

EUCAST diskdifusiooni metoodika ja esialgsed QC kriteeriumid mõnedele kiiresti kasvavatele anaeroobsetele bakteritele

Krista Lõivukene
Tartu, oktoober 2021

EUCAST uudised



2. September 2021

EUCAST: diskdifusioonimeetod viie olulise anaeroobse mikroobiliigi/perekonna (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* ja *Cutibacterium acnes*) antimikroobse tundlikkuse määramiseks
Tundlikkuse määramise metoodika, hindamise juhendid ja kvaliteedikontrolli kriteeriumid

1. Jaanuar 2022

EUCAST tundlikkuse hindamise tabel vs 12.0: diskide tsoonide hindamise kriteeriumid

9. Detsember 2021

Veebipõhine seminar kell 8.00 (kordus kell 13.00 ja 16.00) Kesk -Euroopa aja järgi
<https://us02web.zoom.us/j/87275780743?pwd=UVFlQzJHa3pTQjhEK29ncWc4S1NLZz0>

EUCAST ja anaeroobide tundlikkuse määramine



Detsember 2009 – Jaanuar 2021: ainult gradienttestid

- Gram-negatiivsed anaeroobid
- Gram-positiivsed anaeroobid
- *Clostridioides difficile*

September 2021: diskid

- *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* ja *Cutibacterium acnes*

Kvaliteedikontroll



- Gradient-testid: tootjapoolne (meil Lioflchem, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285)
- Diskid: EUCAST
 - **Bacteroides fragilis* ATCC 25285
 - **Clostridium perfringens* ATCC 13124
 - **Clostridium perfringens* ATCC 25589 – keskkonna anaeroobsuse kontroll

Kvaliteedikontroll



<i>B. fragilis</i> ATCC 2528	Disk (µg)	Tsooni diameeter (mm)	
		Märklaud	Piirid
Piperatsilliin-tasobaktaam	30 - 6	32	29 - 35
Meropeneem	10	35 - 36	32 - 39
Klindamütsiin	2	26	23 - 29
Metronidasool	5	32 - 33	29 - 36

<i>C. perfringens</i> DSM 25589	Disk (µg)	Cutt-off (mm)
Metronidasool	5	<25

<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	Disk (µg)	Tsooni diameeter (mm)	
		Märklaud	Piirid
Penitsilliin	1 Ühik	26	23 -29
Piperatsilliin-tasobaktaam	30 - 6	33	30 - 36
Meropeneem	10	37	34 - 40
Vankomütsiin	5	17	14 - 20
Klindamütsiin	2	23	20 - 26
Metronidasool	5	23	20 - 26

Söötmed



Fastidious Anaerobe Agar (FAA) koos 5% mehaaniliselt defibrineeritud hobuseverega, lisanditeta

- a. Agari sügavus $4,0 \pm 0,5$ mm
- b. Säilitada $4-8$ ° C ventileeritavatel riulitel ja valguse eest kaitstult
- c. FAA plaadid kuivatada enne inokuleerimist kuivatada:
 - i. Kuivatage temperatuuril $20-25$ ° C üleöö või
 - ii. Kuivatage 35 ° C juures 15 minutit
- d. Ärge pre-redutseerige enne külve FAA plaate anaeroobses keskkonnas**



Tundlikkuse määramine

1. Üleöö mitteselektiivsel söötmel kasvanud kultuur, valida mitut morfoloogiliselt sarnast kolooniat
2. 1.0 (0.9-1.1) McFarland tihedusega suspensioon
3. Külv ja diskid 15 minuti jooksul

Tundlikkuse hindamine

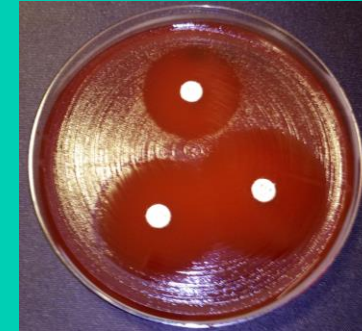
1. Kasv peab olema laatu, vastasel juhul korrata testi või kasutada MIK teste
2. Uduse tsooni korral mõõtke tsooni kõige ilmsemat piiri
3. Topelttsoonide korral mõõtke tsooni sisemist piiri
4. Tsoonide hindamisel ignoreerige hemolüüsi ja roomavat kasvu
5. Arvestage inhibeerimisvööndis kasvavaid kolooniaid, eriti klindamütsiini puhul



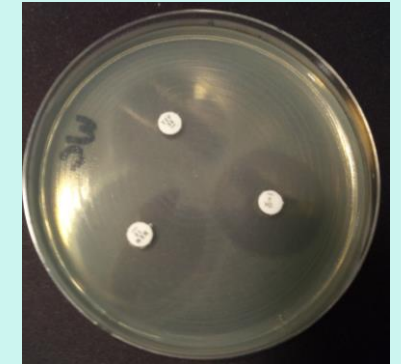
TÜK mikrobioloogialabori katsetus



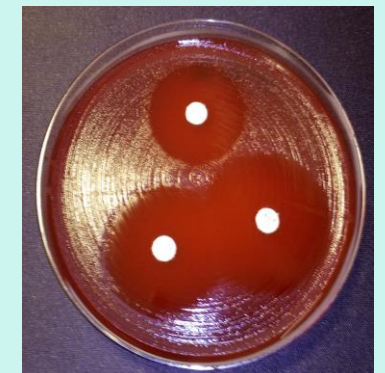
Wilkins Chalgren	Tulemus	Tsooni diameeter (mm)	
		Märklaud	Piirid
Piperatsilliin-tasobaktaam	33	32	29 - 35
Meropeneem	34	35 - 36	32 - 39
Klindamütsiin	28	26	23 - 29



Wilkins Chalgren verega	Tulemus	Tsooni diameeter (mm)	
		Märklaud	Piirid
Piperatsilliin-tasobaktaam	32	32	29 - 35
Meropeneem	35	35 - 36	32 - 39
Klindamütsiin	27	26	23 - 29



Fastidious Anaerobe Agar I	Tulemus	Tsooni diameeter (mm)	
		Märklaud	Piirid
Piperatsilliin-tasobaktaam	33	32	29 - 35
Meropeneem	35	35 - 36	32 - 39
Klindamütsiin	27	26	23 - 29



Fastidious Anaerobe Agar II	Tulemus	Tsooni diameeter (mm)	
		Märklaud	Piirid
Piperatsilliin-tasobaktaam	32	32	29 - 35
Meropeneem	35	35 - 36	32 - 39
Klindamütsiin	27	26	23 - 29

Eelised

- Odavus
- Lihtsus (dispenser)
- Kvaliteedikontroll
- Gram-negatiivsete ja Gram-positiivsete anaeroobide eristamine, kas ka hindamistabelis?
- Täpne töö kirjeldus

Puudused

- Ei kata kõiki anaeroobseid mikroobe
- Ei võimalda tundlikkuse andmete täpset analüüsi



GRAM-NEGATIIVSETE ANAEROOBSETE BAKTERITE DIAGNOSTIKA JA ANTIBIOOTIKUMTUNDLIKKUSE MÄÄRAMINE TARTU ÜLIKOOI KLIINIKUMI ÜHENDLABORI KLIINILISE MIKROBIOLOOGIA OSAKONNAS 2016 – 2020

Krista Lõivukene¹, Kadri Kermes¹, Epp Sepp², Paul Naaber^{2,3}, Siiri Kõljalg^{1,2}

¹Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabor, ²Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini
instituudi mikrobioloogia osakond, ³SYNLAB Eesti OÜ

Taust

- Anaeroobsed mikroobid: normaalse mikrobiota osa
- Sattudes limaskestadelt keha steriilsetesse piirkondadesse → infektsioonid

Eesmärgid

Hinnata Gram-negatiivsete anaeroobide taksonoomilisi muutusi ja antibiootikumitundlikkuse erinevusi ajas

Meetodid

- 2016. vs 2020. TÜK ÜL kliinilise mikrobioloogia labori andmed
- Samastamine: MALDI-TOF seadmega
- Antibiootikumitundlikkus: gradient-testid MIK (minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon)
- Andmed: statistikaprogramm OLAP, MIK võrdlus Mann-Whitney test



Tulemused I



- 2016. 303 Gram- negatiivset anaeroobi (47 liiki 7 perekonnast)
- 2020. 490 Gram- negatiivset anaeroobi (48 liiki 9 perekonnast)

Perekonnad	2016			2020		
	arv (liikide arv)	% Gram- negatiivsetest (303)	% kõikidest anaeroobidest (388)	arv (liikide arv)	% Gram- negatiivsetest (490)	% kõikidest anaeroobidest (623)
<i>Bacteroides</i> spp.*	172 (11)	56,8	44,3	282 (11)	57,6	45,3
<i>Bilophila</i> spp.	1 (1)	0,3	0,3	0	0	0
<i>Capnocytophaga</i> spp.	0	0	0	2 (2)	0,4	0,3
<i>Dialister</i> spp.	0	0	0	2 (2)	0,4	0,3
<i>Fusobacterium</i> spp.	23 (7)	7,6	5,9	49 (6)	10	7,9
<i>Porphyromonas</i> spp.	5 (1)	1,7	1,3	1 (1)	0,2	0,2
<i>Prevotella</i> spp.	96 (17)	31,7	24,7	145 (17)	29,6	23,3
<i>Veillonella</i> spp.	6 (3)	2	1,5	10 (3)	2	1,7

**Bacteroides* spp., *Bacteroides fragilis*, *Odoribacter* spp., *Parabacteroides* spp.

- Mikroobigruppide protsentuaalne jaotus oli sarnane
- Domineerisid Gram-negatiivsed anaeroobid
- Taksonoomilisi muutusi ei olnud

C. perfringens (16 ja 13): 4,1% ja 2,1%
C. acnes (9 ja 7): 2,3% ja 1,1%
F. necrophorum (4 ja 7): 1,0% ja 1,1%

Tulemused II



- Tundlike tüvede protsent oli sarnane
- Erinevused MIK väärtustes ($p < 0,05$):

2020. MIK kõrgem ampitsilliin-sulbaktaami, imipeneemi ja klindamütsiini suhtes

Perekond	Ampitsilliin-sulbaktaam	Imipeneem	Klindamütsiin
	p väärtus 2016 vs 2021	p väärtus 2016 vs 2021	p väärtus 2016 vs 2021
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,0001	$>0,05$	0,0044
<i>Bacteroides non fragilis</i>	0,001	$>0,05$	$>0,05$
<i>Fusobacterium</i> spp.	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
<i>Prevotella</i> spp.	0,001	0,0038	0,0072

- Kliinikutes prevaleerivad anaeroobid:

Kirurgia-, Anestesioloogia ja intensiivravi-, Hematoloogia-onkoloogia: **Bakteroidid**

Stomatoloogia-, Kõrvakliinik: **Prevotella**

- Enim erinevaid mikroobigruppe Kirurgia-, Anestesioloogia ja intensiivravi- ning Hematoloogia-onkoloogia kliinikus

EUCAST: vibriote tundlikkuse määramine

Tartu, Krista Lõivukene

Vibriod



Osa *Vibrio* liike on patogeensed

- *Seedetrakti haigused, kõhukrambid ja vesine kõhulahtisus
- *Toidumürgitus (toored mereannid)
- *Septitseemia
- *Haavainfektsioonid

Antimikroobsed ravimid

Tundlikkuse määramine: puljonglahjendusmeetod (EUCAST)

Diskid



Liik	Isolaate
<i>Vibrio alginolyticus</i>	48
<i>Vibrio cholerae</i>	47
<i>Vibrio fluvialis</i>	44
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	46
<i>Vibrio vulnificus</i>	48

Vibrio spp.	T≤	R>	Märkused
Piperatsilliin+tasobaktaam	1	1	Metsikut tüüpi <i>V. fluvialis</i> 'el on kõrgem MIC kui 1 mg/l
Tsefotaksiim	0,25	0,25	<i>V. fluvialis</i> : "IE"
Tseftasidiim	1	1	
Meropeneem	0,5	0,5	
Tsiprofloksatsiin	0,25	0,25	Skriininguks pefloksatsiini 5 µg disk
Levofloksatsiin	0,25	0,25	Skriininguks pefloksatsiini 5 µg disk
Asitromütsiin	4	4	Skriininguks erütromütsiini 5 µg disk
Doksütsükliin	0,5	0,5	Skriininguks tetratsükliini 30 µg disk
TMP+SMX	0,5	0,5	

Diskide kriteeriumid tulevad 2022

eLabori võimekus: 57 liiki



TÜK	2014	2015	2016	2019	2020	2021	Grand Total
<i>Vibrio albensis</i>			1		1	2	4
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	1		1			4
<i>Vibrio fluvialis</i>			1				1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		1					1
<i>Vibrio spp.</i>	1						1
<i>Vibrio vulnificus</i>						1	1
Total	3	2	2	1	1	3	12

TÜK	Haavaeritis	Keskkõrvaeritis	Kõrvaeritis	Täpsustamata materjal	Uriin (keskjoa)	Grand Total
<i>Vibrio albensis</i>		1	2		1	4
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2		1	1		4
<i>Vibrio fluvialis</i>			1			1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>				1		1
<i>Vibrio spp.</i>			1			1
<i>Vibrio vulnificus</i>			1			1
Total	2	1	6	2	1	12

Pseudomonaadide valik + kirjandus



Vibrio spp.	T	MT	Total
Gentamütsiin	6		6
Piperatsilliin+tasobaktaam	10		10
Tsefepiim	10		10
Tsiprofloksatsiin	10		10
Amikatsiin	10		10
Imipeneem	2	1	3
Meropeneem	3		3
Tseftasidiim	10		10

Vibrio spp.	0,38	0,5	0,75	1	2	0,75	Kokku
Gentamütsiin	1	1	1	1	1	1	6

Vibrio spp.	0,094	1,5	Kokku
Imipeneem	1	2	3

Vibrio spp.	0,008	0,25	0,38	Kokku
Meropeneem	1	1	1	3
EUCAST	1	1	1	3

Vibrio spp.	0,19	0,25	0,38	0,5	0,75	1	6	Kokku
Piperatsilliin+tasobaktaam	1	1	3	1	2	1	1	10
EUCAST	1	1	3	1	2	1	1	10

Vibrio spp.	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	2	Kokku
Tsefepiim	2	1	3	2	1	1	10

Vibrio spp.	0,002	0,003	0,004	0,006	0,012	0,125	Kokku
Tsiprofloksatsiin	1	2	2	2	2	1	10
EUCAST	1	2	2	2	2	1	10



- 1. Diskid, MIK-d ELMÜ kodulehele**
- 2. Laborite valik**
- 3. Resistentsusega probleemi pole, va *V. fluvialis***