



Новые технологии в микробиологической диагностике и определении чувствительности

*Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии
Смоленский государственный медицинский университет*

О.И.Кречикова

Самара, 16 марта 2018 г.

Тенденции изменения этиологии возбудителей госпитальных инфекций в России

● «МАРАФОН», 2011-2012 гг.

Грамм(-) 72,7%

Энтеробактерии..... 33,9%
Escherichia coli7,8%
Klebsiella pneumoniae..... 17,0%
прочие энтеробактерии..... 9,1%

ГОНБ..... 38,6%
Pseudomonas aeruginosa.....19,9%
Acinetobacter baumannii14,0%
Stenotrophomonas maltophilia ... 9,1%

Грамм(+) 27,3%

Staphylococcus aureus16,9%

● «МАРАФОН», 2013-2014 гг.

Грамм(-) 80,9%

Энтеробактерии..... 43,0%
Escherichia coli 11,1%
Klebsiella pneumoniae..... 21,3%
прочие энтеробактерии..... 10,7%

ГОНБ..... 35,2%
Pseudomonas aeruginosa.....17,1%
Acinetobacter baumannii 15,1%
Stenotrophomonas maltophilia ... 1,0%

Грамм(+) 16,7%

Staphylococcus aureus 8,4%

Тенденции изменения резистентности к карбапенемам ГОНБ - возбудителей госпитальных инфекций в России

	2002-2004	2006-2007	2011-2012*	2013-2014*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Меропенем нечувствительные	55,4 %	70,3%	67,2 %	66,1 %
Имипенем нечувствительные	39,0%	55,9 %	58,7 %	71,1 %
Продукция МБЛ (класс В)	4,5 %	20,1%	28,3%	21,3%
<i>Acinetobacter baumannii</i>				
Нечувствительн. к карбапен.	11,8 %	38,6 %	68,8 %	75 %
Продукция карбапенемаз (класс D)	0,6%	2,4%	46,8%	64,7%

*нечувствительные штаммы (I+R), %

* критерии EUCAST

Тенденции изменения резистентности к β -лактамам Энтеробактерий – возбудителей госпитальных инфекций в РФ

	2002-2004	2006-2007	2011-2012	2013-2014
Резистентность к Цефалоспорином: Цефотаксиму, Цефтазидиму, Цефепиму				
Энтеробактерии	54,9-64,5 %	69,5-75,6 %	79,0-83,7 %	73,6-77,5 %
Продукция ESBL	52,3%	69,3%	79,9%	63,9%
Резистентность к карбапенемам				
Меропенем	0,1 %	0,3 %	2,8 %	7,2 %
Имипенем	3,6 %	2,1 %	8,4 %	8,8 %
Эртапенем	6,7 %	9,8 %	14,0 %	18,4 %
Продукция карбапенемаз	0	0,1 %	3,3 %	7,8 %

* нечувствительные штаммы (I+R), %
критерии EUCAST v.7 (2017)

Сухорукова и др. КМАХ. 2014;16:254-65
Сухорукова и др. КМАХ. 2017;19:49-56

Резистентность к карбапенемам у грамотрицательных бактерий

Самая тревожная форма устойчивости !

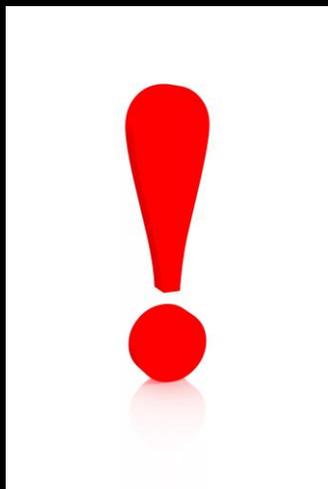
Эти бактерии резистентны ко всем β -лактамным АБП также как к большинству других классов АБП

Для штаммов продуцирующих карбапенемазы характерны экстремальная резистентность (XDR) и панрезистентность (PDR)

В феврале 2017 года ВОЗ опубликовала список из «приоритетных микроорганизмов», включая

- **Enterobacteriaceae** карбапенем резистентные
- **Acinetobacter baumannii** карбапенем резистентные
- **Pseudomonas aeruginosa** карбапенем резистентные

Необходимы изменения в технологии микробиологической диагностики



Скорость

Информативность

Видовой идентификации

+

+

Выявление механизмов
резистентности

+

+

Из коллекции НИИАХ

Современные технологии в микробиологической диагностике

Оптимальный максимум

Скорость идентификации и выявления генов резистентности от нескольких часов до суток с использованием молекулярно-генетических методов

GeneXpert (Cefeid)

Экспресс метод выявления КРС, NDM, VIM, ОХА, IMP



- Требуется высокотехнологичное оборудование
- Специальные расходные материалы
- Высокая цена

Современные технологии в микробиологической диагностике

Оптимальный максимум

Скорость видовой идентификации до суток с использованием масс-спектрометрии

Идентификация карбапенемаз - часы



- Требуется высокотехнологичное оборудование
- Специальная подготовка персонала
- Высокая цена

Современные технологии в микробиологической диагностике

Достаточный минимум

Хромагары для видовой идентификации

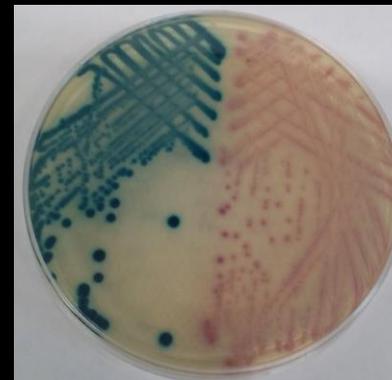
- ✓ обеспечивают скорость и информативность идентификации микроорганизмов через 24 часа! от начала исследования.
- ✓ специфическая окраска колоний делает лёгкой и быстрой идентификацию *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Escherichia coli*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii* ...)
- ✓ повышают эффективность исследования материалов при полимикробных инфекциях

CHROMagar

P.aeruginosa



A.baumannii



K.pneumoniae. E.coli

Современные технологии в микробиологической диагностике

Достаточный минимум

CHROMagar

Хромагары для видовой идентификации

Применение для быстрой предположительной идентификации энтеробактерий:

- возбудителей инфекций мочевых путей
- инфекций крови
- госпитальных пневмоний
- раневой инфекции
- при обследовании фекальных образцов с эпид. целью



Использовался CHROMagar Orientation (Франция)

Чувствительность – 98,8%*

Чувствительность – 98,8%*

Чувствительность была выше, чем на стандартных средах (98% против 69%)**

Экономическая выгода – 70%*

*Kyfumi Ohkusu, JCM, Dec. 2000, p.4586–4592

**А.Г.Коробова, Г.А.Клясова Лаборатория, №1, 2016

Достаточный минимум

Хромагары с селективными добавками обеспечивают скрининг продукции ESBL и карбапенемаз через 24 часа от начала исследования

Преимущества применения хромагаров

- позволяют ставить антибиотикограмму через 24 часа без дополнительного накопления микробной массы исследуемого МО
- ставить тесты, подтверждающие продукцию карбапенемаз через 24 часа
- не требуют специального оборудования
- не требуют дополнительной подготовки специалистов
- не трудоёмки в применении
- экономят материальные ресурсы

Чувствительность CHROMagar™ KPC

Чувствительность Исследователи
%

92,7 % - 100 % Moran Gilad et al., 2011; Samra et al., 2008

85,0 % Adler et al., 2011

76,6 % Shawn Vasoo et al., 2014

43,0 % Delphine Gerlich et al., 2013

Возможные причины различий в оценке чувствительности CHROMagar™ KPC

- Методология изучения
- Возможные различия МПК карбапенемов изучаемых культур
- Различные классы карбапенемаз и разнообразие продуцируемых β - лактамаз

Чувствительность/специфичность CHROMagar™ KPC

Чувствительность:

Детекция карбапенемаз энтеробактерий – 43 %

Специфичность - 67,8%

Чувствительность детекции карбапенемаз различных классов колеблется в широких пределах:

Класс А (KPC) - 70%

Класс В (MBL, IMP, VIM) - 58,8%

Класс D (OXA 48) - 11%

Характеристика наиболее значимых карбапенемаз грам(-) МО

Продукция карбапенемаз

Мол. Класс/ Функцион.гр	пенициллины	ЦС III, ЦС IV	Азтреонам	Ингибитор - клавуланов. кислота	Карбапенемы
A/2f	Сериновые карбапенемазы: KPC, GES, BIC			У/Ч	
B/3	Металло β-лактамазы: VIM, MBL, NDM, GIM				
D/2df	Оксациллиназы: OXA-48, OXA-like				

Продукция карбапенемаз наиболее важный, но не единственный механизм резистентности к карбапенемам у грам(-) бактерий

Видовой состав изолятов энтеробактерий, продуцирующих известные карбапенемазы (Россия 2013-2014)

Вид	N	Типы карбапенемаз				
		VIM	NDM	OXA-48	KPC	OXA48 +NDM
<i>K. pneumoniae</i>	118	2	21	100	1	6
<i>E. coli</i>	3		3			
<i>P. mirabilis</i>	3		3			
<i>S. marcescens</i>	3			3		
<i>C. freundii</i>	1			1		
<i>E. cloacae</i>	1			1		
<i>K. oxytoca</i>	1			1		
	130	2	27	106	1	6

Продукция карбапенемаз Грам(-) МО.

	Содержание В-лактамаз	мкг/мл IMP*	мкг/мл ERT*	мкг/мл MEM*
<i>K.pneumoniae</i> ROV	OXA-48, CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	0,5 / Ч	3 / P	0,38 / Ч
<i>K.pneumoniae</i> LAS	OXA-48, CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	3 / Ч	> 32 / P	8 / P
<i>K.pneumoniae</i> MUS	KPC-2, TEM-1 CHV-12	0,75 / Ч	4 / P	1,5 / УЧ
<i>K.pneumoniae</i> 475	KPC-2, CTX-M-15, CHV-11	16 / P	>32 / P	>32 / P
<i>K.pneumoniae</i> KIE	NDM-1, CHV-38, CMY-16, OXA-10	0,75 / Ч	2 / P	1 / Ч
<i>E.coli</i> PEK	NDM-4, CTX-M-15, OXA-1	>32 / P	>32 / P	>32 / P
<i>E.coli</i> MAR	Гиперэкспрессия AmpC	16 / P	>32 / P	2 / УЧ
<i>K.pneumoniae</i> COO	CTXM-15, CHV-28	8 / P	32 / P	4 / P

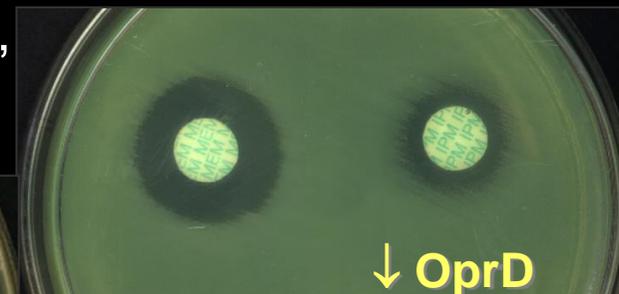
Примечание: Критерии интерпретации CLSI 2014

IMP Ч ≤ 1 P ≥ 4; MEM Ч ≤ 1 P ≥ 4; ERT Ч ≤ 0,5 P ≥ 2

Сниженная чувствительность/резистентность к карбапенемам

Следует помнить, что сниженная чувствительность/резистентность к карбапенемам, может быть определена другими механизмами резистентности

- М.О. наряду с продукцией карбапенемаз могут продуцировать различные β -лактамазы
- Сниженная чувствительность/резистентность к карбапенемам может быть связана с гиперпродукцией AmpC, ESBL
- Со снижением проницаемости клеточной стенки М.О. ,
- С механизмом эффлюкса



Рост на хромагарах энтеробактерий с продукцией карбапенемаз

Количество культур энтеробактерий с продукцией карбапенемаз - 46

Тип карбапенемаз	Энтеробактерии при посеве 10^5 КОЕ/мл и менее									
		%	МПК меропенема, мкг/мл / % культур							
			0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
ОХА 48 (класс D)	42		4	4	6	8	4	2	4	10
Рост на КРС	34*	80,9%	0	4	2	8	4	2	4	10
Рост на SuperCarba	42**	100%	4	4	6	8	4	2	4	10
ОХА-48+NDM	4					1	1		2	
Рост на КРС	4		-	-	-	1	1		2	
Рост на SuperCarba	4					1	1		2	

54,7% категория Ч

Критерии интерпретации «КР Россия. Версия 2017 »

Меропенем Ч- ≤ 2 мкг/мл; Р > 8 мкг/мл

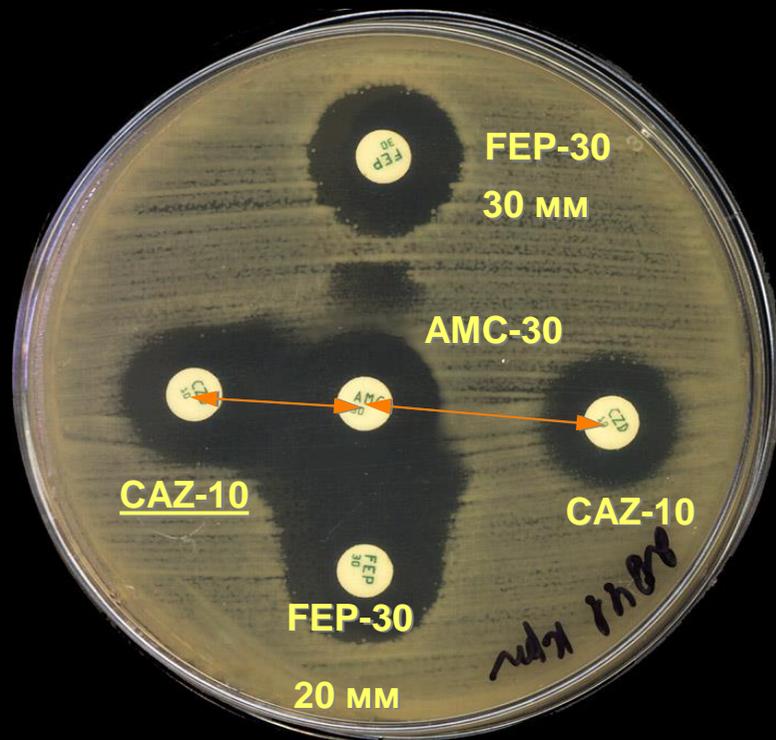
Данные НИИА Х, 2017

Подтверждение продукции ESBL

✓ Если есть рост на хромагаре ESBL

✓ Если зона ингибирования роста Цефотаксима, 5 мг < 21 мм

Цефтазидима 10 мг < 22 мм



➤ При использовании дисков с меньшей нагрузкой коррекция расстояния между дисками не требуется

➤ FEP может быть использован вместо СТХ для всех видов микроорганизмов

Специфичность метода «двойных дисков» выше, чем других диффузионных методов

У каких штаммов требуется подтверждение продукции карбапенемаз

- ✓ У всех штаммов, давших рост на Хромагаре КРС при отсутствии природной резистентности к карбапенемам
- ✓ У энтеробактерий категории «Чувствительности», но с зоной задержки роста) :
 - меропенема менее 27 мм (Ч - \geq 22 мм)
 - имипенема менее 23 мм (Ч - \geq 22 мм)

Детекция не является обязательной для *Proteus* spp., *Morganella*, *Providencia* spp. со сниженной чувствительностью к имипенему (МПК 2-4 мг/л) – видоспецифическое свойство

Подтверждение продукции карбапенемаз

Фенотипические методы:

1. Колориметрические методы

принцип метода: *in vitro* гидролиз имипенема с образованием кислых продуктов и изменением цвета среды

- CARBA NP тест (Rapidec® CARBA NP, bioMérieux)

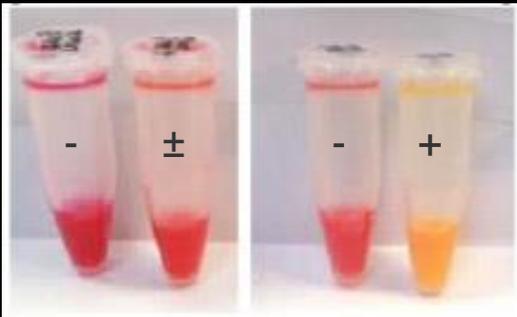
- Rapid CARB Screen (Rosco Diagnostica)

Недостаток: стоимость и малая доступность

Достоинства:

- высокая чувствительность и специфичность

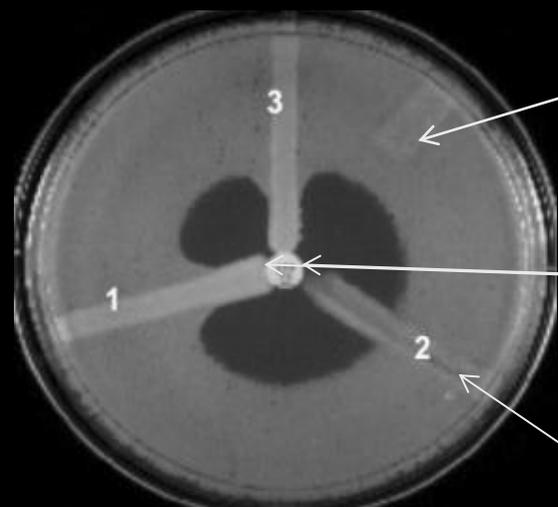
- общее время анализа, включая подготовку образцов и инкубацию 1-3 часа



Подтверждение продукции карбапенемаз

Фенотипические методы:

2. Модифицированный Ходж тест (МНТ)



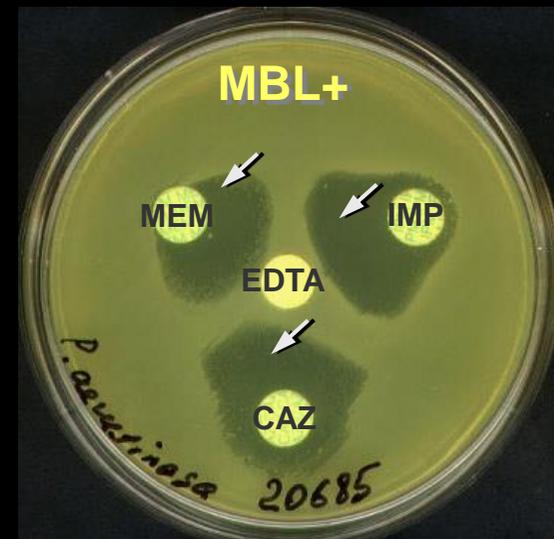
Газон *E. coli* ATCC 25922
0.5 по McFarland
разведенный 1:10

диск с эртапенемом или
меропенемом 10µg

тестируемый изолят
(мазок культуры тампоном
с агара)

Выявление карбапенемаз у энтеробактерий

3. Метод двойных дисков



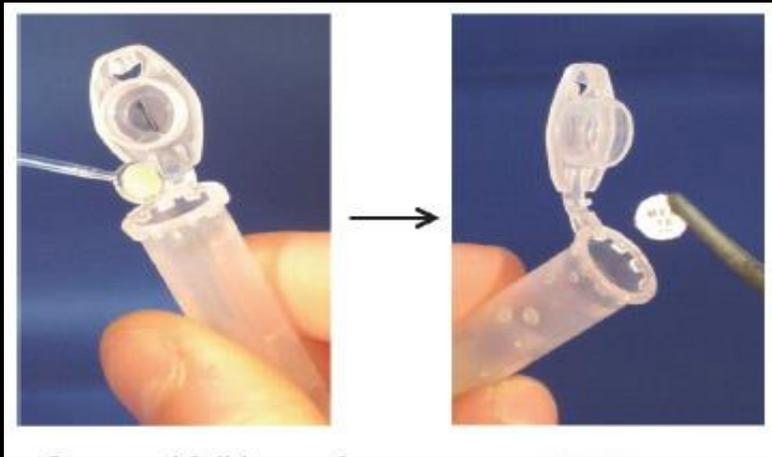
Синергизм с ЭДТА

Выявление МБЛ

Тесты для выявления продукции карбапенемаз

4. Методы оценки гидролиза карбапенемов *in vitro*

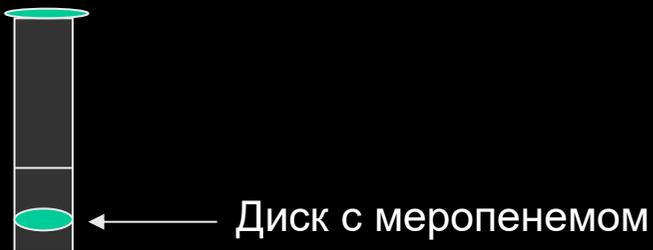
Carbapenem Inactivation Method (CIM) (2)



1. В пробирки Оппендорфа разлить по 400 мкл стерильной Д.В. (физ.р-ра)
2. Приготовить микробную суспензию исследуемого изолята
 - полная инокуляционная петля, объёмом 10 мкл суточной микробной культуры, с агара М-Х или К.А., вносится в пробирку с 400 мкл H₂O

Тщательно ресуспензировать на вортексе.

3. Диск с меропенемом погрузить в суспензию.
4. Инкубировать пробирки с микробной суспензией и с диском меропенема min 2 часа при $t=35\text{ C}$



Тесты для выявления продукции карбапенемаз

Методы оценки гидролиза карбапенемов *in vitro*

Carbapenem Inactivation Method (CIM) (3)



5. Приготовить микробную взвесь с контрольным штаммом *E.coli* ATCC 25922 в физиологическом р-ре, 0,5 ЕД мутности по McFarland.
6. На чашку Петри d 90мм с агаром М-Х нанести культуру *E.coli* ATCC 25922 стерильным тампоном в трёх направлениях
7. На газон контрольного штамма поместить:
 - интактный диск с меропенемом для ВК
 - извлечённый из пробирки с испытуемой к-рой диск.

На одной чашке d 90мм размещают не более 6 дисков (1 – контрольный, остальные – после инкубации с испытуемыми культурами)

**Инкубировать не менее
8 часов при t⁰ 35⁰ С**

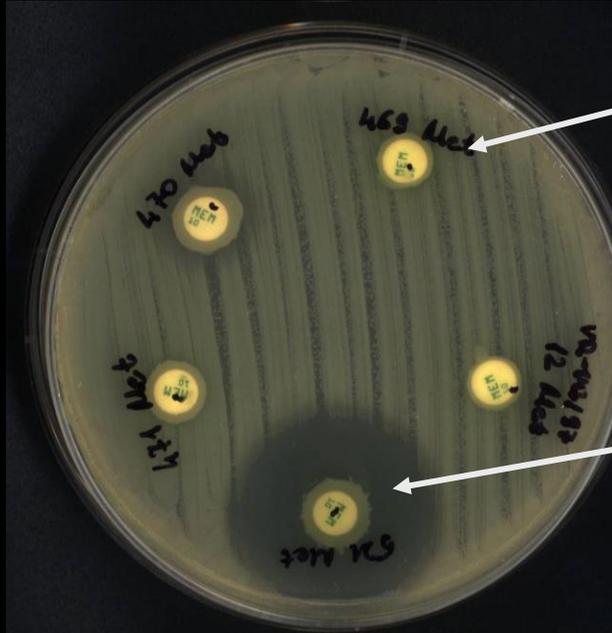
Тесты для выявления продукции карбапенемаз

2. Методы оценки гидролиза карбапенемов *in vitro*

Carbapenem Inactivation Method (CIM) (4)

Учёт результатов

1. Если тестируемый бактериальный изолят продуцирует карбапенемазы, **отсутствует** зона задержки роста чувствительного индикаторного штамма *E.coli* ATCC 25922, т.е. меропенем инактивируется
2. Если бактериальный изолят не продуцирует карбапенемазы, чётко видна зона задержки роста вокруг диска с меропенемом, т.е. меропенем проявляет активность.



Алгоритм исследования клинического материала при подозрении на ВБИ

Биологический материал

День 0

КА

CHROMagar
Orientation

CHROMagar
ESBL

CHROMagar
KPC

День 1 (24 часа)

Предварительный результат

Тест *ESBL*

Постановка тестов

Тест CIM

Стандартная А/Б-грамма

День 2 (48 часов)

Окончательный результат

Заключение

- **Применение хромагаров для скрининга резистентности М.О. резистентных к β - лактамным антибиотикам в короткие сроки выявляет полирезистентные микроорганизмы**
- **Сокращает сроки микробиологического исследования в любых лабораториях**
- **Более точная интерпретация антибиотикограмм требует внедрения чувствительных и доступных для практических лабораторий методов подтверждения продукции карбапенемаз**
- **Применение хромагаров целесообразно рекомендовать для внедрения в практику работы бактериологических лабораторий**

Значение раннего выявления резистентности

Клиническое значение

- Раннее изменение эмпирической терапии на этиотропную
- Расширение антибиотикограммы: определение чувствительности к колистину, фосфомицину ...

Эпидемиологическое значение

- Раннее выявление инфицированных пациентов и предупреждение диссеминации резистентных штаммов
- Изоляция пациентов и предупреждение вспышек

**СПАСИБО
ЗА ВНИМАНИЕ**

ANTIBIOTIC.ru

Olga.kretchikova@antibiotic.ru