

A) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Εισαγωγή

Οι πιο σημαντικοί σε διεθνές επίπεδο οργανισμοί για τον έλεγχο της ευαισθησίας των μικροοργανισμών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες και τον ορισμό των ορίων ευαισθησίας και αντοχής υπάρχουν δύο διεθνώς αναγνωρισμένοι οργανισμοί: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) και European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Σε ευρωπαϊκό επίπεδο οι περισσότερες χώρες έχουν πλέον υιοθετήσει τις οδηγίες και τα όρια ευαισθησίας της EUCAST. Η αποδοχή και υιοθέτηση ενός κοινού συστήματος αναφοράς από τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης θα εξασφαλίσει την επικοινωνία σε μια κοινή γλώσσα τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε κλινικό επίπεδο, θα προάγει την επιδημιολογική επιτήρηση και θα συμβάλει στην κατάρτιση κοινών κατευθυντήριων οδηγιών.

Για τους λόγους αυτούς συστάθηκε και στη χώρα μας “Εθνική Επιτροπή Αντιβιογράμματος” (Α1β/ΓΠ: οικ 59315/1-8-2017, απόφ Γ. Γραμμ Υπ Υγείας Γ. Γιαννόπουλου/ΑΔΑ: ΩΠ89465ΦΥΟ-3ΕΠ), η οποία συνήλθε στην 1η της συνεδρίαση τον Δεκέμβριο 2017 και αποφάσισε την εναρμόνιση των εργαστηρίων στις διαδικασίες / οδηγίες και τα κριτήρια της EUCAST.

Σκοπός

Η EUCAST (www.eucast.org) ιδρύθηκε το 1997 με πρωτοβουλία της ESCMID (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases) και το 2002 αναδιοργανώθηκε στην παρούσα της μορφή με τη συμμετοχή 6 εθνικών επιτροπών αντιβιογράμματος (National Antimicrobial Susceptibility Testing Committees, NACs) με βασικό σκοπό την εναρμόνιση των ορίων ευαισθησίας στην Ευρώπη. Από τότε λειτουργεί ως η επίσημη επιτροπή του ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) και της EMA (European Medical Agency) για τον ορισμό των ορίων ευαισθησίας και βρίσκεται υπό την αιγίδα της ESCMID και του ECDC. Χρηματοδοτείται από την ESCMID και το ECDC, ενώ δεν δέχεται επιχορηγήσεις από τη βιομηχανία. Αποτελεί τον επίσημο σύμβουλο και άλλων οργανισμών της ευρωπαϊκής ένωσης, που έχουν σχέση με την υγεία, σε ζητήματα ελέγχου της ευαισθησίας των μικροβίων στις αντιμικροβιακές ουσίες και στην ανίχνευση παραγόντων της μικροβιακής αντοχής που σχετίζονται με τη δημόσια υγεία.

Σύμφωνα με το καταστατικό (EUCAST statutes - τελευταία αναθεώρηση 11-4-2016) έχει ως αντικείμενο, τα εξής:

- Εναρμόνιση των ευρωπαϊκών κλινικών ορίων ευαισθησίας για τα υπάρχοντα αντιμικροβιακά και καθορισμό των κλινικών ορίων για τα νέα σε στενή συνεργασία με το ECDC και την EMA.
- Καθορισμό των επιδημιολογικών ορίων cut-off (ECOFFs ή ECV, epidemiological cut-off values) για βακτήρια και μύκητες σε κάθε αντιμικροβιακό ή αντιμυκητιακό παράγοντα. για την επιτήρηση της αντοχής.
- Ανάπτυξη και προτυποποίηση των μεθοδολογιών του in vitro ελέγχου της ευαισθησίας των μικροβίων και προώθηση της διασφάλισης της ποιότητας στις αντίστοιχες μεθοδολογίες.
- Εκπαίδευση στα ζητήματα ελέγχου της ευαισθησίας (εθνικά και διεθνή workshops).
- Σύμπραξη με άλλους διεθνείς φορείς, όπως το CLSI, για συναίνεση σε θέματα ελέγχου της ευαισθησίας και στη θέσπιση κοινών ορίων σε διεθνές επίπεδο.

Η EUCAST δεν ασχολείται με τον έλεγχο των λοιμώξεων, με πολιτικές χρήσης αντιβιοτικών, ούτε με την επιτήρηση της μικροβιακής αντοχής.

Δομή και λειτουργία

Διοικείται από μια **Οργανωτική Επιτροπή (Steering Committee, SC)**, η οποία λαμβάνει τις τελικές αποφάσεις με τη διαδικασία της συναίνεσης. Προτάσεις, προσωρινές αποφάσεις και σχέδια εγγράφων υποβάλλονται για διαβούλευση στη **Γενική Επιτροπή (General Committee, GC)**.

Η **SC** απαρτίζεται από ένα 4μελές προεδρείο (πρόεδρος, επιστημονικός γραμματέας, συντονιστής κλινικών δεδομένων και συντονιστής τεχνικών δεδομένων με 2ετή θητεία, το οποίο ορίζεται από την ESCMID), από εκπροσώπους εθνικών επιτροπών (σήμερα συμμετέχουν εκπρόσωποι της Γαλλίας, Γερμανίας, Νορβηγίας, Σουηδίας, Ολλανδίας, και Ηνωμένου Βασιλείου) και 2-4 εκπροσώπους από άλλες ευρωπαϊκές

χώρες που συμμετέχουν στην GC (σήμερα συμμετέχουν εκπρόσωποι της Τουρκίας και της Κροατίας) και οι οποίοι εναλλάσσονται ανά διετία. Επίσης, ως παρατηρητές συμμετέχουν εκπρόσωποι του ECDC και της EMA.

Τα μέλη της SC δηλώνουν στο προεδρείο κατά την έναρξη της θητείας τους τα εμπορικά συμφέροντα, που μπορεί να έχουν με φαρμακευτικές ή άλλες εταιρείες του χώρου, και αποχωρούν από συζητήσεις θεμάτων, τα οποία σχετίζονται με αντίστοιχα συμφέροντα (αυτό καταγράφεται και στα πρακτικά).

Η SC συνεδριάζει τακτικά 4-5 φορές το χρόνο. Τα πρακτικά των συνεδριάσεων, αφού επικυρωθούν από τα μέλη στην επόμενη συνεδρίαση, δημοσιεύονται περιληπτικά στην ιστοσελίδα www.eucast.org. Η προετοιμασία των πρακτικών περιγράφεται αναλυτικά στο SOP 7.0 Preparation and handling of EUCAST minutes (22-1-2014). Εμπιστευτικά δεδομένα που αφορούν νέα αντιβιοτικά δεν δημοσιεύονται μέχρι να ολοκληρωθεί η σχετική διαδικασία σε συνεργασία με την EMA, η οποία είναι υπεύθυνη για την επιστημονική εκτίμηση και έγκριση των φαρμάκων στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Η GC απαρτίζεται από το ίδιο 4μελές προεδρείο (για να είναι εφικτή η σύνδεση με την SC), και έχει εκπροσώπους από όλες τις ευρωπαϊκές χώρες, αλλά και από χώρες εκτός Ευρώπης που ενδιαφέρονται να υιοθετήσουν τις οδηγίες της EUCAST, όπως Τουρκία, Ρωσία, Αυστραλία (εφαρμόζει ήδη από το 2012 τα όρια της EUCAST), Κίνα, Ισραήλ, Μάλτα, Μαρόκο, Ν. Αφρική, Βραζιλία, Καναδάς, USA (USCAST, United States Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013, υποστηρίζεται από διάφορες επιστημονικές εταιρείες και μεταξύ αυτών από την International Society of Infectious Diseases). Μέλη της είναι φυσικά το ECDC και η EMA, και επιπλέον συμμετέχουν εκπρόσωποι της FESCI (Federation of European Societies of Chemotherapy and Infection) και της ISC (International Society for Chemotherapy).

Η GC συνεδριάζει ανοικτά μια φορά το χρόνο στα πλαίσια του European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMIC). Τα πρακτικά των συνεδριάσεων, αφού επικυρωθούν, δημοσιεύονται στο διαδίκτυο www.eucast.org.

Επιπλέον, η SC απευθύνεται μέσω 3 “**email networks**” σε:

- μεμονωμένους επιστήμονες ή φορείς ειδικούς στο πεδίο των λοιμώξεων και της μικροβιολογίας,
- φαρμακευτικές βιομηχανίες και
- εταιρείες που κατασκευάζουν αυτοματοποιημένα AST μηχανήματα ή παράγουν υλικά σχετικά με τον έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, προκειμένου να εκφράσουν τη γνώμη τους στα προτεινόμενα σχέδια.

Επιμέρους ζητήματα επεξεργάζονται διάφορες υποεπιτροπές εργασίας. Οι υποεπιτροπές “Anaerobes”, “Expert rules” και “Detection of resistance mechanisms of clinical and/or public health importance” αφού ολοκλήρωσαν το έργο τους καταργήθηκαν. Σήμερα λειτουργούν 5 υποεπιτροπές, οι εξής:

1. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST AFST), 2002.
2. Veterinary Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing (VetCAST), 2015.
3. Subcommittee on the role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing, 2015
4. Subcommittee on antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteria.
5. Subcommittee on MIC distributions and the setting of ECOFFs.

Η δομή και λειτουργία των οργάνων της EUCAST (SC, SG, NACs, υποεπιτροπές) περιγράφεται αναλυτικά στα EUCAST Standard Operation Procedures (SOPs) Committees and Subcommittees 5.1/3-1-2017 και Interaction with NAQs 5/3-1-2013.

Το website www.eucast.org διευθύνεται από την EUCAST και την ESCMID, λειτουργεί σύμφωνα με το EUCAST SOP Organization and maintenance of EUCAST website 6.1/3-1-2017 και δημοσιεύει δωρεάν και ελεύθερα όλα τα έγγραφα και εγχειρίδια της EUCAST. Τα έγγραφα μεταφράζονται συνεχώς σε όλο και περισσότερες γλώσσες, ήδη είναι μεταφρασμένα σε: γερμανικά, ιταλικά, ισπανικά, γαλλικά, τσέχικα, τούρκικα, κινέζικα και στις σκανδιναυικές γλώσσες.

Επιδημιολογικά και Κλινικά Όρια ευαισθησίας / αντοχής

Στο σύστημα της EUCAST καθορίζονται δύο κατηγορίες ορίων εκτίμησης της ευαισθησίας: τα επιδημιολογικά όρια (Epidemiological cut-off, ECOFFs), και τα κλινικά όρια ευαισθησίας S και αντοχής R (Clinical Breakpoints, CBPs).

Επιδημιολογικό όριο (Epidemiological cut-off, ECOFF): είναι η τιμή της MIC ενός αντιβιοτικού στο υπό εξέταση μικροοργανισμό, η οποία διαχωρίζει τον **Wild Type** (WT, φυσικός μικροβιακός πληθυσμός χωρίς επίκτητο ή μεταλλακτικό μηχανισμό αντοχής) από τον **Non Wild Type** φαινότυπο (NWT, μικροβιακός πληθυσμός με επίκτητο ή μεταλλακτικό μηχανισμό αντοχής).

Ως ECOFF επομένως, ορίζεται η μέγιστη MIC στην οποία ο μικροοργανισμός είναι στην WT μορφή του και εκφράζεται ως: **$WT \leq X \text{mg/L}$** ή μεταφρασμένο σε ζώνη αναστολής (μέθοδος διάχυσης των δίσκων) **$WT \geq Y \text{mm}$** .

Ο καθορισμός του ECOFF βασίζεται στην ανάλυση μεγάλων κατανομών MICs για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Οι κατανομές MICs (σε μορφή πίνακα και ιστογράμματος) περιλαμβάνουν δεδομένα από όλο τον κόσμο, από διαφορετικές χρονικές περιόδους (1950 -) και από πολλαπλές πηγές, αφορούν πολλούς συνδυασμούς αντιβιοτικού και μικροοργανισμού και δημοσιεύονται σε ξεχωριστή ιστοσελίδα <http://mic.eucast.org/eucast2/>.

Το επιδημιολογικό όριο αποτελεί δείκτη με βιολογική αξία (είναι φυσικό και σταθερό μέγεθος), αλλά και επιδημιολογική αξία, γιατί βοηθάει στην παρακολούθηση ανάπτυξης αντοχής με την έγκαιρη ανίχνευση μικροοργανισμών με νέους μηχανισμούς αντοχής.

Κλινικά όρια ευαισθησίας S ή αντοχής R (clinical breakpoints): σχετίζονται με τα επίπεδα του αντιβιοτικού στο αίμα (φαρμακοκινητικές / φαρμακοδυναμικές παράμετροι, PK/PD), επομένως εξαρτώνται από το δοσολογικό σχήμα και την οδό χορήγησης.

Προσδιορίζονται από ευρείες κατανομές MICs, μεγάλες κλινικές μελέτες (σύγκριση τιμής MIC και θεραπευτικού αποτελέσματος), και PK (Cmax, Cmin, AUC, T1/2, Protein binding, total body clearance, volume of distribution) και PD παραμέτρους (%T>MIC, AUC/MIC value, Cmax/MIC). Η φαρμακοκινητική μελετά το “τι κάνει το σώμα στο φάρμακο – απορρόφηση, απελευθέρωση, κατανομή, μεταβολισμός, αποβολή – concentration vs time”. Η φαρμακοδυναμική μελετά το “τι κάνει το φάρμακο στο μικροοργανισμό – concentration vs effect”. Χρησιμοποιώντας το μαθηματικό μοντέλο “Monte Carlo Simulation” τα PK/PD δεδομένα αναλύονται, ώστε να υπολογιστούν οι πιθανότητες επίτευξης του στόχου (Probabilities of Target Attainment, PTA) σε διαφορετικές τιμές MIC.

Τα κλινικά όρια καθορίζονται από το αποτέλεσμα στον άνθρωπο, αποτελούν δείκτη με κυρίως κλινική αξία και μπορεί να αλλάξουν ανάλογα με τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα.

Το κλινικό όριο ευαισθησίας δεν πρέπει να διασπά τον WT πληθυσμό. Διαχωρίζουν τα κλινικώς ευαίσθητα (S) από τα ανθεκτικά (R) και εκφράζονται ως **MIC: $S \leq X \text{mg/L}$ και $R > Y \text{mg/L}$** ή μεταφρασμένο σε **ζώνη αναστολής: $S \geq X \text{mm}$ και $R < Y \text{mm}$** .

Τα κλινικά όρια ευαισθησίας και αντοχής χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια κλινικής μικροβιολογίας για να ταξινομήσουν τους μικροοργανισμούς σε 3 βασικές κατηγορίες [κλινικά ευαίσθητα (S), μετρίως ευαίσθητα (IS) ή ανθεκτικά (R)], με βάση την “ποσοτική” ευαισθησία του μικροοργανισμού στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, όπως αυτή προσδιορίζεται από την τιμή της MIC. Η κατηγοριοποίηση αυτή (S, I, ή R) απεικονίζεται στο αντιβιογράμμα, το οποίο καθοδηγεί τον κλινικό γιατρό στη θεραπευτική αγωγή.

Σύμφωνα με τη EUCAST (χωρίς να υπάρχει ουσιαστική διαφορά με το CLSI) ένα στέλεχος ορίζεται ως κλινικά:

- **Ευαίσθητο (S)** σε ένα αντιβιοτικό, αν η χορήγηση του αντιβιοτικού αυτού ακολουθείται από πολύ μεγάλη πιθανότητα επιτυχούς θεραπείας.
- **Ανθεκτικό (R)** σε ένα αντιβιοτικό, αν η χορήγηση του αντιβιοτικού αυτού ακολουθείται από πολύ μεγάλη πιθανότητα αποτυχίας της θεραπείας.
- **Ενδιάμεσης ευαισθησίας (I)** σε ένα αντιβιοτικό, αν με την χορήγηση αυτού αναμένεται αβέβαιο θεραπευτικό αποτέλεσμα, ή αν μπορεί να υπάρχει θεραπευτικό αποτέλεσμα είτε με μεγάλες δόσεις του αντιβιοτικού, είτε με υψηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού στην εστία της λοίμωξης λόγω φαρμακοκινητικής (πχ β-λακταμικά / ουρολοίμωξη). Επίσης η κατηγορία αυτή υποδεικνύει μια γκριζα ζώνη χρήσιμη για την ελαχιστοποίηση τεχνικών σφαλμάτων.

Για λόγους απλοποίησης των εκδόσεων της EUCAST ο όρος ενδιάμεση ευαισθησία (I) απαλείφεται, είτε πρόκειται για ζώνες αναστολής (mm) είτε για MIC (mg/L), μεταξύ S (ευαίσθητων) και R (ανθεκτικών) ορίων. πχ όταν τα όρια ευαισθησίας (MIC) είναι: $S \leq 1 \text{mg/L}$ και $R > 8 \text{mg/L}$, το I είναι $2-8 \text{mg/L}$ ή όταν $S \geq 22 \text{mm}$ και $R < 18 \text{mm}$, το I είναι $21-18 \text{mm}$.

Ο ορισμός των ορίων ευαισθησίας των νέων αντιβιοτικών είναι μια διαδικασία διάρκειας 150 ημερών, η οποία διεξάγεται μεταξύ τριών εταιρών: της EUCAST, της EMA / CHMP (EMA Committee for Medicinal Products for Human Use), και της αντίστοιχης φαρμακευτικής εταιρείας. Θέση - κλειδί στην όλη διαδικασία έχει η Οργανωτική Επιτροπή (SG). Η όλη διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο Setting breakpoints for new antimicrobial agents EUCAST SOP 1.2/3-1-2017 και είναι εμπιστευτική. Ο ρόλος της EUCAST στον ορισμό των ορίων ευαισθησίας αποτελεί μέρος της επίσημης διαδικασίας της EMA για την έγκριση και κυκλοφορία νέων αντιβιοτικών στην Ευρώπη (EMA SOP/H/3043).

Για την **εναρμόνιση των υπάρχοντων ορίων ευαισθησίας** μεταξύ των Εθνικών Επιτροπών και την **αναθεώρηση** αυτών, όταν προκύπτουν αλλαγές ως προς τις κλινικές ενδείξεις, το μικροβιολογικό φάσμα, τους μηχανισμούς αντοχής, τα δοσολογικά σχήματα και τη μορφή του αντιβιοτικού (ενέσιμο / per os), επιδιώκεται συναίνεση μέσω διαλόγου και συσκέψεων της Οργανωτικής με τις Εθνικές Επιτροπές, αλλά και της Γενικής Επιτροπής στη συνέχεια, με μια διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στο Harmonization breakpoints for existing antimicrobial agents EUCAST SOP 2.2/3-1-2017 και στο Review and Revisions of breakpoints EUCAST SOP 3.1/7-10-2015, αντίστοιχα.

Στην αρχή της διαδικασίας προτείνονται για διαβούλευση από την SC στις NACs τα **προκαταρκτικά όρια (preliminary)**, προκειμένου να διαμορφωθούν τα **προσωρινά όρια (tentative)**, τα οποία θα τεθούν σε μια ευρύτερη διαβούλευση με τις NACs, την GC, τα "email networks" και θα αναρτηθούν τον Δεκέμβριο για σχολιασμό στην ιστοσελίδα www.eucast.org. Τέλος με τη διαδικασία της συναίνεσης εγκρίνονται τα **τελικά όρια (final)**, τα οποία και δημοσιεύονται στην ιστοσελίδα στις αρχές Ιανουαρίου κάθε χρόνου.

Η δημοσίευση των τελικών ορίων στην ιστοσελίδα συνοδεύεται από ένα σχετικό έγγραφο / δικαιολογητικό (Rationale EUCAST document), το οποίο αναφέρει όλα τα απαραίτητα στοιχεία για το αντιβιοτικό (σύνθεση, αντιμικροβιακό φάσμα, κλινικές ενδείξεις, δοσολογικό σχήμα, κατανομές MICs, εθνικά όρια ευαισθησίας πριν την εναρμόνιση, PK/PD χαρακτηριστικά, προσομοιώσεις Monte Carlo – PK/PD, και κλινικά δεδομένα). Αν μια NAC διαφωνεί με τα καθορισμένα όρια, στο ίδιο έγγραφο αναφέρεται και το σκεπτικό της διαφωνίας της. Αν κριθεί σκόπιμο ένα συνοπτικό έγγραφο (EUCAST Technical Note, ENT) δημοσιεύεται στο Clinical Microbiology and Infection (CMI).

Στην ιστοσελίδα της EUCAST μπορεί ελεύθερα να βρεί κανείς σε πίνακες "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>" όλα τα όρια ευαισθησίας και αντοχής, σε μορφή pdf, αλλά και excel, για να διαμορφώσει το κάθε εργαστήριο τους δικούς του πίνακες, ανάλογα με τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιεί.

Οι πίνακες ανανεώνονται κάθε Ιανουάριο και αφορούν: Enterobacterales, Pseudomonas spp., Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia, Acinetobacter spp., Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Group A,B,C,G streptococci, Streptococcus pneumoniae, viridans group streptococci, Haemophilus spp., Moraxella catarrhalis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Corynebacterium spp, Clostridium difficile, Gram-positive anaerobes, Gram-negative anaerobes, Helicobacter pylori, Listeria monocytogenes, Pasteurella multocida, Campylobacter jejuni and Campylobacter coli, Kingella kingae, Aerococcus sanguinicola και urinae, Aeromonas spp, Mycobacterium tuberculosis και τοπικά αντιβιοτικά.

Οι συμβολισμοί που υπάρχουν στους πίνακες των ορίων ευαισθησίας επεξηγούνται αναλυτικά στον οδηγό ανάγνωσης "Guidance on reading EUCAST breakpoint Tables" (Εικόνα 4). Ότι γράφεται με κίτρινο σημαίνει "αλλαγή", ότι γράφεται με μπλέ σημαίνει ότι μπορείς να "κλικάρεις και να κάνεις διασύνδεση" με το σχετικό έγγραφο. Άλλοι συμβολισμοί είναι οι παρακάτω:

– «-»: το μικρόβιο δεν είναι καλός στόχος για το αντιβιοτικό, γι' αυτό θεωρείται αναποτελεσματικό για κλινική χρήση, πχ αζτρεονάμη / εντερόκοκκος. Επομένως δεν συνιστάται έλεγχος ευαισθησίας..

- «NA»: non applicable, μη εφαρμόσιμο, πχ screening με ναλιδιξικό στον εντερόκοκκο για τις φθοροκινολόνες.
- «IP»: in preparation, σε προετοιμασία, πχ σιπροφλοξακίνη / εντερόκοκκος.
- «IE»: insufficient evidence, δεν υπάρχουν επαρκή αποδεικτικά στοιχεία ότι ο μικροοργανισμός είναι καλός στόχος για το υπό εξέταση αντιβιοτικό, πχ νταπτομυκίνη / εντερόκοκκος. Μπορεί να αναφερθεί η MIC χωρίς κατηγοριοποίηση ως S / I / R.
- **S \geq 50mm ή \leq 0.002mg/L**: πρακτικά σημαίνει ότι δεν υπάρχουν ευαίσθητα στελέχη, δηλ ακόμη και τα WT στελέχη είναι μετρίως ευαίσθητα, πχ τριμεθοπρίμη / εντερόκοκκος.

Η EUCAST προτείνει το ερμηνευτικό διάβασμα του αντιβιογράμματος με βάση τη:

- Γνώση της φυσικής αντοχής
- Αναγνώριση των σπάνιων φαινοτύπων αντοχής
- Χρήση των ερμηνευτικών κανόνων (Expert rules)

Οι ερμηνευτικοί κανόνες “Expert Rules” στηρίζονται σε κλινικά και λογικά δεδομένα, όπως και στη γνώση συγκεκριμένων μηχανισμών επίκτητης ή ενδογενούς αντοχής των μικροβίων και ταξινομούνται σε 3 επίπεδα τεκμηρίωσης, ανάλογα με το αν υπάρχουν:

- Επαρκείς κλινικές ενδείξεις (επίπεδο A), που δείχνουν ότι αν δοθεί το αντιβιοτικό ως ευαίσθητο θα οδηγήσει σε θεραπευτική αποτυχία.
- Ανεπαρκείς κλινικές ενδείξεις και πειραματικά μοντέλα (επίπεδο B), που δείχνουν ότι αν δοθεί το αντιβιοτικό ως ευαίσθητο ενδέχεται να οδηγήσει σε θεραπευτική αποτυχία.
- Καμία κλινική ένδειξη, αλλά μόνο μικροβιολογικά δεδομένα (επίπεδο C), που δείχνουν ότι πρέπει να αποθαρρυνθεί η θεραπευτική χρήση του αντιβιοτικού.

Αναλυτικά περιγράφονται στο: Leclercq R, et al EUCAST expert rules in Antimicrobial Susceptibility Testing, Clin Microbiol and Infect 2013; 19:141-160.

Το Δεκέμβριο του 2013 εκδόθηκε από την EUCAST το ηλεκτρονικό εγχειρίδιο «EUCAST, guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance», στο οποίο περιέχονται οδηγίες για τις προτεινόμενες μεθόδους ανίχνευσης μηχανισμών αντοχής και το 2016 εκδόθηκε και το EUCAST Expert rules, intrinsic resistance and exceptional phenotypes v 3.1 (Sept 27, 2016)

Διαδικασίες προσαρμογής στη EUCAST

Η πλειονότητα των μικροβιολογικών εργαστηρίων ακολουθεί τις οδηγίες του Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) των ΗΠΑ. Η υιοθέτηση του ευρωπαϊκού συστήματος European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) προϋποθέτει την εναρμόνιση των υφιστάμενων διαδικασιών στις οδηγίες του νέου συστήματος.

Συγκεκριμένα:

1. Αγορά κατάλληλων θρεπτικών υλικών και δίσκων αντιβιοτικών,
2. Αλλαγή του λογισμικού των αυτόματων μηχανημάτων ελέγχου του αντιβιογράμματος
3. Επίλυση διοικητικών θεμάτων (προσαρμογή διαγωνισμών / γραφείο προμηθειών)
4. Εκπαίδευση του ιατρικού και τεχνολογικού προσωπικού του εργαστηρίου και ενημέρωση κλινικών ιατρών

Οι διαδικασίες προσαρμογής στις οδηγίες της EUCAST, απαιτούν:

A. Βούληση: Αρχικά απαιτείται η βούληση του εργαστηρίου για προσαρμογή στις διαδικασίες του EUCAST.

B. Εκπαίδευση: Η εκπαίδευση του προσωπικού πρέπει να γίνεται σταδιακά καθημερινά και με υπομονή.

Γ. Ορισμός υπευθύνου: Ανατίθεται σε ένα άτομο η ευθύνη και ο συντονισμός των απαραίτητων διαδικασιών για την προσαρμογή στο νέο σύστημα.

Ανασκοπούνται οι τρέχουσες μεθοδολογίες που εφαρμόζει το εργαστήριο και επισημαίνονται οι ομοιότητες και οι διαφορές. Στις τελευταίες θα πρέπει να ακολουθήσει σχολαστική εκπαίδευση του προσωπικού.

Γίνεται έλεγχος του υπάρχοντος πληροφοριακού συστήματος (Laboratory Information System, LIS) και διασφαλίζεται η προμήθεια των απαραίτητων υλικών για την υλοποίηση της αλλαγής. Η έγγραφη δήλωση της εταιρείας που διαθέτει αυτόματο ή ημιαυτόματο αναλυτή προσδιορισμού του αντιβιογράμματος, ότι έχει εναρμονιστεί με τις οδηγίες EUCAST, διευκολύνει τις διαδικασίες στην προσαρμογή στις νέες απαιτήσεις.

Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται σε διοικητικά θέματα, όταν αυτά άπτονται σε δικαιοδοσίες - ενημέρωση άλλων υπηρεσιών, επί παραδείγματι τμήματος προμηθειών. Τέλος στοχοθετώντας με χρονοδιαγράμματα τις διαδικασίες που προαναφέρθηκαν, ορίζεται η πιθανή ημερομηνία της αλλαγής από το ένα σύστημα στο άλλο.

Μέθοδος διάχυσης του αντιβιοτικού στο άγαρ (Kirby Bauer)
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Publications/Disk_diffusion_paper_printed_version_March_2014.pdf

Θρεπτικό υλικό

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας των μικροβίων στους αντιμικροβιακούς παράγοντες με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων χρησιμοποιούνται δύο θρεπτικά υλικά:

1. Mueller Hinton Agar (MHA), ίδιο με εκείνο που χρησιμοποιούσαμε μέχρι τώρα ακολουθώντας τις οδηγίες του CLSI, για τους μη απαιτητικούς μικροοργανισμούς: Enterobacteriales, Pseudomonas spp., Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia, Acinetobacter spp., Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Aeromonas spp.

2. MH-Fastidious (MHF), MHA εμπλουτισμένο με μηχανικά απινιδωμένο αίμα αλόγου (Horse Blood, HB) σε αναλογία 5% και διάλυμα β-NAD σε αναλογία 0,1% για τους απαιτητικούς μικροοργανισμούς: Group A,B,C,G streptococci, Streptococcus pneumoniae, viridans group streptococci, Haemophilus spp., Moraxella catarrhalis, Neisseria meningitidis, Listeria monocytogenes, Corynebacterium spp, Campylobacter jejuni and Campylobacter coli, Kingella

Έτοιμα τρυβλία MHA και MH-F διατίθενται στην αγορά.

Δεν έχουν καθοριστεί όρια ευαισθησίας με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων παρά μόνο με προσδιορισμό των MICs για το Clostridium difficile, Gram-positive anaerobes, Gram-negative anaerobes, και το Helicobacter pylori

Δίσκοι αντιβιοτικών

Υπάρχουν κάποιες διαφορές στις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών σε σχέση με το CLSI. Σκόπιμη είναι η επιμονή στην εκπαίδευση σε αυτό το σημείο του προσωπικού.

Οι δίσκοι των αντιβιοτικών φυλάσσονται σε ειδικούς περιέκτες που συνοδεύονται με αφυγραντική ουσία προστατευόμενοι από το φως. Μερικά αντιβιοτικά όπως η μετρονιδαζόλη, η χλωραμφαινικόλη και οι φθοριοκινολόνες αδρανοποιούνται όταν εκτίθενται για μεγάλο χρονικό διάστημα στο φως. Τα δισκία συντηρούνται σε θερμοκρασίες από -200C σε non-frost καταψύκτες ή αν αυτό δεν είναι δυνατόν σε θερμοκρασία <80C, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Τα δισκία μεταφέρονται από το ψυγείο ή το καταψύκτη 1-2 ώρες πριν από τη χρήση τους. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ημερομηνία λήξης ή τυχόν αδρανοποίηση τους. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των δίσκων μεταξύ της EUCAST και του CLSI φαίνονται στον επόμενο πίνακα:

- Benzylpenicillin 1 unit αντί για 10 units
- Ampicillin 2 και 10 μg αντί για 10 μg
- Amoxicillin-clavulanate 2-1 και 20-10 μg αντί για 20-10 μg
- Piperacillin 30 μg αντί για 100 μg
- Piperacillin-tazobactam 30-6 μg αντί για 100-10 μg
- Cefotaxime 5 μg αντί για 30 μg

Ceftaroline 5 µg αντί για 30 µg

Ceftazidime 10 µg αντί για 30 µg

Netilmicin 10 µg αντί για 30 µg

Gentamicin 30 µg αντί για 120 µg (για HLAR, high-level aminoglycoside resistance)

Vancomycin 5 µg αντί για 30 µg

Linezolid 10 µg αντί για 30 µg

Nitrofurantoin 100 µg αντί για 300 µg

Amp 2µg για *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* and *viridans streptococci*.

Amox/clav 2–1 µg για *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Pasteurella multocida*.

Μικροβιακό ενοφθάλμισμα (inoculum)

Μικροβιακό εναιώρημα θολερότητας 0,5 MacFarland (1-2 X 10⁸ CFU/ml), αφού ελεγχθεί σε θολοσίμετρο ή φωτόμετρο ή συγκριθεί με την πρότυπη κλίμακα MacFarland, ενοφθαλμίζεται στο τρυβλίο και επωάζεται στις συνθήκες και για το χρονικό διάστημα που προτείνεται από την EUCAST. Εάν ο *S.pneumoniae* έχει απομονωθεί σε σοκολατόχρωμο άγαρ, τότε απαιτείται θολερότητα ίση με 1 MacFarland για την ετοιμασία του εναιωρήματος.

Γενικά, τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία ΜΗΑ επωάζονται στους 35±10C σε αερόβιες συνθήκες για 16-20 ώρες (24 ώρες για τα γλυκοπεπτίδια στους εντεροκόκκους), ενώ τα ΜΗF επωάζονται στους 35±1 0C σε συνθήκες CO₂ 5±1% για 16-20 ώρες. Τα *Campylobacters* επωάζονται σε 41±10C για 24-48 ώρες.

Ιδανικά θα πρέπει τα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στην προετοιμασία του μικροβιακού εναιωρήματος, τον εμβολιασμό του στο ΜΗΑ ή ΜΗF, την εφαρμογή των δίσκων και την τοποθέτηση των αντιβιογραμμάτων στον επωαστικό κλίβανο να μην υπερβαίνουν τα 15 λεπτά. Μνημοτεχνικά για διευκόλυνση εφαρμόζεται ο κανόνας 15-15-15 και προτείνεται η κατά ομάδες προετοιμασία των αντιβιογραμμάτων, προκειμένου να τηρούνται οι απαιτούμενοι χρόνοι.

Ανάγνωση αποτελέσματος

Γίνεται μετά από τον προτεινόμενο χρόνο επώασης για κάθε μικροοργανισμό. Αντιβιογράμματα που ελέγχονται σε ΜΗΑ «διαβάζονται» με τη βοήθεια προσπίπτοντος φωτισμού, ενώ όσα ελέγχονται σε ΜΗ-F «διαβάζονται» με διερχόμενο φωτισμό. Η ζώνη αναστολής της Linezolid και Benzylpenicillin για τους *Staphylococci* και Vancomycin για τους *Enterococci* «διαβάζονται» με διερχόμενο φωτισμό.

Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας των αποτελεσμάτων του αντιβιογράμματος

Γίνεται τηρώντας τις παραπάνω διαδικασίες με τα πρότυπα στελέχη. Η αγορά των προτύπων στελεχών πραγματοποιείται από αξιόπιστη εταιρεία του εμπορίου. Η ανασύσταση τους γίνεται ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Φυλάσσονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε κατάλληλο υλικό συντήρησης (Tryptic soy broth +15% glycerol, ή Brucella broth + 15% glycerol κατά προτίμηση σε φιαλίδια τύπου cryovials τα οποία φέρουν μικρά πλαστικά σφαιρίδια) σε θερμοκρασίες από - 20 για τα μη απαιτητικά μικρόβια μέχρι -70°C για τα απαιτητικά.

Ο έλεγχος ποιότητας του θρεπτικού υλικού που παρασκευάζεται στο εργαστήριο ή παραλαμβάνεται έτοιμο σε τρυβλία από το εμπόριο (κάθε νέα παρτίδα), αλλά και ο έλεγχος της όλης διαδικασίας της μεθόδου διάχυσης των δίσκων γίνεται με τα ακόλουθα πρότυπα στελέχη:

E. coli ATCC 25922 (wt),

P. aeruginosa ATCC 27853 (wt)

S. aureus ATCC 29213 (weak β-lactamase producer)

E. faecalis ATCC 29212 (wt)

S. pneumoniae ATCC 49619 (Penicillin low – level resistance)

H. influenzae ATCC 49766

C. jejuni ATCC 33560

Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης αντιβιοτικού –μέθοδος διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης αντιβιοτικού.

Οι διαδικασίες συλλογής αποικιών - ετοιμασίας ενοφθαλμίσματος- εφαρμογής στα τρυβλία είναι ίδιες με αυτές που ισχύουν σήμερα σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστριών εταιρειών. Σύμφωνα με δήλωσή τους έχουν προσαρμόσει και ελέγξει ταινίες με διαβαθμισμένη συγκέντρωση αντιβιοτικού σε MHA και MHF.

Αυτόματα συστήματα ανάγνωσης του αντιβιογράμματος

Οι εταιρείες που διαθέτουν αυτόματα ή ημιαυτόματα συστήματα ανάγνωσης του αντιβιογράμματος δηλώνουν εναρμόνιση με τις οδηγίες EUCAST.

Πρακτικές οδηγίες εκπαίδευσης του προσωπικού του εργαστηρίου για τον έλεγχο του αντιβιογράμματος κατά EUCAST

Προτείνεται η σταδιακή εκπαίδευση του προσωπικού ως εξής: **α)** επιλογή δύο προτύπων μικροοργανισμών π.χ. E. coli ATCC 25922 και S.aureus ATCC 29213. **β)** επιλογή τεσσάρων αντιβιοτικών ελέγχου. Τα αντιβιοτικά που θα επιλεγούν πρέπει να δίνουν σαφείς ζώνες αναστολής χωρίς δυσκολίες (π.χ. λεπτή ζώνη αναστολής μέχρι το δίσκο ή ανάπτυξη αποικιών μέσα στη ζώνη αναστολής), **γ)** εφαρμογή αντιβιογράμματος για τρεις συνεχείς ημέρες, **δ)** καταγραφή αποτελεσμάτων, σύγκριση με τις αναμενόμενες ζώνες αναστολής, **ε)** συζήτηση των προβλημάτων. Επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία (α - ε) αρχικά για άλλα δύο πρότυπα στελέχη π.χ. P.aeruginosa ATCC 27853 και E.faecalis 29212 και τέλος για τα πρότυπα στελέχη H.influenzae ATCC 49766 και S.pneumoniae ATCC 49619. Σιγά – σιγά με αυτόν τον τρόπο εκπαιδεύεται όλο το προσωπικό στην ανάγνωση των ζωνών αναστολής και εξοικειώνεται με τη χρήση του προσπίπτοντος ή διερχόμενου φωτισμού. Ακολουθεί η εκπαίδευση στην προετοιμασία του μικροβιακού εναιωρήματος αυστηρά με τη χρήση του θολοσιμέτρου ή της πρότυπης καμπύλης MacFarland.

B) ΠΙΝΑΚΕΣ ΜΕ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΟΡΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ/ΑΝΤΟΧΗΣ EUCAST 2018

Σχετικοί πίνακες παρατίθενται στο παράρτημα το οποίο αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του πρακτικού της Εθνικής Αντιβιογράμματος και της εισήγησης της Εκτελεστικής Επιτροπής (παράρτημα).