

**Методы идентификации
механизмов
резистентности в условиях
ограниченных ресурсов**

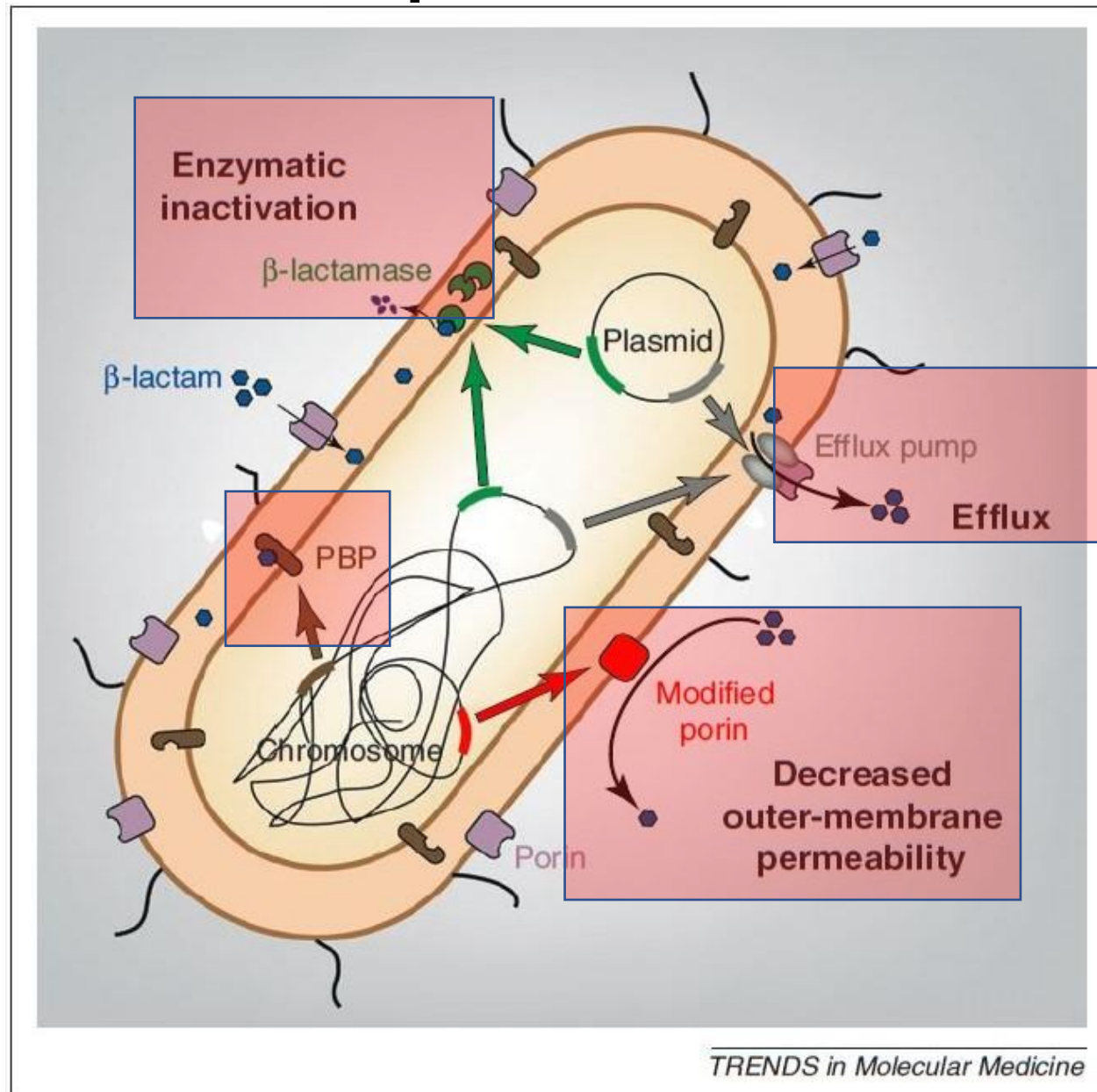
Жазыхбаева Д.М.
MD, MSc in Medical
microbiology



Механизмы резистентности у грамотрицательных бактерий

- 1.Изменение проницаемости мембраны
- 2.Экспульсия антибиотиков
- 3.Изменение целевого белка: мутации в генах, кодирующих целевые белки, такие как ферменты, рибосомы и ДНК-зависимые РНК-полимеразы могут сделать их менее чувствительными к антибиотикам.
- 4.Изменение антибиотика: некоторые бактерии могут вырабатывать ферменты, которые могут изменять структуру антибиотиков, делая их менее эффективными.
- 5.Альтернативные метаболические пути: некоторые бактерии могут использовать альтернативные метаболические пути, которые не зависят от целевого белка антибиотика.
- 6.Горизонтальный перенос генов резистентности: генетический материал, содержащий гены резистентности, может передаваться между бактериями через плазмиды, транспозоны или интегроны.

Основной встречающийся синдром резистентности у грамотрицательных бактерий: Устойчивость к бета-лактамам



Бета-лактамазы у грамотрицательных бактерий

Бетта-лактамазы - это ферменты, которые разрушают бетта-лактамное кольцо в молекуле антибиотика бетта-лактамного класса, таких как пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы.

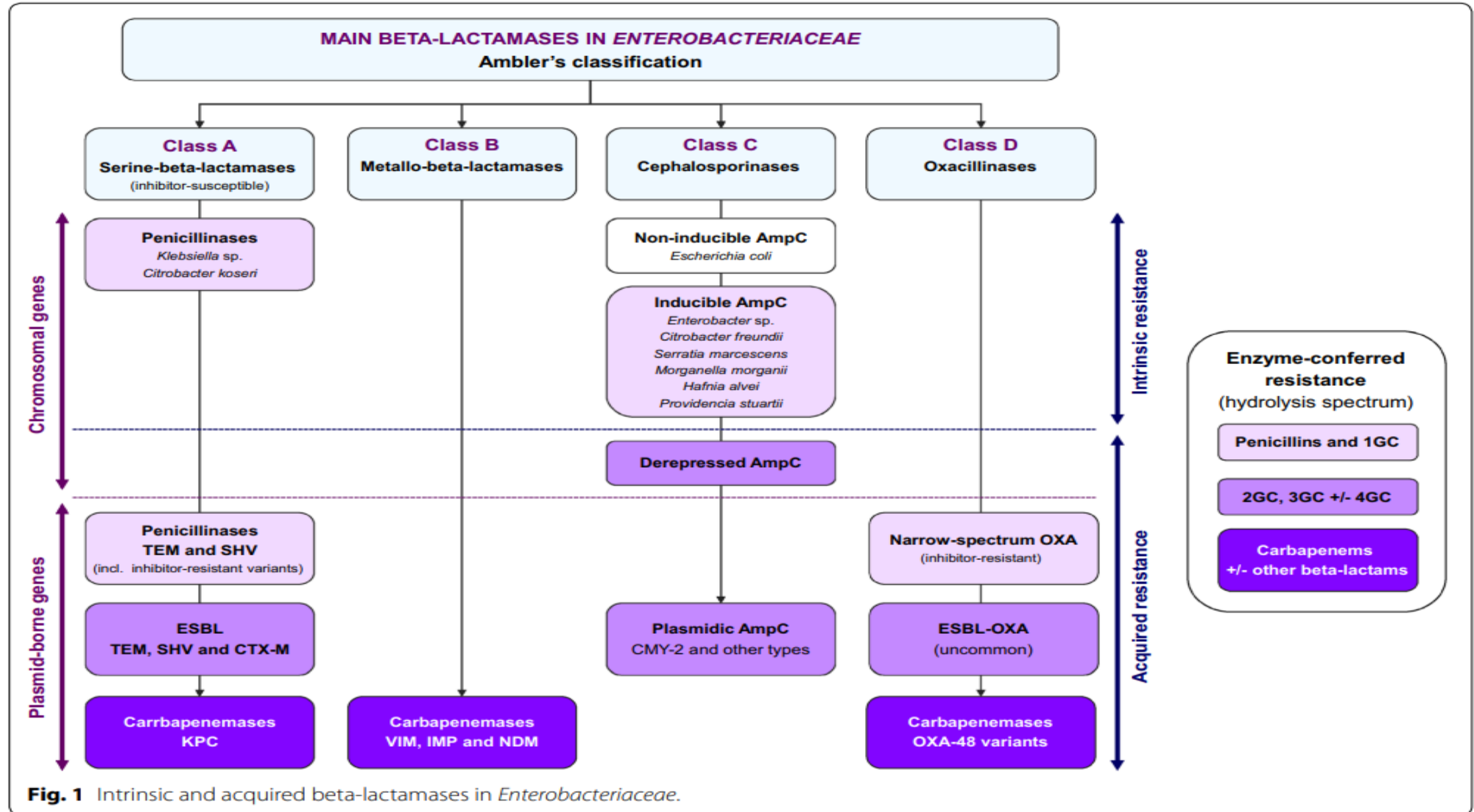
1.Пенициллиназы

2.Цефалоспориназы

3.Карбапенемазы

4.Металло-бета-лактамазы

Классификация Амблера по бета-лактамазам



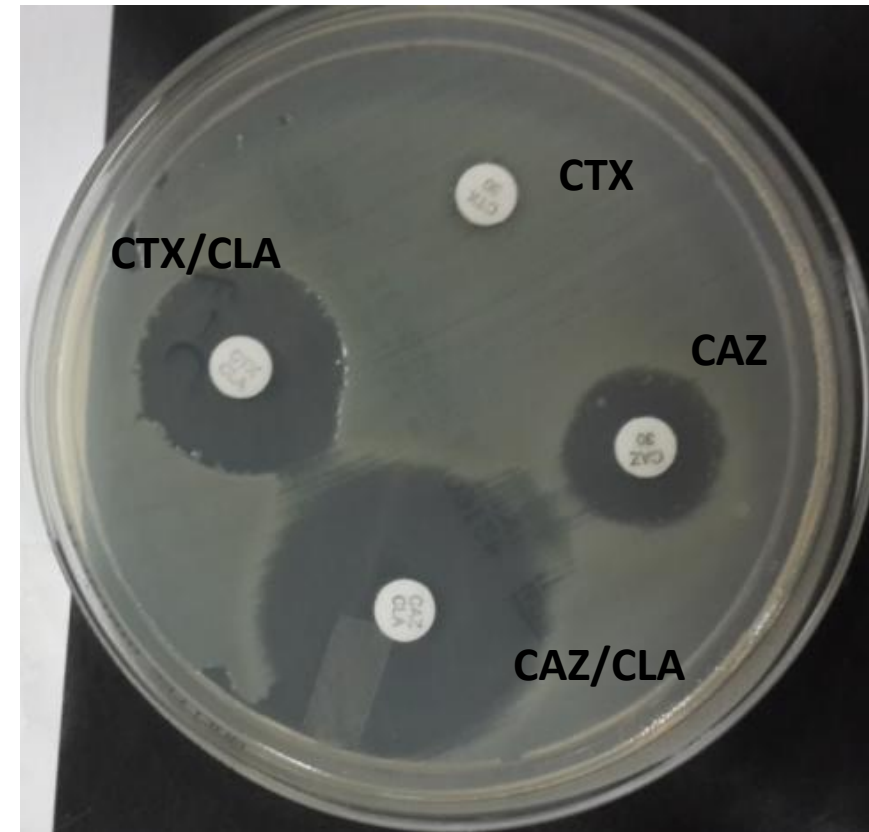
Escherichia coli (ИМП)

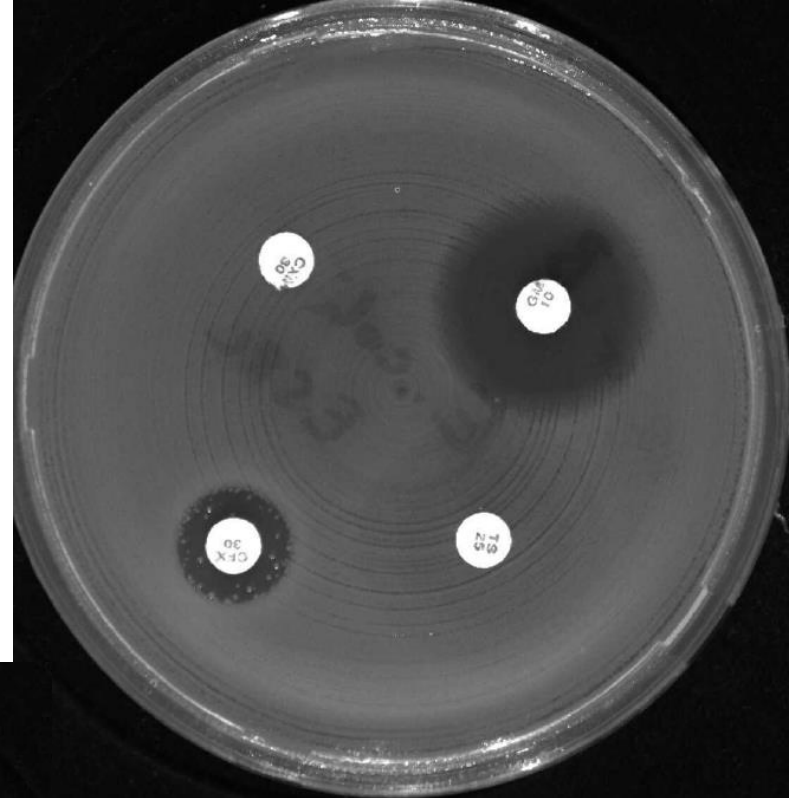
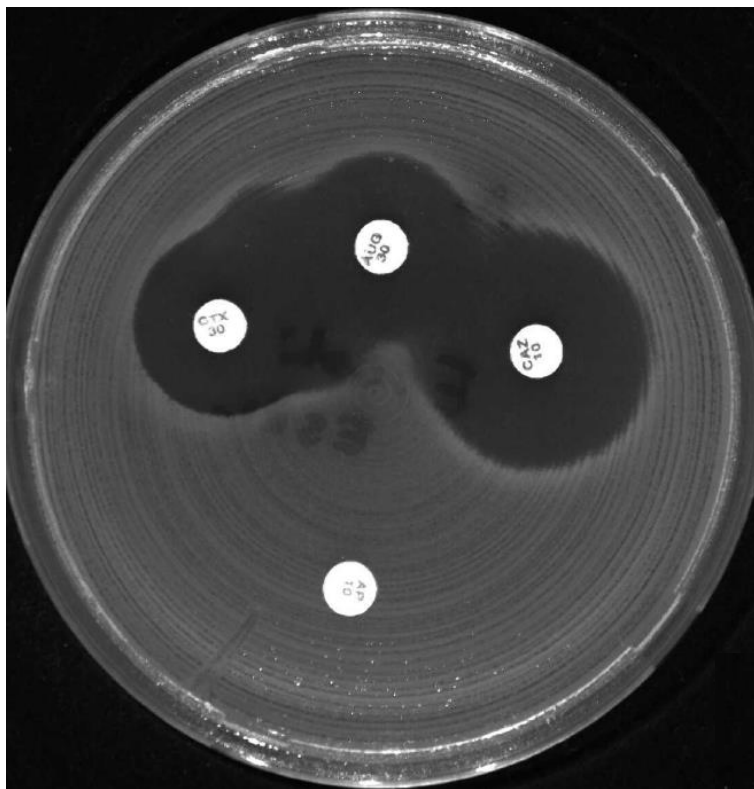
Antimicrobial	Disk content (µg)	Zone diameter (mm)	Interpretation
Ampicillin	10	6	R
Amoxicillin-clavulanic acid	20-10	18	R
Piperacillin-tazobactam	30-6	17	R
Cefotaxime	5	6	R
Ceftazidime	10	12	R
Ertapenem	10	27	S
Meropenem	10	30	S
Ciprofloxacin	5	6	R
Levofloxacin	5	6	R
Gentamicin	10	18	S
Amikacin	30	20	S
Nitrofurantoin	100	14	S
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25-23.75	6	R

Escherichia coli

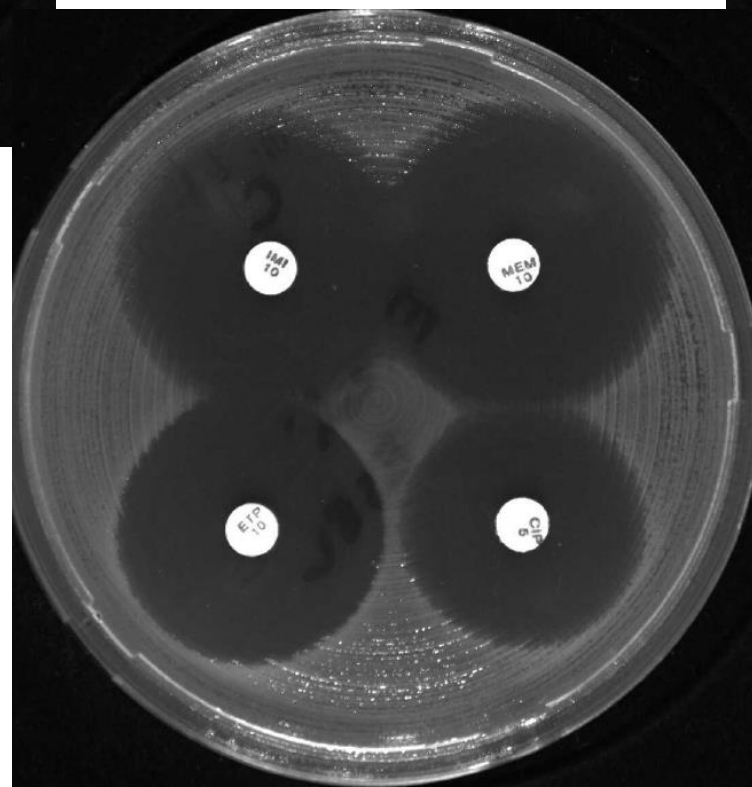
Бета-лактамы АБ / ингибитор бета-лактамазы	Диаметр зоны (мм)
(CAZ) Ceftazidime (30 µg) / (CAZ/CLA) Ceftazidime-clavulanic acid (30-10 µg)	18/35
(CTX) Cefotaxime (30 µg) / (CTX/CLA) Cefotaxime-clavulanic acid (30-10 µg)	6/21

- Комбинированный дисковый тест
Тест считается положительным, если диаметр зоны ингибирования ≥ 5 мм больше с клавулановой кислотой, чем без нее.

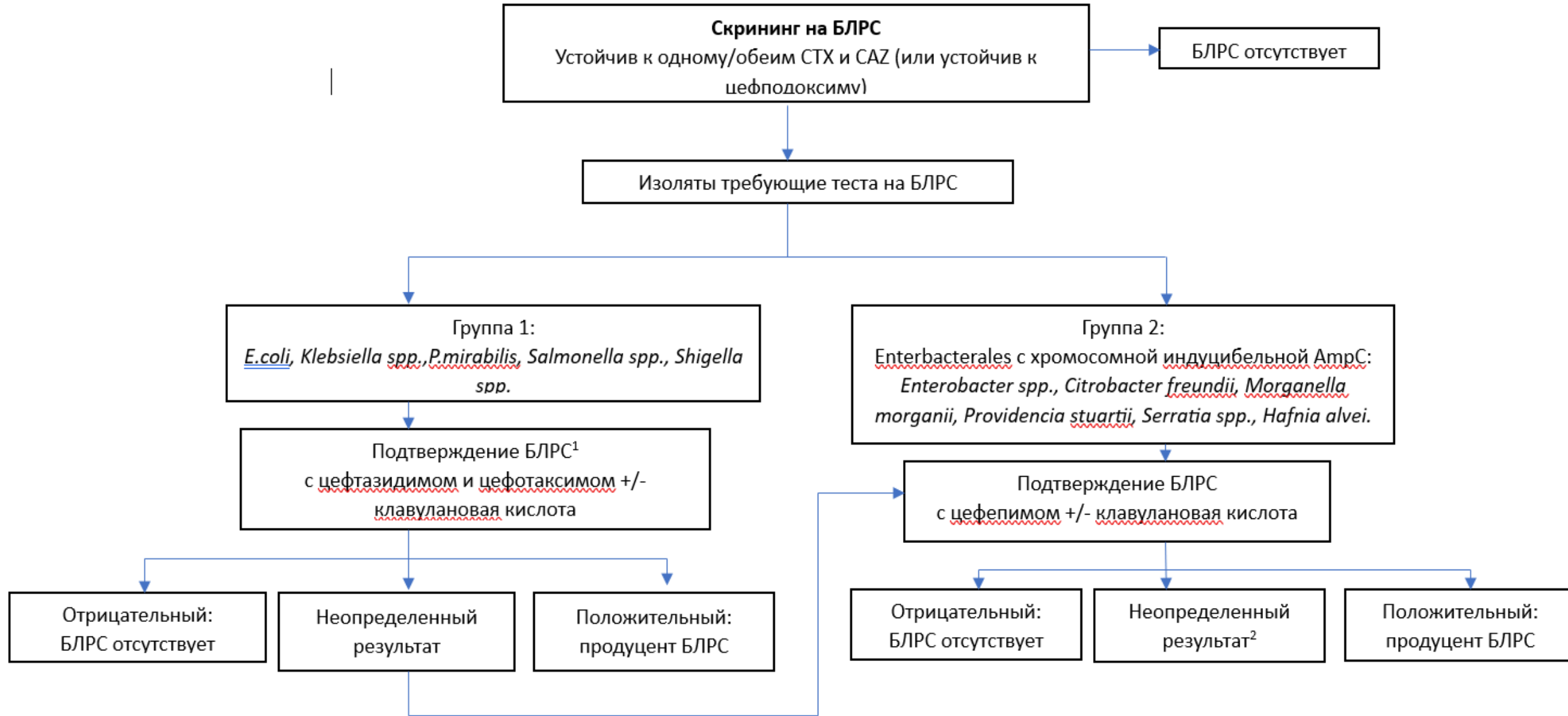




- Двухдисковый синергетический тест



Алгоритм для фенотипической идентификации БЛРС



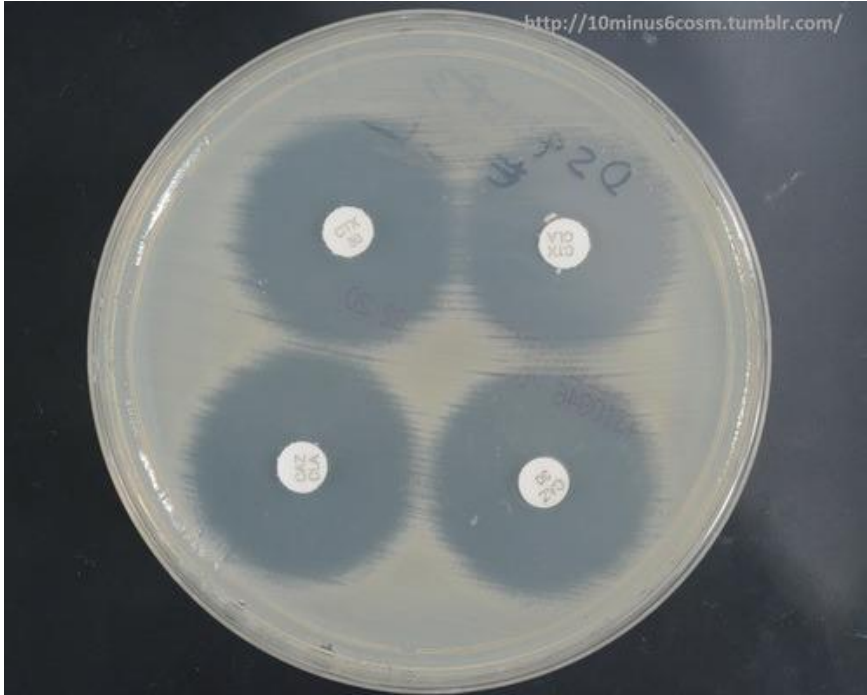
EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, 2017.

Klebsiella pneumoniae (посев крови)

Antimicrobial	MIC (mg/L)	Interpretation
Ampicillin-sulbactam	>16-4	R
Piperacillin-tazobactam	>64-4	R
Ceftriaxone	0.5	S
Ceftazidime	0.25	S
Ertapenem	>1	R
Imipenem	1	S
Meropenem	1	S
Ciprofloxacin	>2	R
Levofloxacin	>4	R
Gentamicin	>8	R
Amikacin	8	(S)
Tigecycline	1	S
Trimethoprim-sulfamethoxazole	>4-76	R

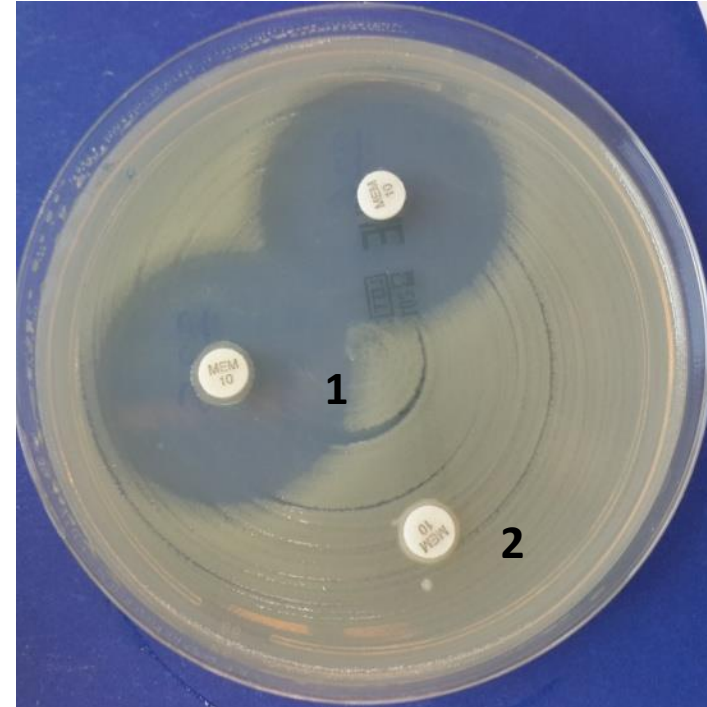
	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
Полуавтоматическая система АСТ	>1 mg/L (R)	1 mg/L (S)	1 mg/L (S)
Диско-диффузионный метод	19 mm (R)	20 mm (I)	22 mm (S)
Градиентный тест	2 mg/L (R)	2 mg/L (S)	2 mg/L (S)

Комбинированный дисковый тест (CDT)



БЛРС (-)

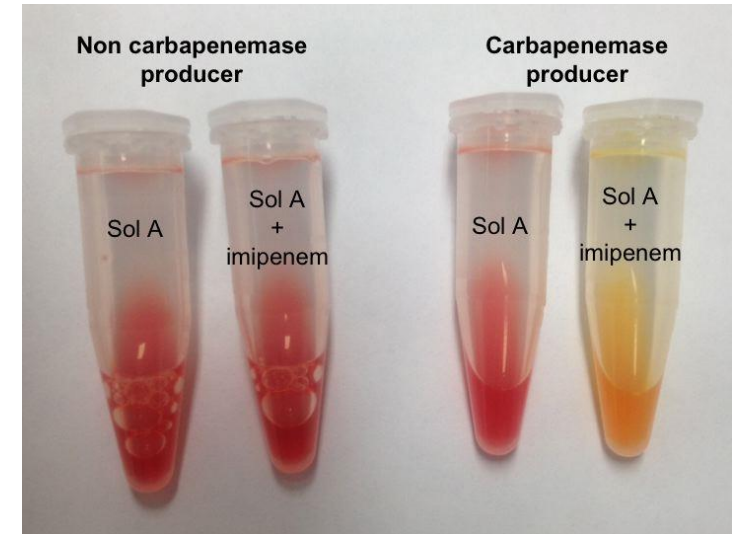
Модифицированный метод инактивации карбапенемов (mCIM)



- (1) mCIM негативный: диск с меропенемом сохраняет свою активность;
- (2) mCIM положительный: **из-за активности карбапенемазы** диск с меропенемом потерял свою активность.

Carba NP тест*

- Быстрое обнаружение продукции карбапенемазы в Enterobacterales
- Тест на основе гидролиза имипенема
- Высокая чувствительность и специфичность
- Дешевый и простой в выполнении тест
- Результаты максимум через 2 часа
- Раннее соответствующее терапевтическое лечение и инфекционный контроль



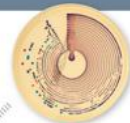
	<u>No antibiotic</u> (tube A)	<u>Imipenem</u> (tube B)	<u>Imipenem + tazobactam</u> (tube C)	<u>Imipenem + EDTA</u> (tube D)
<u>No carbapenemase</u>	Red	Red	Red	Red
<u>Ambler class A carbapenemase</u>	Red	Orange/Yellow	Red	Orange/Yellow
<u>Ambler class B carbapenemase</u>	Red	Orange/Yellow	Orange/Yellow	Red
<u>Ambler class D carbapenemase</u>	Red	Orange/Yellow	Orange/Yellow	Orange/Yellow
<u>No interpretable</u>	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow

*Nordmann P et al. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1503-7.

ADAPTABLE TO ANY LAB IN THE WORLD

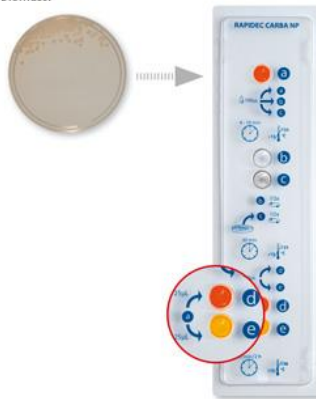
SCREENING

chromID™ CARBA
chromID CARBA SMART
chromID OXA - 48



CONFIRMATION

Subculture on recommended media in case of insufficient biomass.



DIAGNOSTIC

ID AST method +
purity plate



**CONFIRMATION of
Carbapenemase producers**

Extended carbapenem MIC
Etest®, ETP, IP, MP, DOR



READING AND INTERPRETATION

POSITIVE



NEGATIVE



1) Phenol red: pH indicator

2) A carbapenem: imipenem
(carbapenemase substrate)
+ Zinc, required for the
detection of metallodependent
carbapenemase-producing
strains



Enterobacterales продуцирующие карбапенемазу

Таблица. Клинические брейкпойнты и скрининговые пороговые значения для Enterobacterales, продуцирующих карбапенемазу (согласно методологии EUCAST)

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem ¹	≤2	>0.125	≥22	<28 ²
Ertapenem ³	≤0.5	>0.125	≥25	<25

1 Наилучший баланс чувствительности и специфичности.

2 Изоляты с 25-27 мм необходимо исследовать на наличие карбапенемаз только в том случае, если они устойчивы к пиперациллин-тазобактаму и/или темоциллину (темоциллин вносит большой вклад в специфичность). Исследование на карбапенемазы всегда оправдано, если диаметр зоны меропенема <25 мм.

3 Высокая чувствительность, но низкая специфичность. Может использоваться в качестве альтернативного скрининга, но изоляты с ESBL и AmpC могут быть устойчивыми без наличия карбапенемаз.

Enterobacterales продуцирующие карбапенемазу

Таблица. Интерпретация фенотипических тестов (карбапенемазы выделены жирным шрифтом) методами диффузии с дисками. Точные определения синергизма приведены во вкладышах к коммерческим препаратам.

β-лактамаза	Синергизм наблюдается в виде увеличения диаметра зоны (мм) с 10 мкг меропенема				МИК темоциллина >128 мг/л или диаметр зоны <11 мм
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	+	-	-	-	Изменчивая
KPC	-	+	-	-	Изменчивая
MBL + KPC	Изменчивая	Изменчивая	+	-	Изменчивая
OXA-48-like	-	-	-	-	Да
AmpC + porin loss	-	+	-	+	Изменчивая
ESBL + porin loss	-	-	-	-	Нет

MBL-металло-β-лактамаза, KPC-*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, DPA-дипиколиновая кислота, EDTA-этилендиаминтетрауксусная кислота, APBA- аминофенилборная кислота, PBA- фенолборная кислота, CLX-флоксациллин.

EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0, 2017.

Какая карбапенемаза здесь наиболее вероятна?

	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
Полуавтоматическая система АСТ	>1 mg/L (R)	1 mg/L (S)	1 mg/L (S)
Диско-диффузионный метод	19 mm (R)	20 mm (I)	22 mm (S)
Градиентный тест	2 mg/L (R)	2 mg/L (S)	2 mg/L (S)

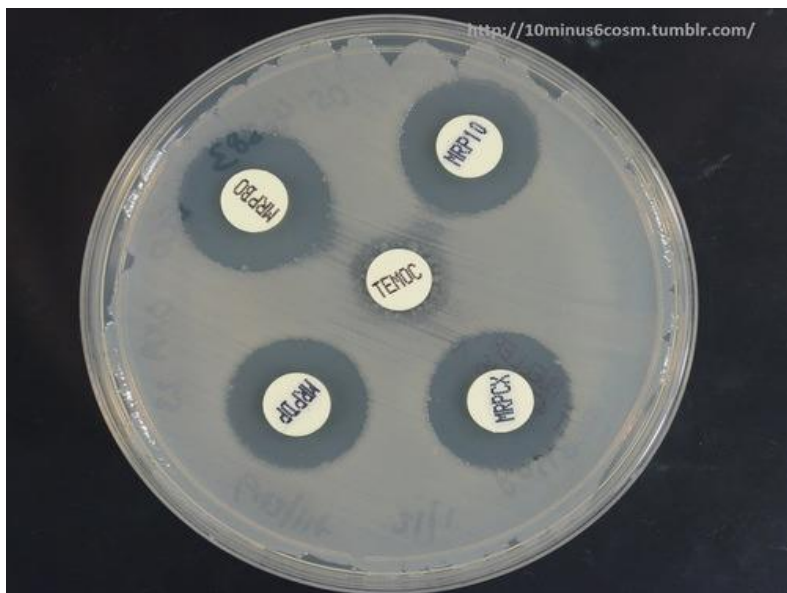
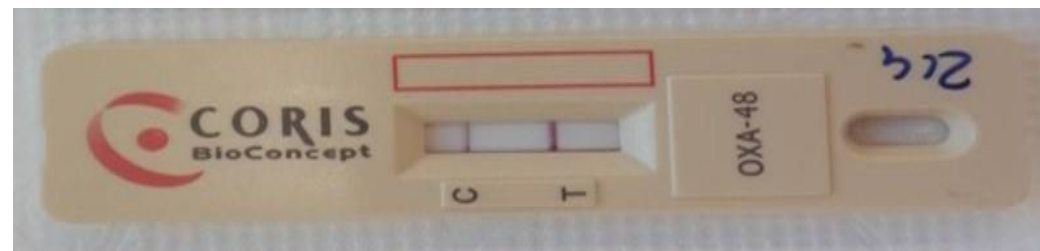


Image source: <https://10minus6cosm.tumblr.com/>



OXA-48 положительна

Proteus mirabilis (CSF)

Antimicrobial	MIC (mg/L)	Interpretation
Amoxicillin-clavulanic acid	>128-2	R
Piperacillin-tazobactam	64-4	R
Aztreonam	>16	R
Ceftriaxone	>16	R
Ceftazidime	>16	R
Cefepime	4	I
Cefoxitin	>16	R
Ertapenem	2	R
Imipenem	≤1	S
Meropenem	≤0.5	S
Ciprofloxacin	≤0.5	S
Levofloxacin	≤1	S
Gentamicin	≤2	(S)
Amikacin	≤8	(S)
Tigecycline	≤1	S
Trimethoprim-sulfamethoxazole	≤1-19	S

БЛРС?

AmpC?

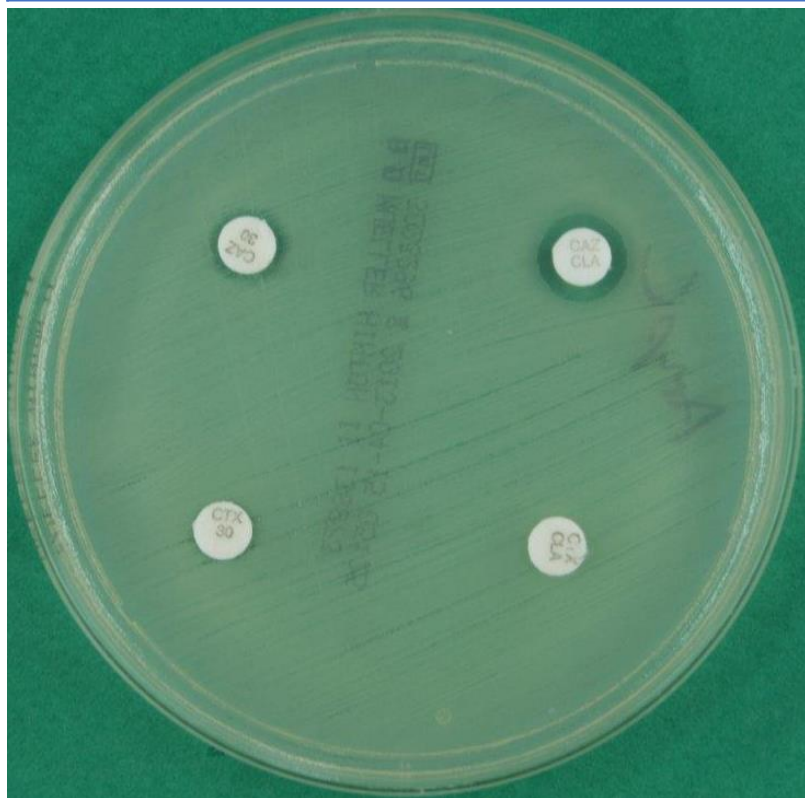
Porin loss?

**Карбапене
маза?**

**БЛРС+porin
loss?**

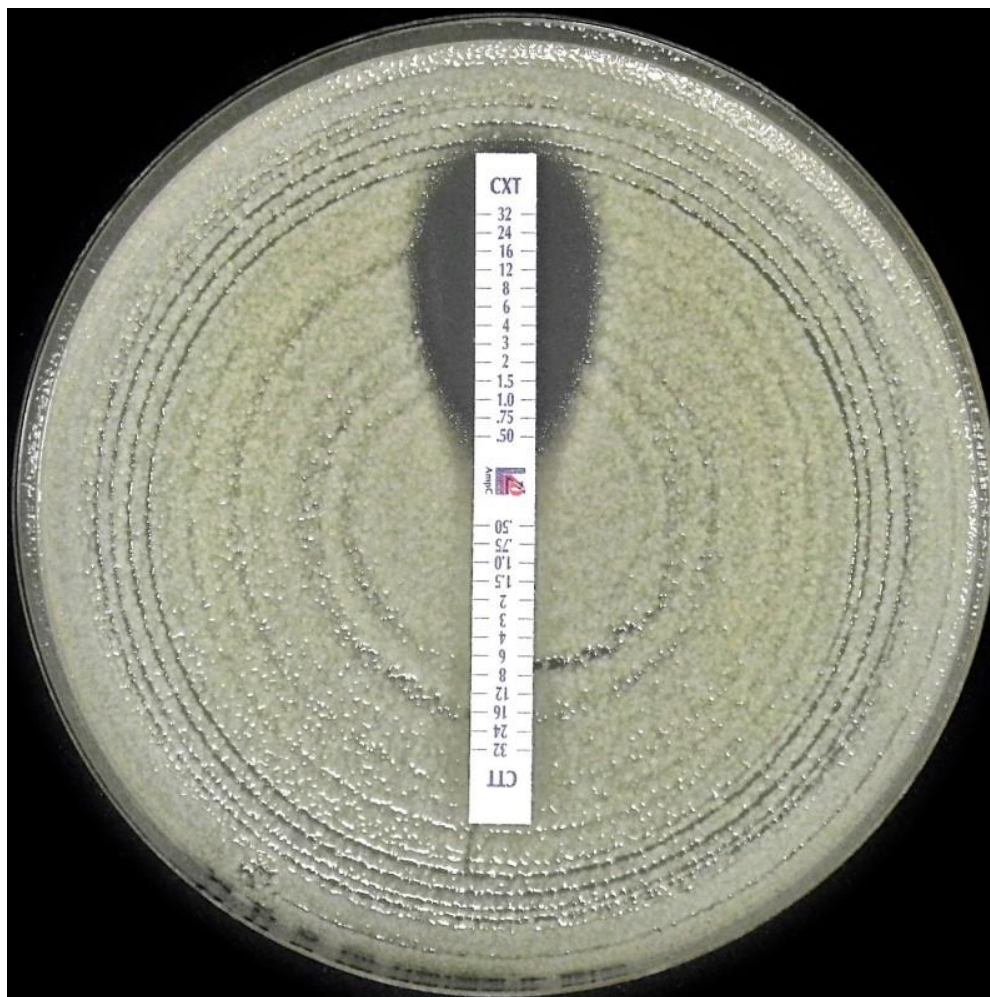
AmpC?

	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
Полуавтоматическая система АСТ	2 mg/L (R)	≤1 mg/L (S)	≤0.5 mg/L (S)
Диско-диффузионный метод	15 mm (R)	23 mm (S)	25 mm (S)
Градиентный тест	2 mg/L (R)	0.25 mg/L (S)	0.125 mg/L (S)



**Тест на БЛРС –
неопределенный
результат**

Градиентный тест на цефалоспориназу (AmpC)



CTT = cefotetan, CXT = cefotetan+cloxacillin

Antimicrobial	MIC (mg/L)
Cefotetan	>32
Cefotetan+cloxacillin	0.5

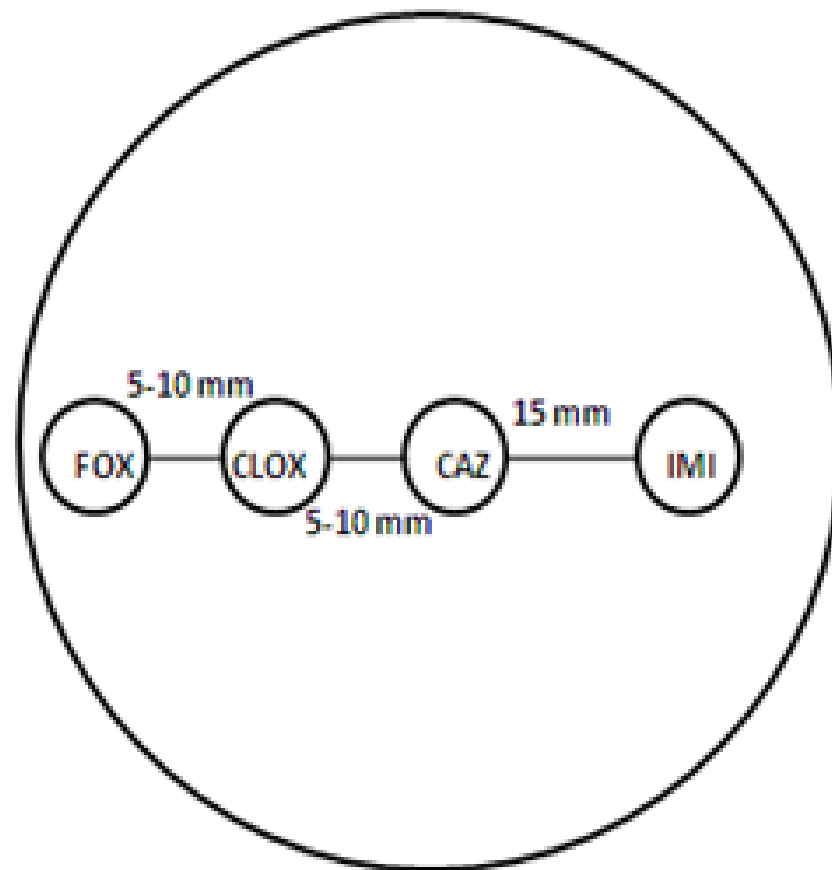
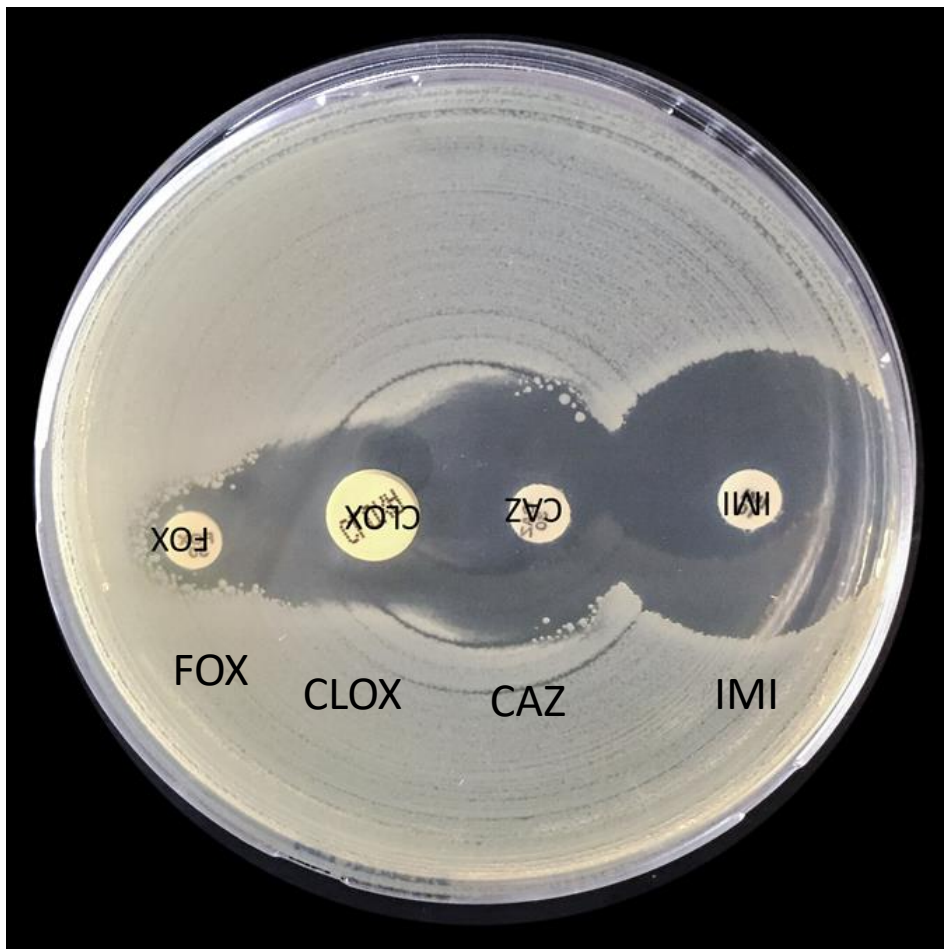
**Цефалоспориназа
(AmpC)
положительна!**

ТЕСТ С ДИСКОМ КЛОКСАЦИЛЛИНА (CL500)

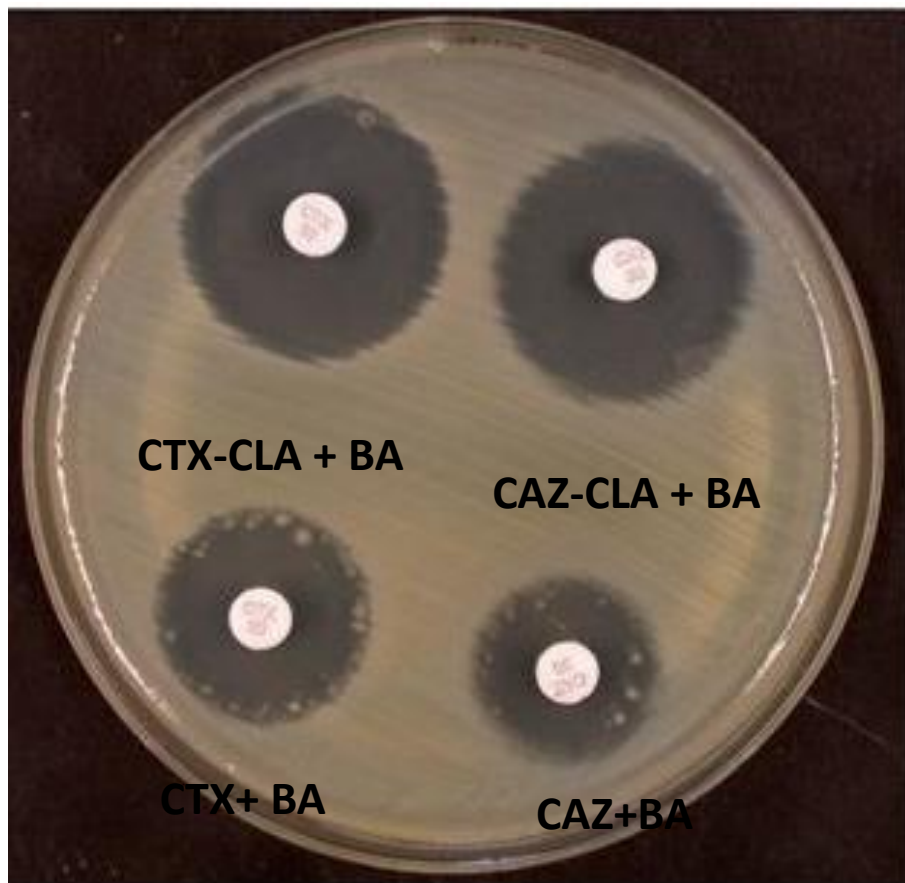
(Клоксациллин = ингибитор β -лактамазы AmpC)

- Инокулируйте МН-агар суспензией тестируемого изолята, откорректированной до 0,5 МакФарланда
- Поместите диски в определенном порядке
- Расстояние между дисками CL500, FOX30 и CAZ30 (от края до края диска) составляет 5-10 мм*.
- Расстояние между дисками CAZ30 и IMI10 (от края до края диска) - 15 мм.+35°C / 18 ч.
- *расстояние зависит от зон ингибирования FOX30 и CAZ30
- Показания теста:
 - а) через 24 ч синергия (фантомная зона) между дисками CL500 и FOX30 и/или CL500 и CAZ30
- **малейшая синергия рассматривается как признак продукции AmpC β -лактамазы**
- Между дисками CAZ30 и IMI10 D-зона (ингибирование)
 - индуцибельная AmpC- β -лактамаза

Двухдисковый синергетический тест



Дисковый тест с борной кислотой



* ВА: Фенилборная кислота

Борная кислота также ингибирует
карбапенемазы класса А (например, КРС)!!!

Диаметр зон задержки (mm)	
CAZ + BA	14
CAZ-CLA + BA	23
CTX + BA	17
CTX-CLA + BA	25

БЛРС
маскированная
AmpC!!!

Избирательная отчетность

Посев крови: *E. coli*
2/2 флакона положительны

Amoxicillin	R		
Amoxicillin-clav	S		
Cefuroxime	S		
Ceftriaxone	S		
Ceftazidime	S	}	Широкого спектра
Cefepime	S		
Piperacillin-tazo	S		
Meropenem	S	}	Широкого спектра
Ertapenem	S		
Ciprofloxacin	R		
Co-trimoxazole	S		
Nitrofurantoïn	S	→	При лечении цистита используется
Gentamicin	S	→	Не используется
Amikacin	S	→	
Colistin	S	→	Ненадежный

Посев крови: *E. coli*
2/2 флакона положительны

Amoxicillin	R
Amoxicillin-clav	S
Cefuroxime	S
Ceftriaxone	S
Piperacillin-tazo	S
Ciprofloxacin	R
Co-trimoxazole	S
Gentamicin	S

**Избирательная
отчетность
по
культурам
мочи**

- 1) Грамотрицательные палочки
(Enterobacterales) при неосложненной ИМП:
**amoxicillin/clav; cefadroxil; nitrofurantoin;
trimethoprim/sulfa**
- 2) Беременные и дети младше 15 лет:
**Amoxicillin/clav, cefalosporins,
trimetroprim/sulfa**
- 3) Осложненная ИМП:
**Дополнительно к 1 ряду +
Pip/taz, cefotaxime, ceftazidime, meropenem,
ertapenem, imipenem, amikacin, gentamicin,
trimetroprim/sulfa, cipro.**

**Примеры
избирательн
ой
отчетности
по другим
патогенам**

Pseudomonas aeruginosa

Ciprofloxacin, ceftazidime,
piperacillin/tazobactam,
(imipenem, meropenem, amikacin – только
если Pip/Tazo или ceftazidime - R)

S.saprophyticus

ampicillin, cefadroxil, nitrofurantoin,
trimetoprim

Enterococci

ampicillin, nitrofurantoin, cipro, pip/taz, vanco

Corynebacter urealyticum

gentamycin, cipro, vancomycin

B group streptococci

ampicillin, cefadrox, levofloxacin,
nitrofurantoin, trim/sulfa

Aerococcus

ampicillin, nitrofurantoin, ciprofloxacin

Спасибо за внимание!

