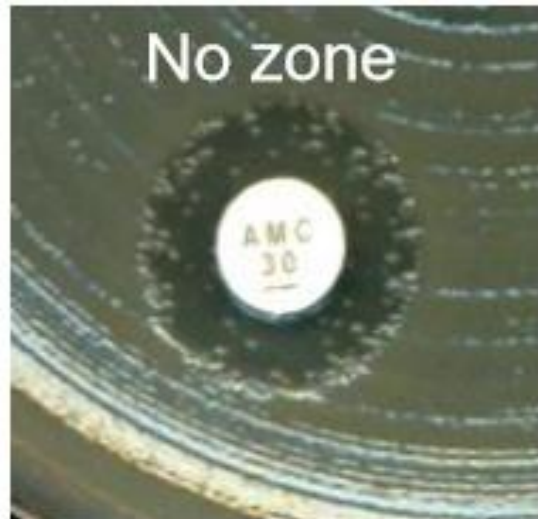
ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

- **MHA:** - Πίσω πλευρά τρυβλίου, σκούρο background με τη βοήθεια προσπίπτοντος φωτισμού
 - Linezolid και Benzylpenicillin για τους σταφυλοκόκκους και της Vancomycin για τους εντεροκόκκους «διαβάζονται» με διερχόμενο φωτισμό.
- **MH-F:** «διαβάζονται» με διερχόμενο φωτισμό

ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΜΕΣΑ ΣΤΗ ΖΩΝΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ:

- ΕΛΕΓΧΩ ΑΝ ΕΧΩ ΚΑΘΑΡΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑ Κ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΩ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ.
- ΑΝ ΤΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑ ΕΙΝΑΙ ΚΑΘΑΡΟ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΥΠΟΨΙΝ ΟΙ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΜΕΣΑ ΣΤΗ ΖΩΝΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ

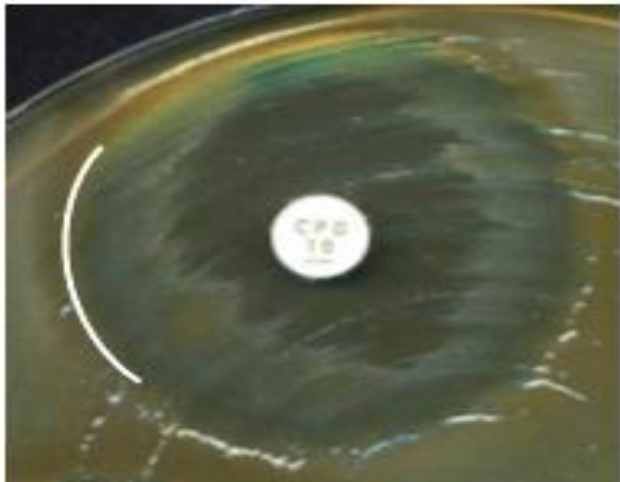


ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

E. coli with
ESBL



H. influenzae with
PBP mutations



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ 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)

E-TEST

- Μέθοδος κλιμακωτής (gradient) διάχυσης
- Ταινίες Etest (strips): διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού
- Συγκεκριμένο εναιώρημα σε MHA
- Μετά επώαση, αναστολή ανάπτυξης σε σχήμα έλλειψης
- MIC: σημείο που η έλλειψη συναντά την ταινία



ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

ΑΡΧΗ

- Έκθεση μικροβιακού εναιωρήματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού
- MIC: Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού in vitro (MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION)
- 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

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

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

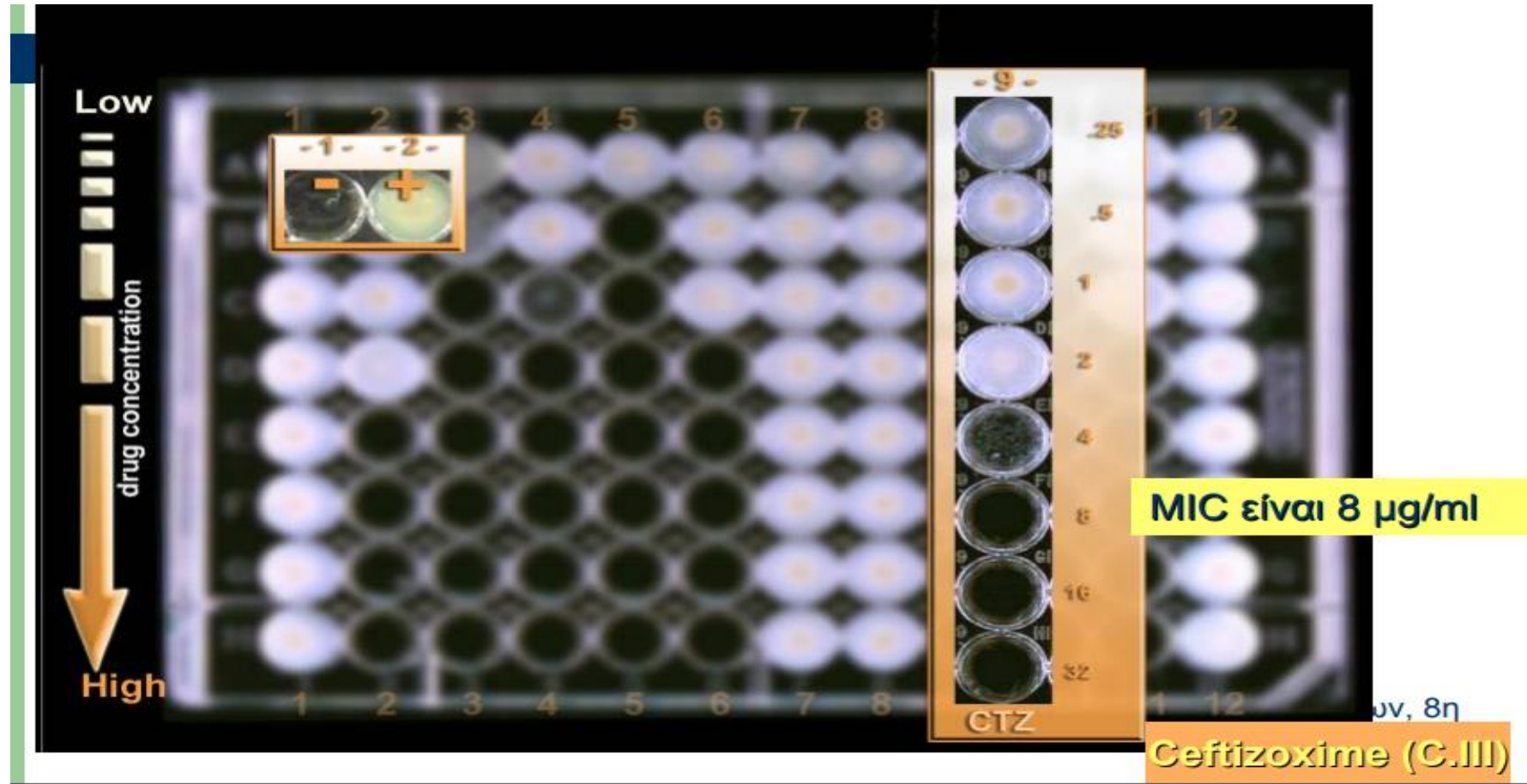
ΜΙΚΡΟΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

Χρησιμοποιούνται:

- Ζωμός Mueller-Hinton(broth) για μη απαιτητικούς μικροοργανισμούς
- Ζωμός Mueller-Hinton(broth) εμπλουτισμένος με 5% μηχανικά απινιδωμένο αίμα αλόγου και β-NAD 20 mg/L για απαιτητικούς μικροοργανισμούς
- Πλάκες μικροτιτλοποίησης (96 βυθίσματα)
- Υποδιπλάσιες αραιώσεις των αντιβιοτικών
- Προσθήκη μικροβιακού εναιωρήματος
- Επώαση 35 ± 2 ° C για 20-24h

ΜΙΚΡΟΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

- MIC: το πρώτο βύθισμα που δεν έχει ανάπτυξη



ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΡΙΟ (EPIDEMIOLOGICAL CUT-OFF, ECOFF)

- Η μέγιστη τιμή MIC που καταγράφεται στον WT μικροβιακό πληθυσμό, και διαχωρίζει τον Wild Type (WT) από τον Non Wild Type (NWT) πληθυσμό
- WT: φυσικός μικροβιακός πληθυσμός .Στερείται κάθε επίκτητου ή μεταλλακτικού μηχανισμού αντοχής.
- NWT: μη φυσικός μικροβιακός πληθυσμός. Έχει αποκτήσει επίκτητο ή μεταλλακτικό μηχανισμό αντοχής στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΡΙΟ- EPIDEMIOLOGICAL CUT-OFF-ECOFF

ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΔΕΙΚΤΗ ΜΕ ΑΞΙΑ

- **ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ**: ΦΥΣΙΚΟ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟ ΜΕΓΕΘΟΣ
- **ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ**: ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΕΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΣ ΕΓΚΑΙΡΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕ ΝΕΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

Ο ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΓΑΛΩΝ ΚΑΤΑΝΟΜΩΝ MICs

ΕΚΦΡΑΖΕΤΑΙ ΩΣ ECOFF: $X \text{ mg/L (WT:MIC} \leq X \text{ mg/L)}$

ΚΛΙΝΙΚΑ ΟΡΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ Σ Η ΑΝΤΟΧΗΣ R (CLINICAL BREAKPOINTS)

- ΚΑΘΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ:
- ΕΥΡΕΙΕΣ ΚΑΤΑΝΟΜΕΣ MICs
- ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ –PK,
ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ-PD
- ΜΕΓΑΛΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ (ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΙΜΗΣ MIC ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ)

ΚΛΙΝΙΚΑ ΟΡΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ Σ Η ΑΝΤΟΧΗΣ R (CLINICAL BREAKPOINTS)

- Είναι δείκτες με κλινική αξία και καθορίζονται από το αποτέλεσμα στον άνθρωπο
- Μπορεί να αλλάξουν ανάλογα με τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα
- Εξαρτώνται από το δοσολογικό σχήμα και την οδό χορήγησης
- Διαχωρίζουν τα κλινικώς ευαίσθητα(S) από τα ανθεκτικά (R)
- Εκφράζονται ως MIC: $S \leq X, R > Y \text{ mg/L}$ και μεταφράζονται σε ζώνες αναστολής: $S \geq X, R < Y \text{ mm}$

Παλιοί Ορισμοί: S, I, R (2002-2018)

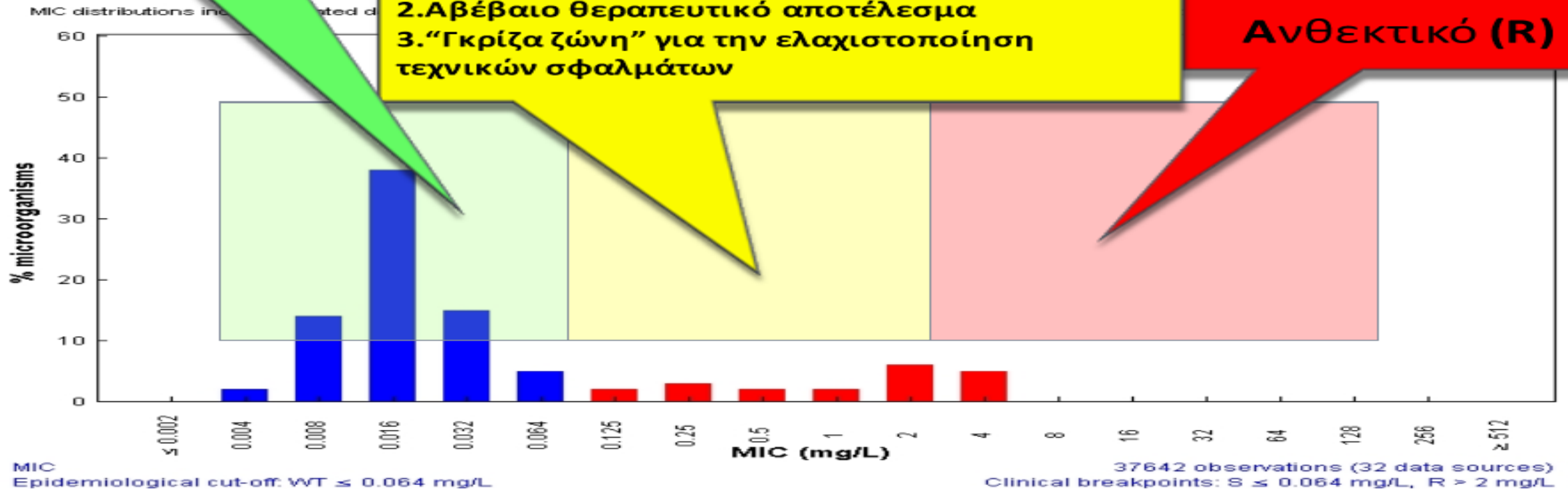
Ευαίσθητο (S)

Μετρίως Ευαίσθητο (I)

1. Θεραπευτικό αποτέλεσμα είτε με μεγάλες δόσεις του αντιβιοτικού, είτε με υψηλές συγκεντρώσεις στην εστία της λοίμωξης
2. Αβέβαιο θεραπευτικό αποτέλεσμα
3. "Γκρίζα ζώνη" για την ελαχιστοποίηση τεχνικών σφαλμάτων

Redefining S, I and R
2019 - www.eucast.org

Ανθεκτικό (R)



Benzylpenicillin/*S. pneumoniae*

Νέοι ορισμοί κατά EUCAST-2019: S, I, R

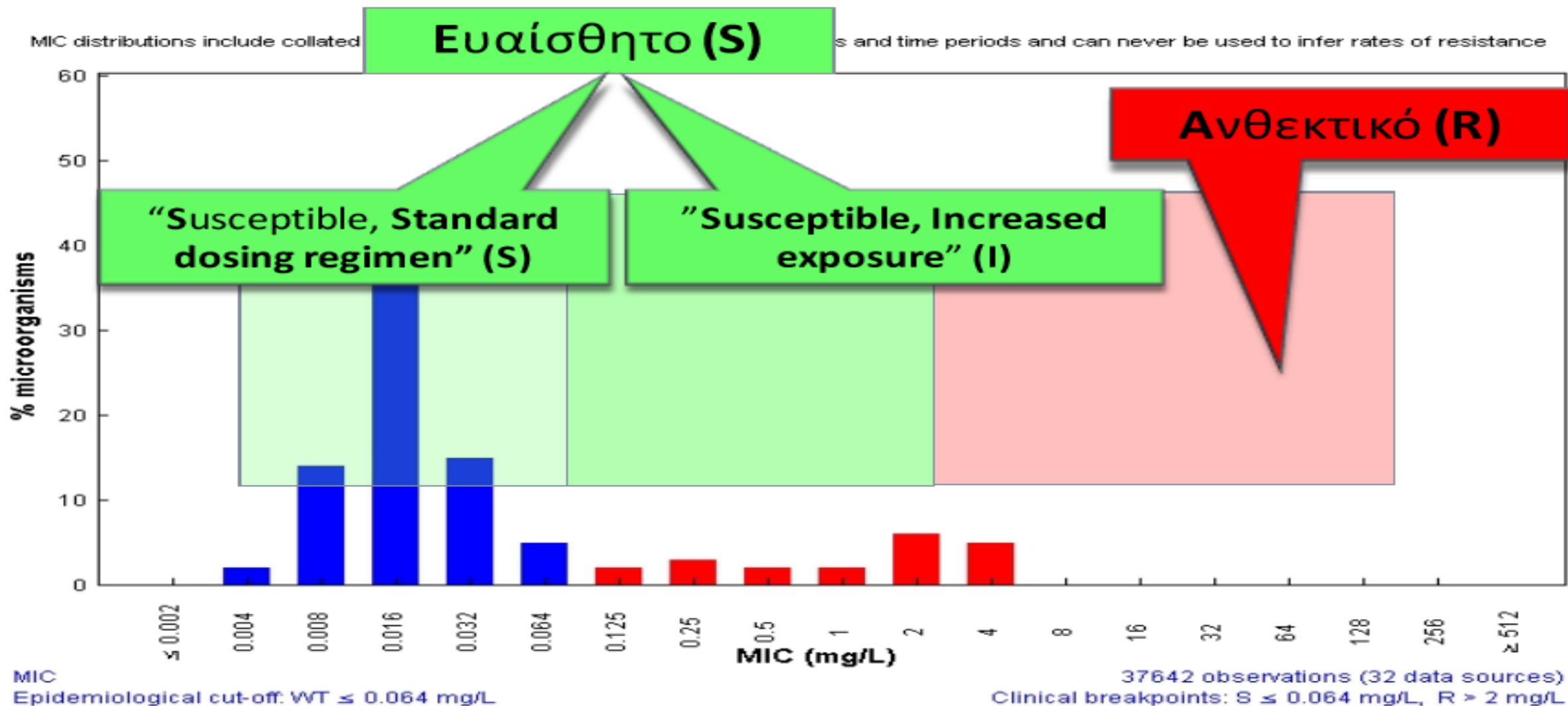
- **S “Susceptible, standard dosing regimen”**
Ε, Ευαίσθητος, με το κανονικό δοσολογικό σχήμα
- **I “Susceptible, increased exposure”**
ΜΕ, Ευαίσθητος, σε αυξημένη έκθεση
- **R “Resistant”**
- Α, Ανθεκτικός

*Η έκθεση του μικροοργανισμού στον αντιμικροβιακό παράγοντα επηρεάζεται από τον τρόπο χορήγησης, τη δόση, τον αριθμό των δόσεων, τον χρόνο έγχυσης, αλλά και από την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση του αντιμικροβιακού παράγοντα στη θέση της λοίμωξης. Μερικές φορές σχετίζεται και με τον τύπο της λοίμωξης. (ουρολοίμωξη, μηνιγγίτιδα)

Νέοι Ορισμοί : S,I,R (2019)

Redefining S, I and R 2019 www.eucast.org

Benzylpenicillin / Streptococcus pneumoniae
EUCAST MIC Distribution - Reference Database



ΔΟΣΟΛΟΓΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

Dosages

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 9.0, valid from 2019-01-01

EUCAST breakpoints are based on the following dosages (see section 8 in Rationale Documents). Alternative dosing regimens which result in equivalent exposure are acceptable. The table should not be considered an exhaustive guidance for dosing in clinical practice, and does not replace specific local, national, or regional dosing guidelines.

Penicillins	Standard dose	High dose	Special situations
Benzylpenicillin	0.6 g (1 MU) x 4 iv	1.2 g (2 MU) x 4-6 iv	Meningitic: For a dose of 2.4 g (4 MU) x 6 iv, isolates with MICs ≤ 0.06 mg/L are susceptible. Pneumonia caused by <i>S. pneumoniae</i> : breakpoints are related to dosage: For a dose of 1.2 g (2 MU) x 4 iv, isolates with MIC ≤ 0.5 mg/L are susceptible. For a dose of 2.4 (4 MU) g x 4 iv or 1.2 g (2 MU) x 6 iv, isolates with MIC ≤ 1 mg/L are susceptible. For a dose of 2.4 g (4 MU) x 6 iv, isolates with MIC ≤ 2 mg/L are susceptible.
Ampicillin	2 g x 3 iv	2 g x 4 iv	Meningitic: 2 g x 6 iv
Ampicillin-sulbactam	(2 g ampicillin + 1 g sulbactam) x 3 iv	(2 g ampicillin + 1 g sulbactam) x 4 iv	
Amoxicillin iv	1 g x 3-4 iv Under review	2 g x 6 iv	Meningitic: 2 g x 6 iv
Amoxicillin oral	0.5 g x 3	0.75 g - 1 g x 3	<i>H. influenzae</i> : High dose only
Amoxicillin-clavulanic acid iv	(1 g amoxicillin + 0.2 g clavulanic acid) x 3-4 iv Under review	(2 g amoxicillin + 0.2 g clavulanic acid) x 3 iv	
Amoxicillin-clavulanic acid oral	(0.5 g amoxicillin + 0.125 g clavulanic acid) x 3	(0.875 g amoxicillin + 0.125 g clavulanic acid) x 3	<i>H. influenzae</i> : High dose only
Piperacillin	4 g x 3 iv	4 g x 4 iv	<i>Pseudomonas</i> spp.: High dose only
Piperacillin-tazobactam	(4 g piperacillin + 0.5 g tazobactam) x 3 iv	(4 g piperacillin + 0.5 g tazobactam) x 4 iv	<i>Pseudomonas</i> spp.: High dose only
Ticarcillin	3 g x 4 iv	3 g x 6 iv	<i>Pseudomonas</i> spp.: High dose only
Ticarcillin-clavulanic acid	(3 g ticarcillin + 0.1/0.2 g clavulanic acid) x 4 iv	(3 g ticarcillin + 0.1 g clavulanic acid) x 6 iv	<i>Pseudomonas</i> spp.: High dose only
Phenoxymethylpenicillin	0.5-2 g x 3-4 oral depending on species and/or infection type	None	
Oxacillin	1 g x 4 iv	1 g x 6 iv	
Cloxacillin	0.5 g x 4 oral or 1 g x 4 iv	1 g x 4 oral or 2 g x 6 iv	
Dicloxacillin	0.5-1 g x 4 oral or 1 g x 4 iv	2 g x 4 oral or 2 g x 6 iv	
Flucloxacillin	1 g x 3 oral or 2 g x 4 iv (or 1 g x 6 iv)	1 g x 4 oral or 2 g x 6 iv	
Meclizolam	0.2 g x 3 oral	0.4 g x 3 oral	

ΔΟΣΟΛΟΓΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

Dosages

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 9.0, valid from 2019-01-01

Cephalosporins	Standard dose	High dose	Special situations
Cefaclor	0.25-1 g x 3 oral depending on species and/or infection type	None	<i>Staphylococcus</i> spp.: Minimum dose 0.5 g x 3
Cefadroxil	0.5-1 g x 2 oral depending on species and/or infection type	None	
Cefalexin	0.25-1 g x 2-3 oral depending on species and/or infection type	None	
Cefazolin	1 g x 3-4 (or 2 g x 3) iv depending on species and/or infection type	None	
Cefepime	1 g x 3 or 2 g x 2 iv	2 g x 3 iv	<i>Pseudomonas</i> spp.: High dose only
Cefixime	0.2-0.4 g x 2 oral	None	Gonorrhoea: 0.4 g oral as a single dose
Cefotaxime	1 g x 3 iv	2 g x 3 iv	Meningitis: 2 g x 4 iv <i>S. aureus</i> : High dose only Gonorrhoea: 0.5 g im as a single dose
Cefpodoxime	0.1-0.2 g x 2 oral depending on species and/or infection type	None	
Ceftaroline	0.5 g x 2 iv over 1 hour	0.5 g x 3 iv over 2 hours	<i>S. aureus</i> : In complicated skin and skin structure infections: There is some PK-PD evidence to suggest that isolates with MICs of 4 mg/L could be treated with high dose.
Ceftazidime	1 g x 3 iv	2 g x 3 iv or 1 g x 6 iv	<i>Pseudomonas</i> spp.: High dose only
Ceftazidime-avibactam	(2 g ceftazidime + 0.5 g avibactam) x 3 over 2 hours	None	
Cefibuten	0.4 g x 1 oral	None	
Ceftibiprole	0.5 g x 3 iv over 2 hours	None	
Ceftolozane-tazobactam	(1 g ceftolozane + 0.5 g tazobactam) x 3 iv over 1 hour	Under evaluation	
Ceftriaxone	1 g x 1 iv	2 g x 2 iv	Meningitis: 4 g x 1 iv <i>S. aureus</i> : High dose only Gonorrhoea: 0.5 g im as a single dose
Cefuroxime iv	0.75 g x 3 iv	1.5 g x 3 iv	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i> : High dose only
Cefuroxime oral	0.25-0.5 g x 2 oral depending on species and/or infection type	None	
Carbapenems			
Boripenem			
Ertapenem	1 g x 1 iv over 30 minutes	None	
Imipenem	0.5 g x 4 iv over 30 minutes	1 g x 4 iv over 30 minutes	<i>Pseudomonas</i> spp.: High dose only <i>Acinetobacter</i> spp.: High dose only
Meropenem	1 g x 3 iv over 30 minutes	2 g x 3 iv over 3 hours	Meningitis: 2 g x 3 iv over 30 minutes (or 3 hours)
Meropenem-vaborbactam	(2 g meropenem + 2 g vaborbactam) x 3 iv over 3 hours	None	
Monobactams			
Aztreonam	1 g x 3 iv	2 g x 4 iv	<i>Pseudomonas</i> spp.: High dose only

ΟΡΟΛΟΓΙΑ

Στο αντιβιόγραμμα τα στελέχη κατηγοριοποιούνται ως:

- S/ E (Ευαίσθητα)
- I/ME (Μετρίως Ευαίσθητα)
- R/A (Ανθεκτικά) και έτσι αναφέρονται στους κλινικούς

Σε στατιστικές μελέτες τα στελέχη ταξινομούνται ως:

- S /E, I/ME, R/ A.
- Για λόγους απλοποίησης μπορούμε να ταξινομήσουμε τα S με τα I ως Ευαίσθητα , ποτέ τα I με τα R ως Ανθεκτικά

ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ AREA OF TECHNICAL UNCERTAINTY(ATU)

- **ATU:** νέος όρος της EUCAST για να “προειδοποιήσει τα εργαστήρια”, σχετικά με την αβεβαιότητα στην ερμηνεία κάποιων τιμών (τιμές MIC ή ζώνες αναστολής).
- Η τιμή **ATU** εμπίπτει σε μια περιοχή με δυσκολίες στην ερμηνεία και δεν σχετίζεται με αβεβαιότητες της μεθόδου(MIC ή μέθοδος διάχυσης), θεωρώντας δεδομένη τη σωστή εφαρμογή της

ATU –Τι μπορεί να κάνει το εργαστήριο

- Εξαρτάται από τον τύπο της λοίμωξης (ουρολοίμωξη/βακτηραιμία) και τις διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές
- Επανάληψη του αντιβιογράμματος
- Εφαρμογή εναλλακτικού test (πχ MIC, PCR, διερεύνηση του μηχανισμού αντοχής)
- Αναφορά του αποτελέσματος ως: “αμφίβολο” με ή χωρίς ερμηνεία και σχετικό σχόλιο “ανθεκτικό”, όταν υπάρχουν άλλες θεραπευτικές επιλογές
- Συζήτηση με τον κλινικό γιατρό, όταν οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες

ΕΤΟΙΜΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ MIC

- ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΑ
- ΗΜΙΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ: MicroScan ,Autoscan 4 ,Wider I, ATB system
- ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ: Vitek System, Phoenix System ,MicroScan WalkAway

Vitek 2 σύστημα

- Μέθοδος μικροαραίωσης
- Κάρτα 64-μικροϋποδοχών
 - Μια υποδοχή ελέγχου
 - Υποδοχές προμετρημένων ποσοτήτων 19-20 αντιμικροβιακών παραγόντων σε συνδυασμό με υλικό καλλιέργειας
- Πλήρωση, σφράγισμα της κάρτας και τοποθέτησή της στην μονάδα επώασης /ανάγνωσης του οργάνου
- Παρακολούθηση ανάπτυξης σε κάθε υποδοχή της κάρτας ανά 15min (φθορισμός, θολερότητα, χρώμα)
- Προσδιορισμός MIC σε 4-18 ώρες
- Επαγωγή αποτελεσμάτων για 4-10 επιπλέον αντιβ. – Αποτελέσματα για 23-30 αντιβιοτικά /κάρτα
- Advanced EXPERT System (AES)

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΣΙΚΑ

- Γιατί πρέπει να ελέγχουμε την ευαισθησία των μυκήτων?
- Διαφορετικά προφίλ ευαισθησίας
 - μεταξύ στελεχών, μεταξύ ειδών
- Μεταβαλλόμενη επιδημιολογία λοιμώξεων
 - νέα είδη με ενδογενή αντοχή
 - επίκτητη αντοχή ευαίσθητων ειδών
- Πρόβλεψη κλινικού αποτελέσματος
- Πολλά φάρμακα – περισσότερες επιλογές
 - Βελτιστοποίηση θεραπείας
- Ανακάλυψη νέων φαρμάκων

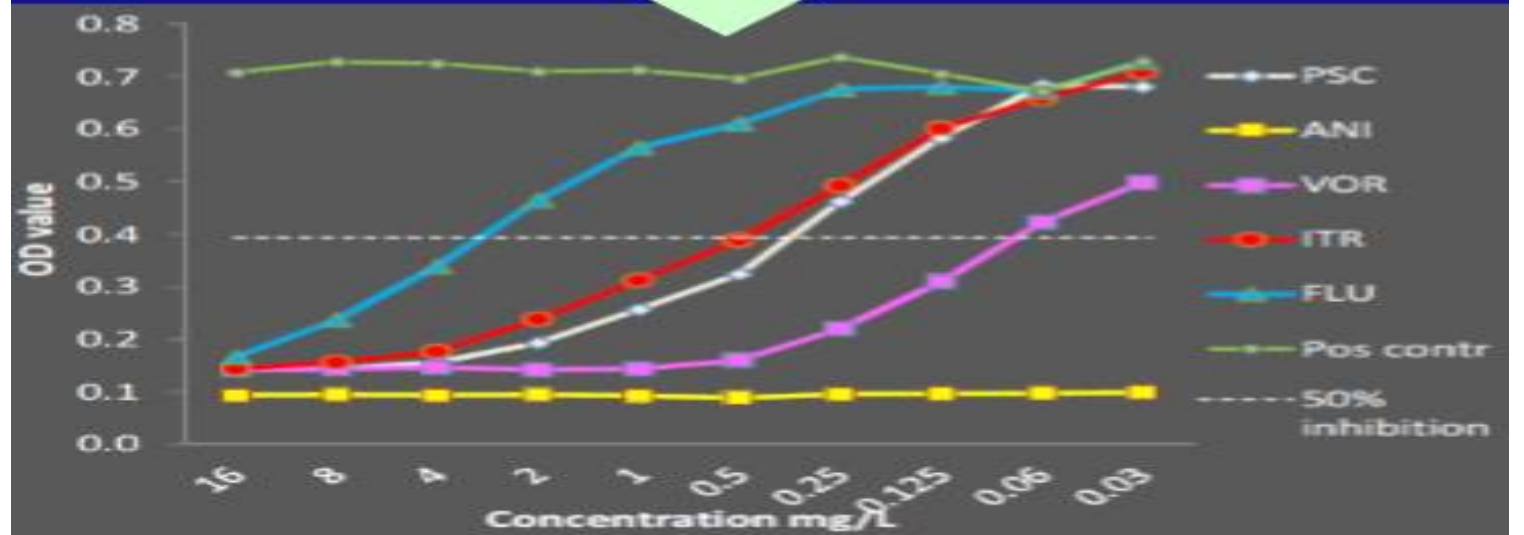
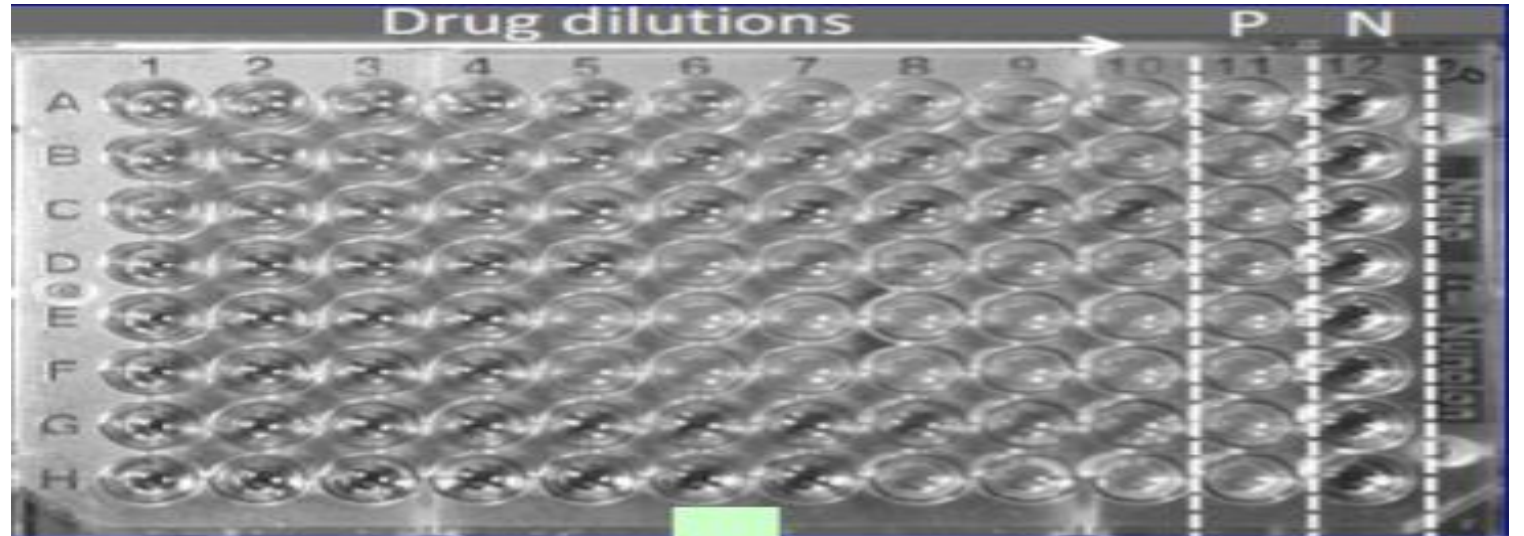
Turner et al. Expert Opin Emerg Drugs. 2006;11(2):231–250.

Maertens et al. Curr Med Chem-Anti-infective Agents.2002;1:65–81

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΙΚΡΟΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΓΙΑ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ (EUCAST)

- ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ
- ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΕΣ 96 ΒΟΘΡΙΩΝ ΜΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΥΘΜΕΝΑ
- RPMI με glucose 2% και MOPS
- ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ DMSO (0.5% τελικό)
- ΤΕΛΙΚΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ $0.5-2.5 \times 10^5$ cfu/ml
- ΕΠΩΑΣΗ ΣΤΟΥΣ $35 \pm 2^\circ\text{C}$ για 24 ± 2 ώρες
- Η ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΙΝΕΤΑΙ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΑ
- AMB=90% αναστολή ανάπτυξης
- Λοιπά φάρμακα=50% αναστολή ανάπτυξης

ΟΠΤΙΚΗ ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΩΝ



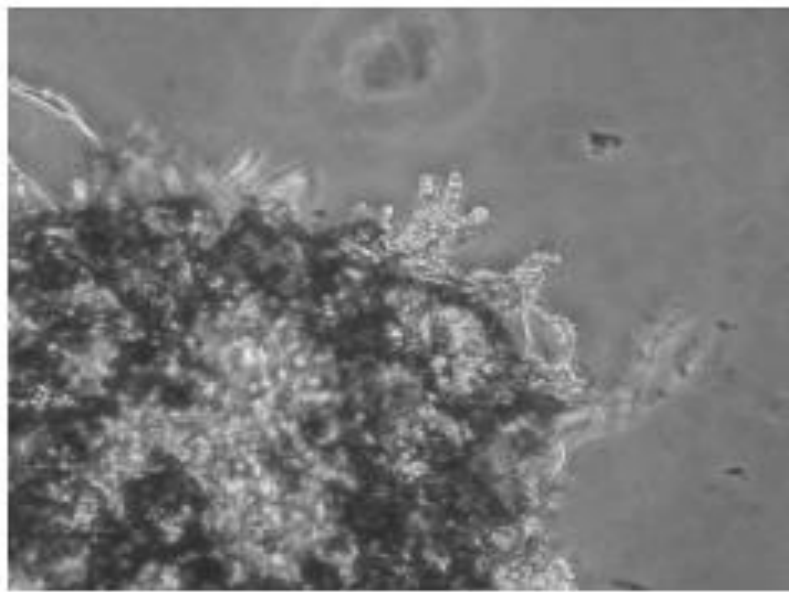
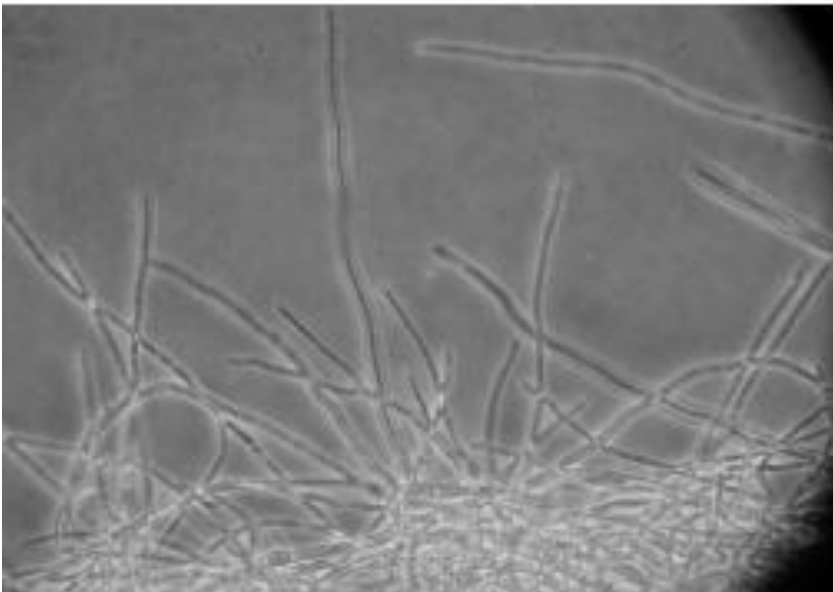
Πρότυπη μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζυμό για υφομύκητες κατά EUCAST Πρωτόκολλο E.Def9.3

Χρησιμοποιώ

- Μικροπλάκα 96 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα και χωρητικότητα περίπου 300μl
- Θρεπτικό υλικό: RPMI1640-2%glucose, MOPS ,PH:7(buffer)
- Εναιώρημα: 0.1% Tween20, Αιμοκυτ/μετρο (Θολερότητα για Aspegillus) $0.5-2.5 \times 10^5$. (Άν έχω υφές >5% χρειάζεται φιλτράρισμα.
- Οι μικροπλάκες επωάζονται στους 34-37°C(χωρίς ανακίνηση)
- Χρειάζονται 24ώρες για τους ζυγομύκητες, 48ώρες για Aspergillus και λοιπούς υφομύκητες, 72 ώρες για Scedosporium. Επώαση πέραν των 72 ωρών δεν συνιστάται.
- Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται οπτικά, καταγράφοντας το βαθμό ανάπτυξης σε κάθε βοθρίο.
- Η τιμή της MIC για όλα τα φάρμακα(εκτός εχिनοκανδινών) είναι η συγκέντρωση εκείνη του φαρμάκου στην οποία δεν έχω ορατή ανάπτυξη (με το μάτι)

MEC(MINIMUM EFFECTIVE CONCENTRATION)

- Για εχينوκανδίνες χρησιμοποιώ:Ελάχιστα αποτελεσματική συγκέντρωση (minimum effective concentration)(MEC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση εχينوκανδινών στην οποία παρατηρούνται ανώμαλες, κοντές κ ακρωτηριασμένες υφές σε αντίθεση με τις μακριές ,διακλαδισμένες υφές που παρατηρούνται όταν έχουμε ανάπτυξη(control).Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί μακροσκοπικά ή μικροσκοπικά

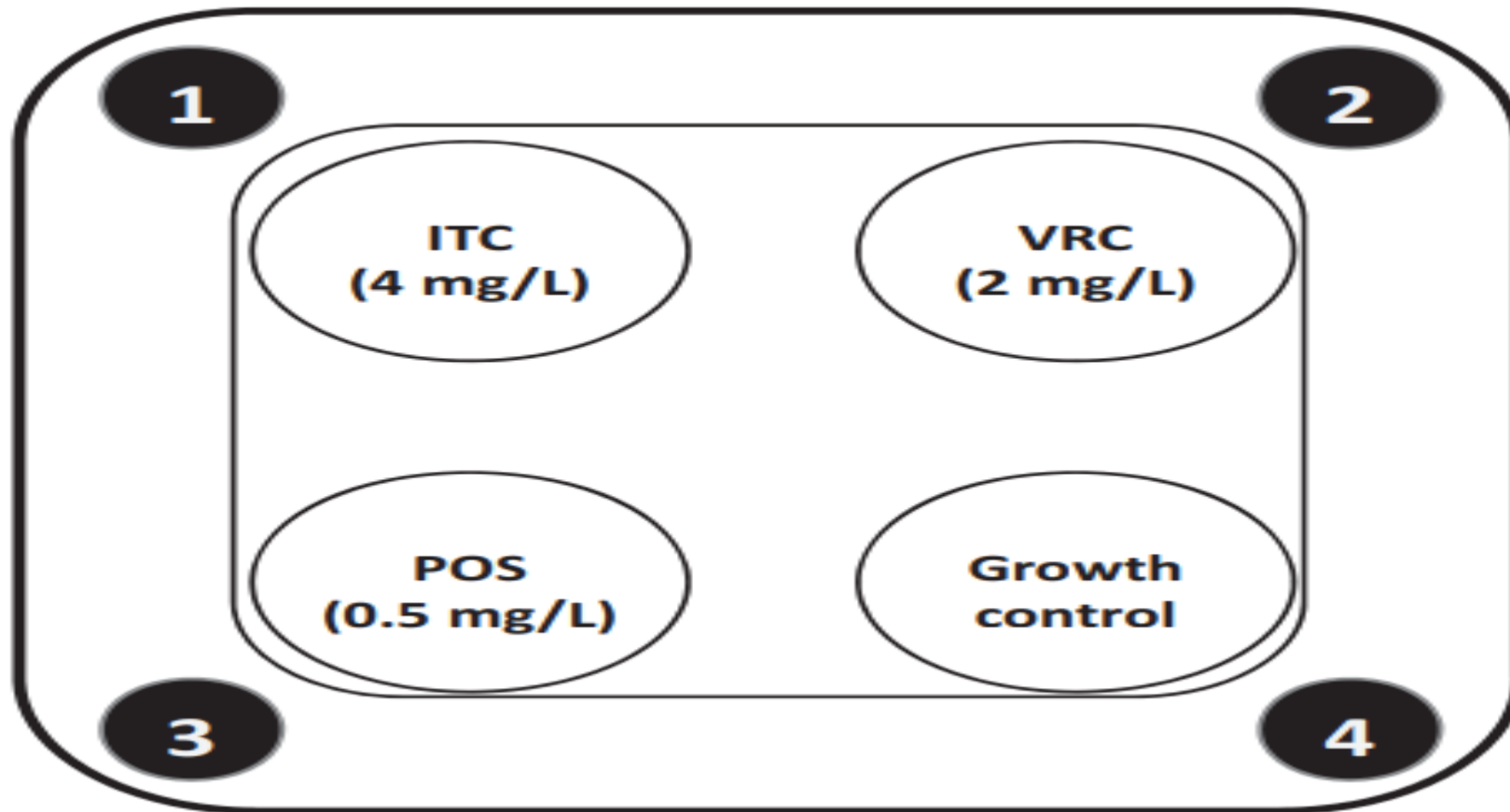


- *A.fumigates*(caspofungin)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΣΕ ΑΓΑΡ ΓΙΑ ΑΖΟΛΕΣ ΚΑΙ ASPERGILLUS FUMIGATUS(EUCAST)

- Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος. Το στέλεχος *A.fumigatus* που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει καλλιεργηθεί σε potato dextrose άγαρ ή Sabouraud dextrose άγαρ και να έχει επωαστεί τουλάχιστον 2-3 μέρες ώστε να παράγει σπόρια. Χρειάζομαι φρέσκο καλλιέργημα.
- Ενοφθαλμίζω 25μl κονίδια 0.5 Mc Farland
- Επωάζω στους 34-37°C για 48ώρες.(ανάπτυξη στις 24 ώρες συνεπάγεται αντοχή.
- Η ανάγνωση γίνεται οπτικά για παρουσία ανάπτυξης κάθε βαθμού.
- Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα 99% (95%– 100%)στην ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών μόνο με έλεγχο σε ITC/VRC

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΣΕ ΑΓΑΡ ΓΙΑ ΑΖΟΛΕΣ ΚΑΙ ASPERGILLUS FUMIGATUS (EUCAST)



Candida and Cryptococcus spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 10.0 valid from 2020-02-04

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)
 Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS buffer
 Inoculum: Final 0.5×10^5 – 2.5×10^5 cfu/mL
 Incubation: 18-24h
 Reading: Spectrophotometric, complete (>90%) inhibition for amphotericin B but 50% growth inhibition for other compounds
 Quality control: *C. parapsilosis* ATCC 22019 or *C. krusei* ATCC 6258

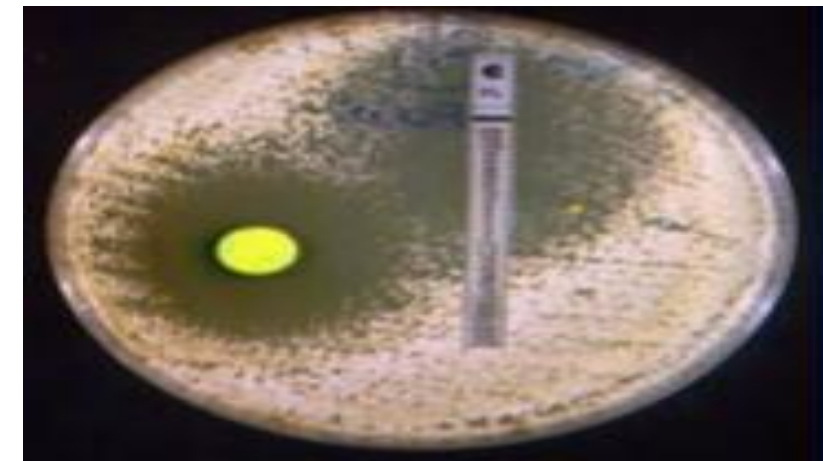
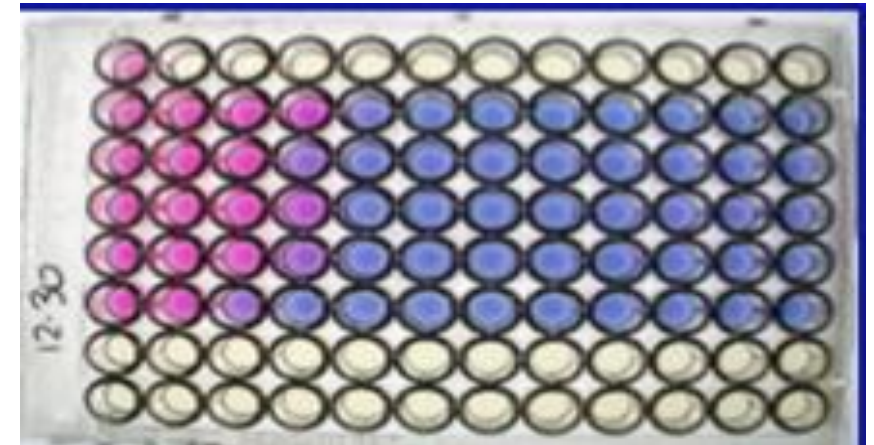
Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)																			Comments on the I category	Comments on the ATU
	<i>Candida albicans</i>			<i>Candida dubliniensis</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida krusei</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Candida guilliermondii</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		Non-species related breakpoints for <i>Candida</i> ¹			
	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >		
Amphotericin B	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	No data to support an I category according to the new definitions	
Anidulafungin	0.03	0.03				0.06	0.06	0.06	0.06	4	4	0.06	0.06	IE ²	IE ²	-	-	IE	IE		
Caspofungin	Note ³	Note ³				Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	IE ²	IE ²	-	-	IE	IE		
Fluconazole	2	4		2	4	0.001 ⁴	16	-	-	2	4	2	4	IE ²	IE ²	IE	IE	2	4	See dosages table for appropriate dose	
Isavuconazole	IE	IE		IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE		
Itraconazole	0.06	0.06		0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.125	0.125	0.125	0.125	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE		
Micafungin	0.016	0.016	0.03			0.03	0.03	IE ⁵	IE ⁵	2	2	IE ⁵	IE ⁵	IE ⁵	IE ⁵	-	-	IE	IE	If S to anidulafungin, report as S and add the following comment: "Isolates susceptible to anidulafungin with micafungin MIC of 0.03 mg/L do not harbour an <i>fkS</i> mutation conferring resistance to the echinocandins". If not S to anidulafungin, report as R and refer to reference laboratory for <i>fkS</i> sequencing and confirmation of MICs.	
Posaconazole	0.06	0.06		0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.06	0.06	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE		
Voriconazole ⁶	0.06 ⁷	0.25 ⁷		0.06 ⁷	0.25 ⁷	IE	IE	IE	IE	0.125 ⁷	0.25 ⁷	0.125 ⁷	0.25 ⁷	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE	4 mg/kg iv twice daily	

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)
 Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS as buffer
 Inoculum: Final 1x10⁵ – 2.5x10⁵ cfu/mL
 Incubation: 48h
 Reading: Visual, complete inhibition for amphotericin B and azoles (MIC), aberrant growth endpoint for echinocandins (MEC).
 Quality control: *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304, *A. fumigatus* F 6919, *A. flavus* CM 1813, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (read after 18-24 h) or *C. krusei* ATCC 6258 (read after 18-24 h).

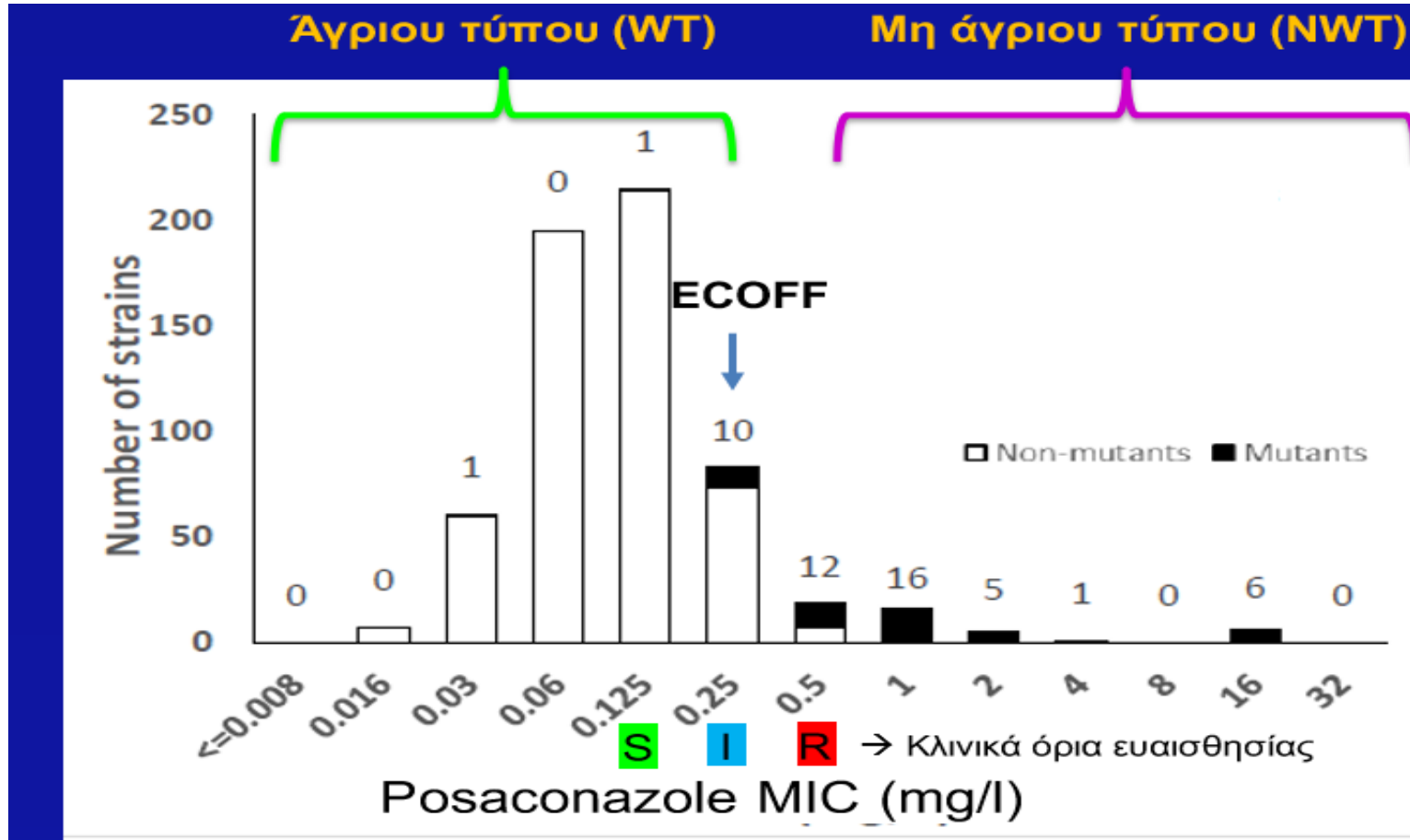
Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)															Comments on the I category	Comments on the ATU	
	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>			<i>A. nidulans</i>			<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>			Non-species related breakpoints ¹			
	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	S ≤	R >	ATU	S ≤			R >
Amphotericin B	-	-		1	1		-	-		1	1	-	-		IE	IE	No data to support an "I" category according to the new definition of "I"	
Anidulafungin	IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE	IE	IE		IE	IE		
Caspofungin	IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE	IE	IE		IE	IE		
Fluconazole	-	-		-	-		-	-		-	-	-	-		-	-		
Isavuconazole	1	2	2	1	2	2	0.25	0.25		IE ²	IE ²	1	1		IE	IE	Isavuconazole MIC = 2 mg/L should not be interpreted as I but only followed up as an ATU If voriconazole wild-type (<i>A. flavus</i> : voriconazole MIC ≤2 mg/L; <i>A. fumigatus</i> : voriconazole MIC ≤1 mg/L) report as isavuconazole S and add the following comment: The MIC of 2 mg/L is one dilution above the S breakpoint but within the wild-type isavuconazole MIC range due to a stringent breakpoint susceptibility breakpoint. See rationale documents for more information. If voriconazole non wild-type report as isavuconazole R and refer to reference laboratory for CYP51A sequencing and confirmation of MICs ³ .	
Itraconazole⁴	1	1	2	1	1	2	1	1	2	IE ^{2,5}	IE ^{2,5}	1	1	2	IE ⁵	IE ⁵	Report as R with the following comment: "In some clinical situations (non-invasive infections forms) itraconazole can be used provided sufficient exposure is ensured".	
Micafungin	IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE	IE	IE		IE	IE		
Posaconazole⁴	IE ²	IE ²		0.125	0.25	0.25	IE ²	IE ²		IE ²	IE ²	0.125	0.25	0.25	IE	IE	Posaconazole MIC = 0.25 mg/L should not be interpreted as I but only as ATU If S to itraconazole report as S and add the following comment: "The MIC is 0.25 mg/L and thus one dilution above the S breakpoint due to overlapping wt and non-wt populations". If not S to itraconazole report as R and refer to reference laboratory for CYP51A sequencing and confirmation of MICs.	
Voriconazole⁴	IE ²	IE ²		1	1	2	1	1	2	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²		IE	IE	Report as R with the following comment: "In some clinical situations (non-invasive infections forms) voriconazole can be used provided sufficient exposure is ensured".	

Εμπορικά τεστ ευαισθησίας

- Μικροαραιώσεις σε ζυμό (με ή χωρίς δείκτες)
- Sensitre YeastOne (FDA approved)
- ATB fungus
- SensiQuatro
- Fungitest,
- Candifast
- Micronaut
- Διάχυση σε άγαρ(δισκία, ταινίες)
- Etest(FDA approved), MIC test strips NeoSensitab
- Αυτόματα συστήματα
- Vitek2 (FDA approved)



Επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας ποσακοναζόλης έναντι *A. fumigatus*



Espinel-Ingroff AAC 2018

Νέοι ορισμοί κατά EUCAST-2019: S, I, R

- Ο μύκητας χαρακτηρίζεται ως **Ευαίσθητος**, με το κανονικό δοσολογικό σχήμα, όταν αναμένεται θεραπευτική επιτυχία χορηγώντας τον αντιμικροβιακό παράγοντα στο κανονικό δοσολογικό σχήμα.
- Ο μύκητας χαρακτηρίζεται ως **Ευαίσθητος, σε αυξημένη έκθεση**, όταν αναμένεται θεραπευτική επιτυχία, εφόσον εξασφαλίζεται αυξημένη έκθεση στον αντιμικροβιακό παράγοντα είτε λόγω τροποποίησης του δοσολογικού σχήματος είτε λόγω μεγάλης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα στη θέση της λοίμωξης.
- Ο μύκητας χαρακτηρίζεται ως **Ανθεκτικός** όταν αναμένεται θεραπευτική αποτυχία, ακόμη και σε αυξημένη έκθεση του μικροοργανισμού στον αντιμικροβιακό παράγοντα*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Κλινικά όρια ευαισθησίας υπάρχουν μόνο για συγκεκριμένα φάρμακα και είδη *Candida* και *Aspergillus*.
- Για τα υπόλοιπα είδη και φάρμακα δεν μπορεί να γίνει κλινική αξιολόγηση της ευαισθησίας παρά μόνο η κατηγοριοποίησή τους σε άγριου τύπου και μη άγριου τύπου με βάση επιδημιολογικά όρια ευαισθησίας.
- Μη άγριου τύπου στέλεχος με φαινοτυπικά ανιχνεύσιμη αντοχή R
- Άγριου τύπου Στέλεχος χωρίς φαινοτυπικά ανιχνεύσιμη αντοχή S ή R Χρήση κλινικών ορίων ευαισθησίας για παρόμοια είδη *Candida* ή *Aspergillus*.
- Προσοχή στην εφαρμογή κλινικών ορίων ευαισθησίας κατά EUCAST σε εμπορικά τεστ που δεν δίνουν παρόμοιες τιμές MIC