

Fræðsludagur um næmispróf 12. nóvember 2012

Helga Erlendsdóttir,
lífeindafræðingur MSc. og
klínískur prófessor á
Sýklafræðideild



Hver vegna sýklaræktanir?

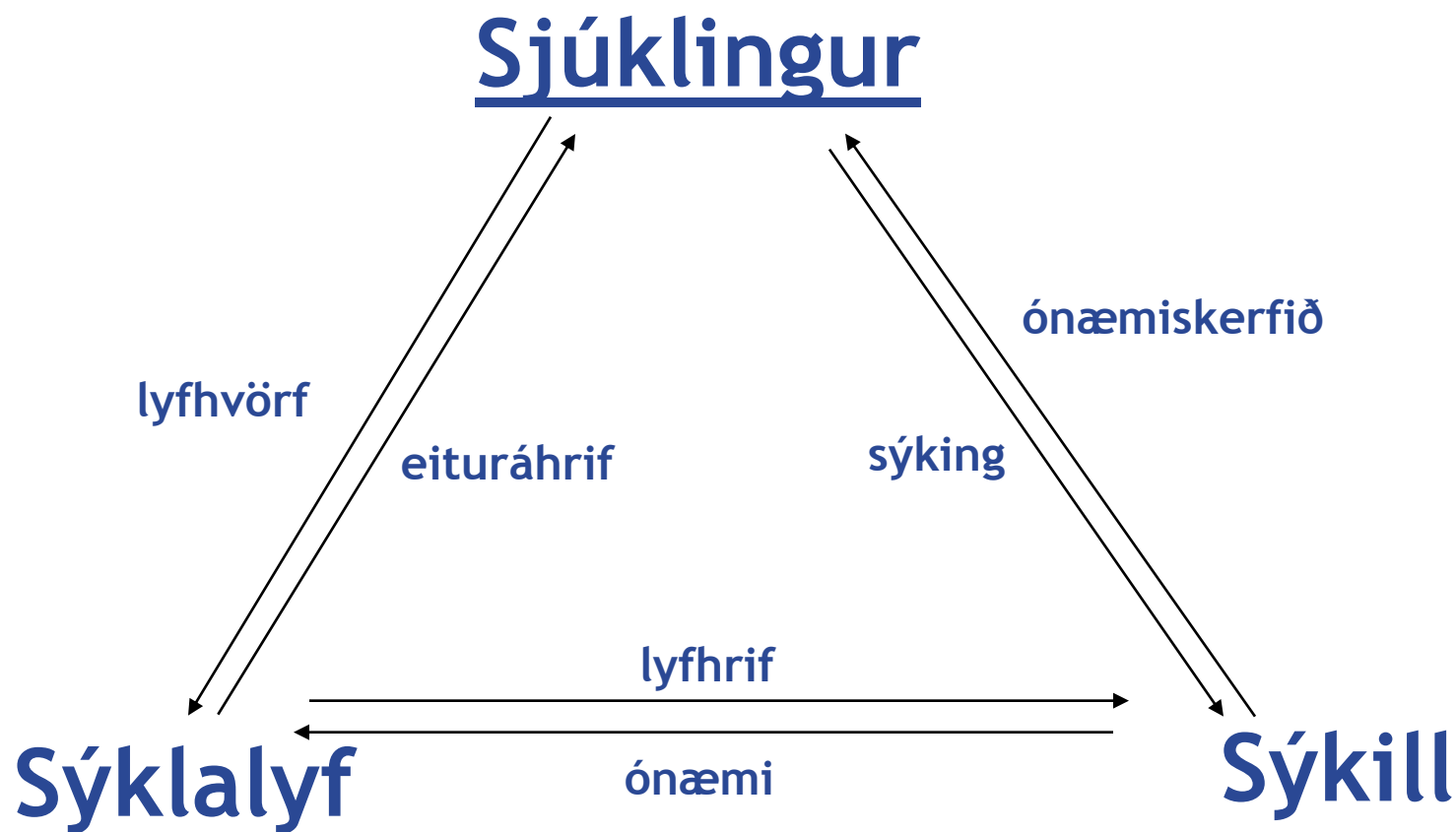
- Til sjúkdómsgreininga
 - að sanna tilvist sýkingar
 - að vísa á sýkingarstað
 - að fá vísbendingar um horfur
- Til næmisprófa
- Til faraldsfræðilegra rannsókna

Af hverju næmispróf ?

- Finna heppileg lyf til meðferðar
- Næmi sýkla mjög breytilegt
 - sýklalyfjaónæmi er vaxandi vandamál
- Fylgjast með ónæmispróun - tengsl sýklalyfjanotkunar og ónæmis
 - á sjúkrahúsum
 - í samfélaginu
- Meta áhrif fyrirbyggjandi aðgerða
- Stefnumótun



Samspil sjúklings, lyfs og sýkils



Lyfhvörf (pharmacokinetics) það sem líkaminn gerir við lyfið

- **Samspil lyfs og sjúklings**
 - upptaka, niðurbrot, útskilnaður
 - skammtur, lyfjaform
 - helmingurnartími, $T_{1/2}$
 - próteinbinding
- **Mælanlegar breytur**
 - lyfjapéttni
 - C_{max} (hæsta péttni)
 - aðgengi (AUC, area under the curve)
 - $T > MIC$ (MIC, minimal inhibitory concentration)

Lyfhvörf

Pharmacokinetics

- **Helmingunartími (plasma half life)**
 - benzylpenicillin 30 mínútur
 - ceftriaxone 6-8 klukkustundir
- **Próteinbinding**
 - cloxacillin og ceftriaxone >90% bundin
- **Aðgengi að sýkingarstað**
 - miðtaugakerfi

Lyfhrif (pharmacodynamics) það sem lyfið gerir við bakteríuna

- **Samspil lyfs og sýkils**
 - verkunarmáti á sýkingarstað, eituráhrif
- **Mælanlegar breytur**
 - hammörk (MIC - minimal inhibitory concentration)
 - drápsmörk (MBC - minimal bactericidal concentration)
 - drápshraði
 - drápsvirkni (sermis-eftir sýklalyfjagjöf)
 - eftirverkun sýklalyfja (PAE post antibiotic effect)
 - mögnun hvítra blóðkorna (PALE post antibiotic leucocyte enhancement)

Lyfhrif (pharmacodynamic)

- **Verkun getur verið**
 - þéttniháð
 - tímaháð
- **Sýklalyf**
 - hindrar (bacterostatic)
 - drepur (bacterocidal)

Val sýklalyfja

- Lyfhverf (pharmacokinetic)
- Lyfhrif (pharmacodynamic)
- Nota teygjubyssur ef duga frekar en fallbyssur
- Óþægindi og aukaverkanir
- Meðferðarheldni
- Milliverkanir
- Kostnaður



Næmi baktería og verkunarsvið

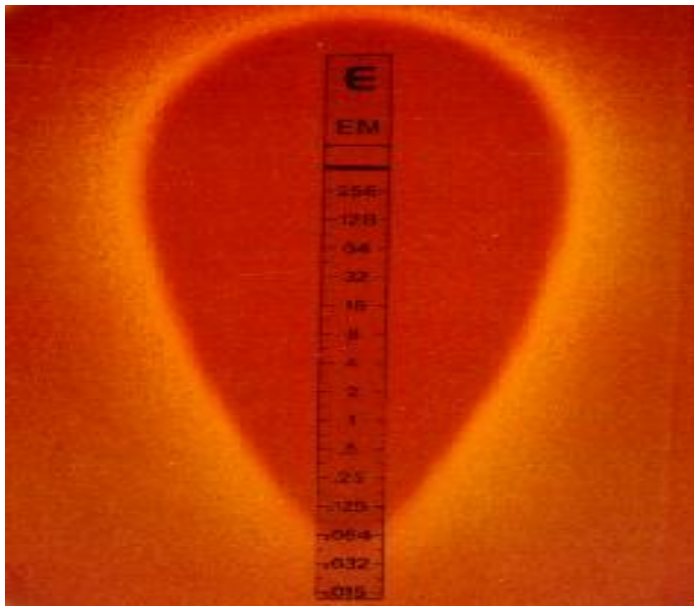
- **Heftistyrkur**
 - MIC = minimum inhibitory concentration
- **Drápsstyrkur**
 - MBC = minimum bactericidal concentration
- **Samverkandi áhrif**
 - Synergism
- **Gagnverkandi áhrif**
 - Antagonism
- **Sýklastofn getur verið þolinn**
 - $MBC \gg MIC$ (32x)



Minimum Inhibitory Concentration- MIC/lágmarksheftistyrkur-hammörk

- Er lægsti styrkur sýklalyfs sem kemur í veg fyrir sýnilegan vöxt
- Skilgreint við staðlaðar aðstæður fyrir hverja bakteríutegund og hvert sýklalyf
- Byggir á:
 - klínískum áhrifum við mismunandi skammtastærðir
 - eiturverkun (toxicity)
 - dreifingu “populationa” hjá mismunandi bakteríutegundum
 - eiginleikum sýklalyfs

MIC mæling með E-testi



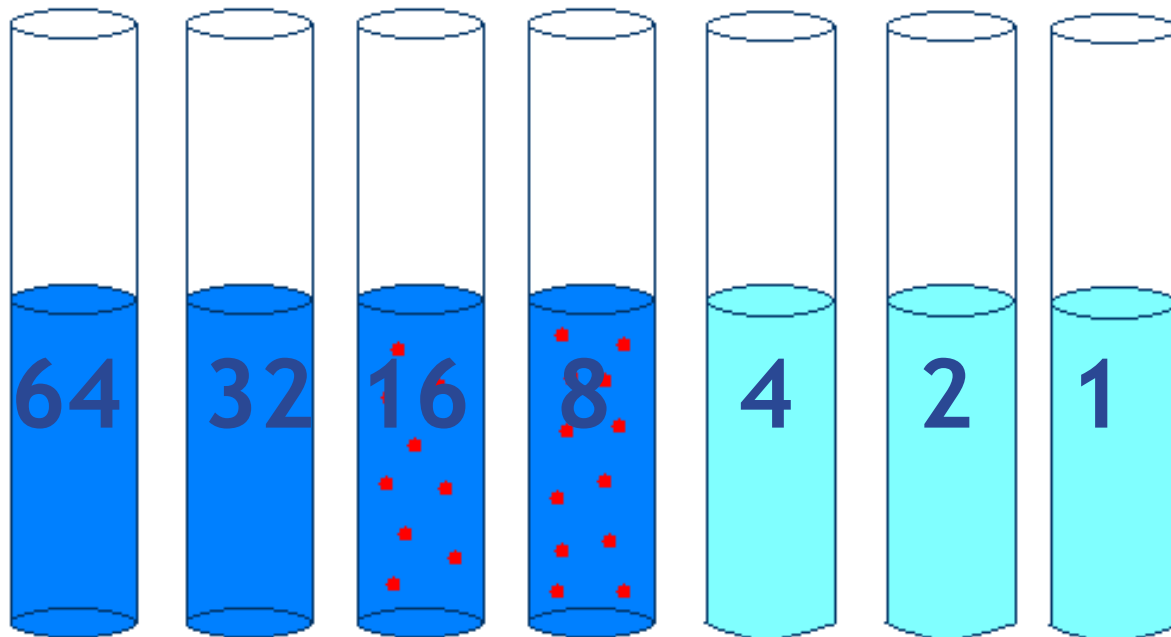
MIC - lyfjapynning í broði

MBC = 32 $\mu\text{g/ml}$

MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$

Enginn vöxtur

Vöxtur



μg sýklalyfs/ml

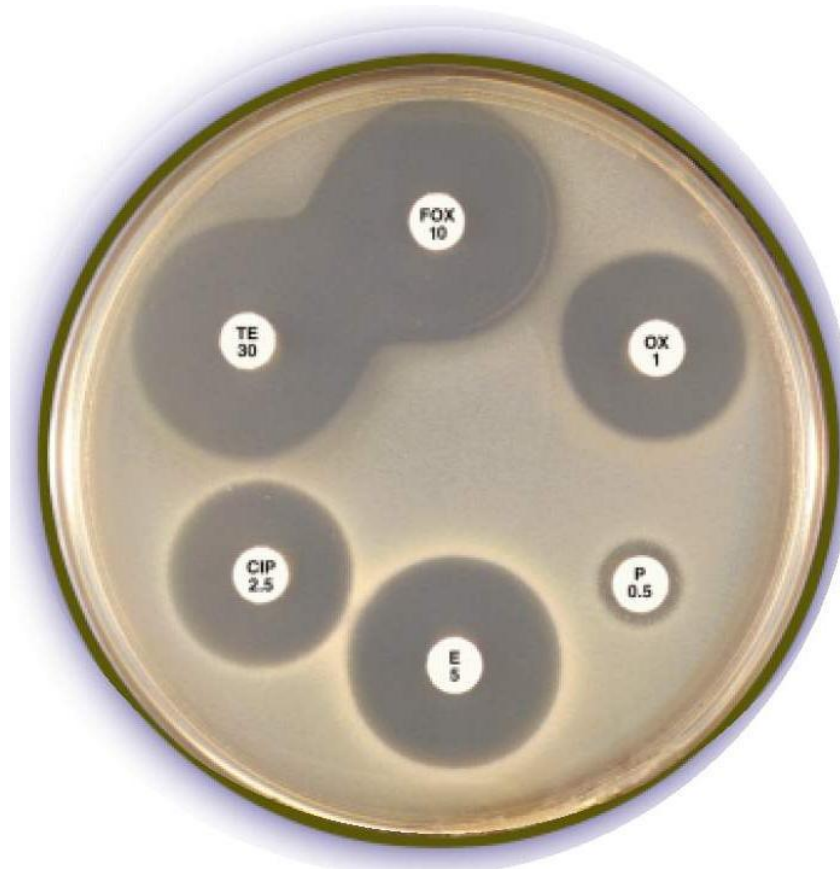


Minimun Bactericidal Concentration- MBC/lágmarksdrápsstyrkur-drápsmörk

- Sá styrkur sýklalyfs sem drepur 99,9% af upphaflegum gróðri í glasi sem hefur verið inkuberað í 24-48 klst.
- $MIC \leq MBC$ fyrir bakteríudrepandi lyf
- $MIC \lll MBC$ fyrir bakteríuhemjandi lyf
- MBC bakteríuhemjandi lyfja er hátt
 - ekki er hægt að ná þeim styrkleika *in vivo* án eituráhrifa

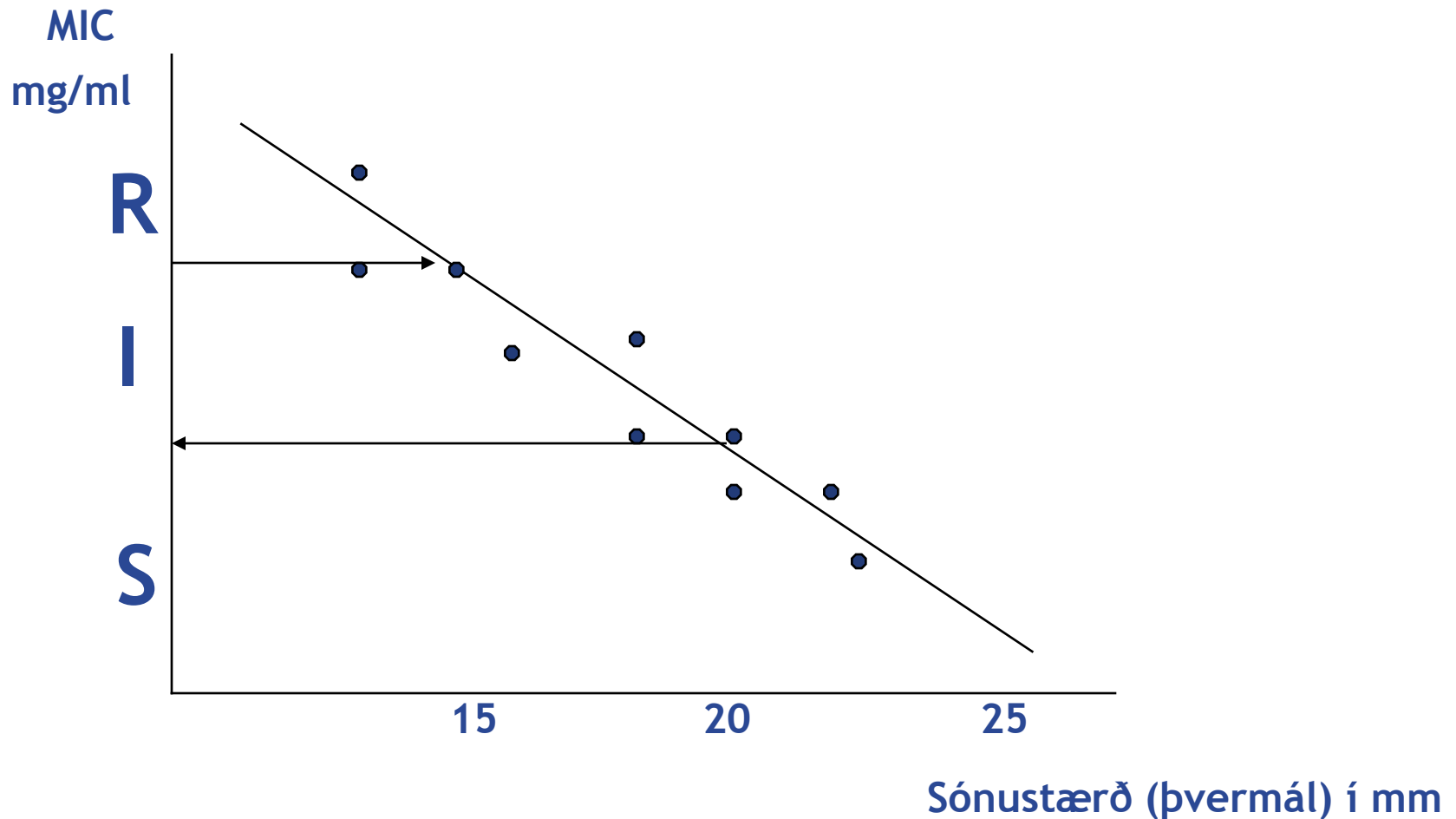


Skífunaæmispróf





Samband sönustærða og MIC



Túlkun á næmisprófum

- **Túlkun á rannsóknarniðurstöðum er í samræmi við klínísku reynslu**
 - styrkur sýklalyfs næst auðveldlega í sermi, öðrum líkamsvessum eða vefjum og hemur vöxt bakteríu
 - bakteríur sem vaxa þrátt fyrir að styrkur sýklalyfs sé nægilegur, eru með minnkað næmi
- **Oftast góð fylgni milli rannsóknarniðurstaða og klínískrar virkni**

S - I - R kerfið

■ S = sensitive

- Gera má ráð fyrir að bakterían sé næm fyrir sýklalyfinu í þeim skömmtum sem mælt er með. Ekki hefur með næmisprófi tekist að sýna fram á ónæmi bakteríunnar gegn lyfinu

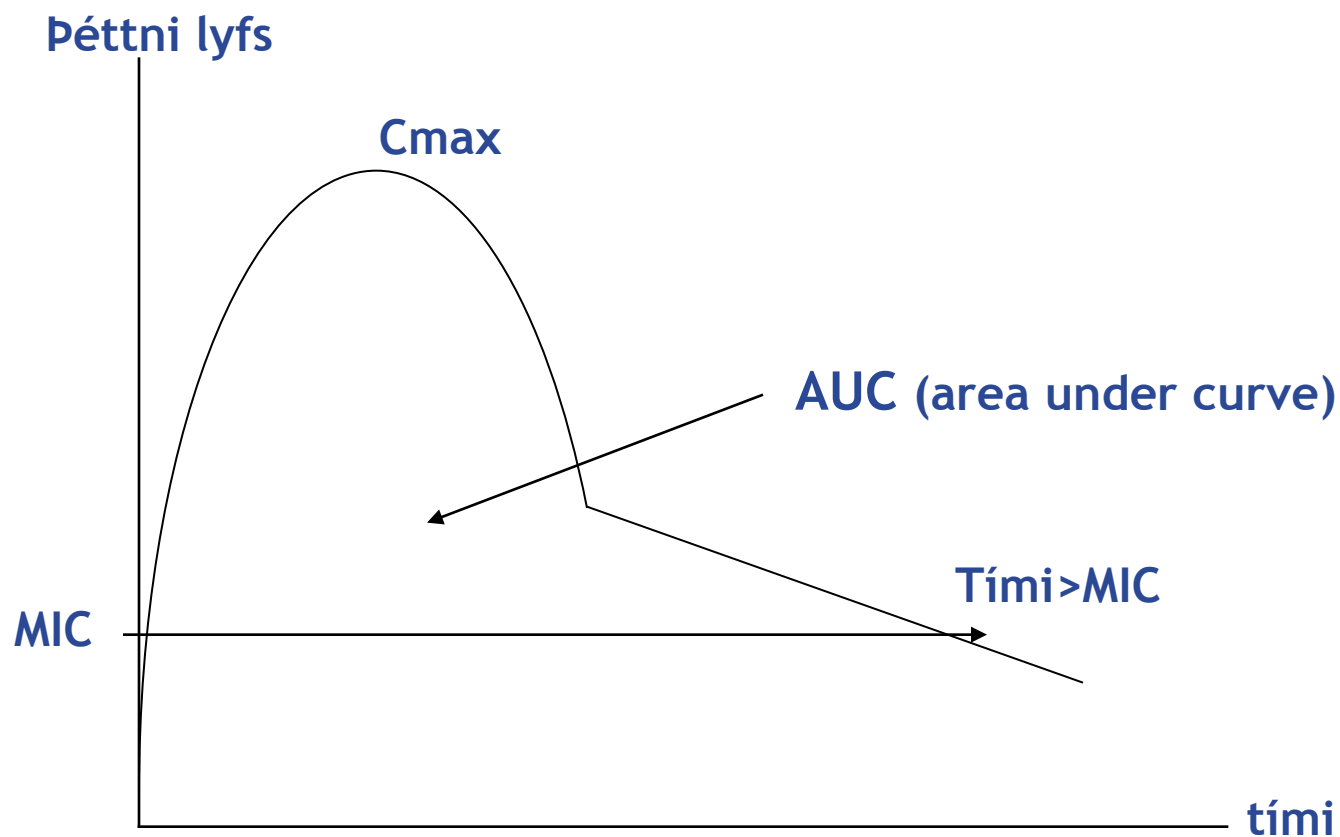
■ I = intermediate

- Árangur meðferðar með lyfinu er óöruggur. Bakterían er að einhverju leyti ónæm fyrir lyfinu. Mögulega hægt er að nota lyfið þar sem hár styrkur sýklalyfsins næst

■ R = resistant

- Ólíklegt er að meðferð með þessu lyfi beri árangur. Bakterían er ymist með áunnið ónæmi eða eðlislægt ónæmi

Samband þéttni og næmis



Aðgengi sýklalyfja

- Frásog frá meltingarvegi
- Sýkingastaðir eru breytilegir og þar með aðgengi sýklalyfja
 - aðgengi inn í miðtaugakerfi (blood brain barrier)
 - stíflað eðlilegt flæði
 - gallvegir, göng úr miðeyra niður í kokkýli
- Þurfa að ná MIC á sýkingarstað



Túlkun háð aðgengi sýklalyfs

Pneumókokkar

Penicillín - **meningitis**

S
 ≤ 0.064

R
 > 0.064

Penicillín - ekki meningitis

S
 ≤ 0.064

R
 > 2

Ceftriaxón - **meningitis**

S
 ≤ 0.5

R
 ≥ 2 (CLSI)

Ceftriaxone - ekki meningitis

S
 ≤ 1

R
 ≥ 4 (CLSI)

Haemophilus influenzae

Meropenem - **meningitis**

S
 ≤ 0.25

R
 > 1

Meropenem - ekki meningitis

S
 ≤ 2

R
 > 2

Gæðaeftirlit varðandi pneumókokka

■ Innra gæðaeftirlit

- Pneumókokkur ATCC 49619
 - vikulega

■ Ytra gæðaeftirlit

- National Centre for Streptococcus, Edmonton, Alberta (International Circumpolar Surveillance, Interlaboratory Streptococcus pneumoniae Serotyping and Antibiotic Susceptibility Testing Quality Control Program)
 - tvisvar á ári

Innra gæðaeftirlit

- **Stofn ATCC 49619**
 - MIC 0.25-1 mg/L
- **Lágum stundum undir 0.25, sjaldan yfir**
- **Allir þættir skoðaðir**
 - Skálapykkt, pH, þéttni bakteríu

Ytra gæðaeftirlit

- Fengum “réttar niðurstöður” þegar um var að ræða stofna með næmi = I (intermediate)
- Fundum ekki ónæma stofna (= R)

Rannsóknarleiðangur

- Niðurstaða fékkst loks
- Sendum stofna til AB Biodisk (E-test)
- Fengum skálar frá AB Biodisk (E-test)
- Annar framleiðandi á agardufti

BBL og Oxoid Mueller-Hinton agar

Difco™ Mueller Hinton Agar

Approximate Formula* Per Liter

Beef Extract Powder	2.0	g
Acid Digest of Casein	17.5	g
Starch	1.5	g
Agar	17.0	g

BBL™ Mueller Hinton II Agar

Approximate Formula* Per Liter

Beef Extract	2.0	g
Acid Hydrolysate of Casein	17.5	g
Starch	1.5	g
Agar	17.0	g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

MUELLER-HINTON AGAR

Code: CM337

An antimicrobial susceptibility testing medium which may be used in internationally recognised standard procedures.

Formula*	gm/litre
Beef, dehydrated infusion from	300.0
Casein hydrolysate	17.5
Starch	1.5
Agar	17.0
pH 7.4 ± 0.2	

* modified to meet performance standards.

Strain no.	BBL-MH	SIR	Oxoid-MH	SIR
IS 1	1.5	R	0.75	I
IS 2	1.5	R	0.75	I
IS 3	1.5	R	0.5	I
IS 4	3	R	1	I
IS 5	1.5	R	0.5	I
IS 6	1.5	R	0.75	I
IS 7	3	R	0.75	I
IS 8	2	R	0.75	I
IS 9	2	R	0.5	I
IS 10	2	R	0.5	I
ATCC 49619	0.5	I	0.25	I

MH OXOID

MH-F BBL-II

Nr.	MIC	SIR	MIC	SIR
27	1	I	3	R
28	1	I	3	R
206	1	I	3	R
345	1	I	3	R
347	1	I	3	R
10	0,032	S	0,094	I
175	0,047	S	0,094	I
303	0,064	S	0,094	I
369	0,047	S	0,094	I
377	0,047	S	0,094	I
420	0,047	S	0,094	I

Hvenær næmispróf?

- Ekki þörf á að gera næmispróf á öllum bakteríum sem vaxa í sýnum frá sjúklingum
- Ekki allar bakteríur meinvaldandi

Hvaða sýklalyf á að prófa?

- Ákvörðun rannsóknarstofunnar í samvinnu við smitsjúkdómalækna og aðgengi að lyfi
- Hvaða baktería
 - ef baktería er eðlislægt ónæm er sýklalyf ekki prófað
- Baktería fjölónæm - bæta við aukalyfjum
- Staðsetningu sýkingar
 - blóðsýking, þvagfærasýking os.frv.
- Staðsetning sjúklings
 - innliggjandi eða heima



Hvers vegna aukið ónæmi?

- Erfðafræðilegur margbreytileiki baktería
- Mikil aukning ferðalaga til framandi slóða
- Of - og misnotkun sýklalyfja
- Skortur á hnitmiðaðri meðferð með sýklalyfjum hjá mikið veikum sjúklingum

EUCAST

- **Einfaldara í framkvæmd**
 - Saltvatn fyrir allar bakteríur
- **Tvenns konar næmisagar**
 - Mueller-Hinton agar
 - Mueller-Hinton agar með blóði
 - Mueller-Hinton agar + 5% defibrinerað hesta-blóð og 20mg/L β -NAD (MH-F)
- **Ath. þó meningókokka, gonokokka og anaeroba**

Bakteríur	Æti
<p>Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophila</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.</p>	Mueller-Hinton agar
<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptococcus groups A, B, C og G Viridans group streptococci <i>Haemophilus</i> spp. <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i></p>	<p>Mueller-Hinton agar + 5% defibrinerað hesta blóð + 20 mg/L β-NAD (MH-F)</p>
Aðrar vandlátar (fastidious) bakteríur	Mismunandi

EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 3.0 valid from 2013-01-01

Enterobacteriaceae

- Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)
- Medium: Mueller-Hinton agar
- Inoculum: McFarland 0.5
- Incubation: Air, $35\pm 1^\circ\text{C}$, $18\pm 2\text{h}$
- Reading: Read zone edges as the point showing no growth viewed from the back of the plate against a black background illuminated with reflected light
- Quality control: *Escherichia coli* ATCC 25922



Streptococcus pneumoniae

- Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)
- Medium: Mueller-Hinton agar + 5% defibrinated horse blood and 20 mg/L β -NAD (MH-F)
- Inoculum: McFarland 0.5 from blood agar or McFarland 1.0 from chocolate agar
- Incubation: 5% CO₂, 35±1°C, 18±2h
- Reading: Read zone edges as the point showing no growth viewed from the front of the plate with the lid removed and with reflected light
- Quality control: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

CLSI

Heimild: 1			Þvermál sónu í mm			MIC viðmið $\mu\text{g/ml}$		
Kóði	E-test	Lyf	R	I	S	R	I	S
AMP10	AM	Ampicillin	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8
CN10	GM low	Gentamicin	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
CXM30	XM	Cefuroxime	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
CRO30	TX	Ceftriaxone	≤ 13	14-20	≥ 21 ≤ 25 ESBL	≥ 64	16-32	≤ 8
SXT25	TS	Trimethoprim /sulfamethoxazole	≤ 10	11-15	≥ 16	$\geq 4/76$	-	$\leq 2/38$

Sónur; $R \leq$
MIC; $R \geq$

EUCAST

Heimild: 1,2			Þvermál sónu í mm			MIC viðmið mg/L		
Kóði	E-test	Lyf	R	I	S	R	I	S
AMP10	AM	Ampicillin	$< 14^A$		$\geq 14^A$	> 8		≤ 8
CN10	GM low	Gentamicin	< 14	14-16	≥ 17	> 4		≤ 2
eCXM30	XM	Cefuroxime (Stungulyf)	< 18		≥ 18	> 8		≤ 8
CRO30	TX	Ceftriaxone	< 20	20-22	≥ 23	> 2		≤ 1
SXT 1.25- 23.75 ³	TS	Trimethoprim /sulfamethoxazole	< 13	13-15	≥ 16	> 4		≤ 2

Sónur; $R <$
MIC; $R >$

Heimasíður

- <http://www.eucast.org/>
- www.nordicast.org





**“It is not difficult to make microbes resistant to penicillin ...
.... The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant.”**
Alexander Fleming's Nobel Lecture, 1945