

Обнаружение наиболее значимых механизмов антибиотикорезистентности у *Enterobacteriaceae*: Европейская перспектива

Dr Trevor Winstanley



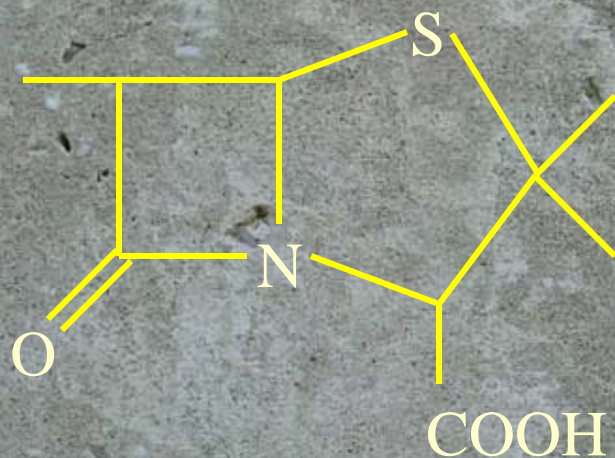
The
University
Of
Sheffield.

Sheffield Teaching Hospitals
NHS Foundation Trust



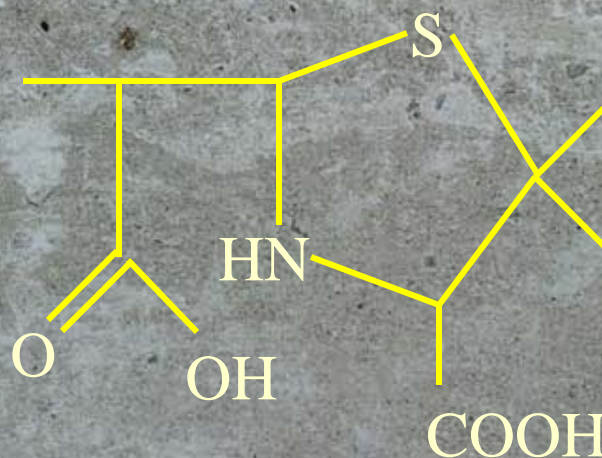
EUCAST EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Действие β -лактамазы



Активный пенициллин

H_2O



Ферментативный гидролиз бета-лактамного кольца антибиотика

ESBL

A

KPC

B

MBL (IMP, VIM, NDM)

AmpC

C

D

OXA

Молекулярная классификация
(Ambler)

AmpC β -лактамазы

Отсутствуют у:

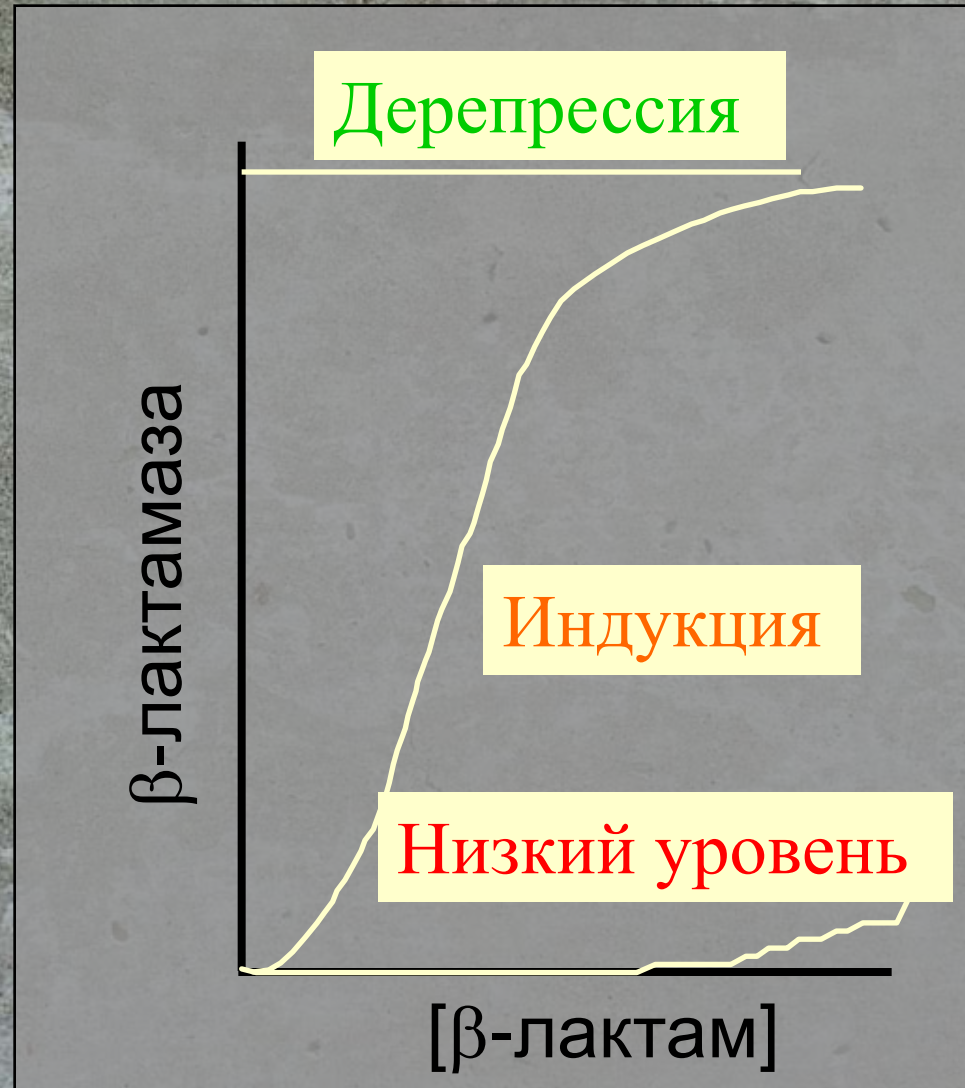
- *Klebsiella*

Постоянный низкий уровень у:

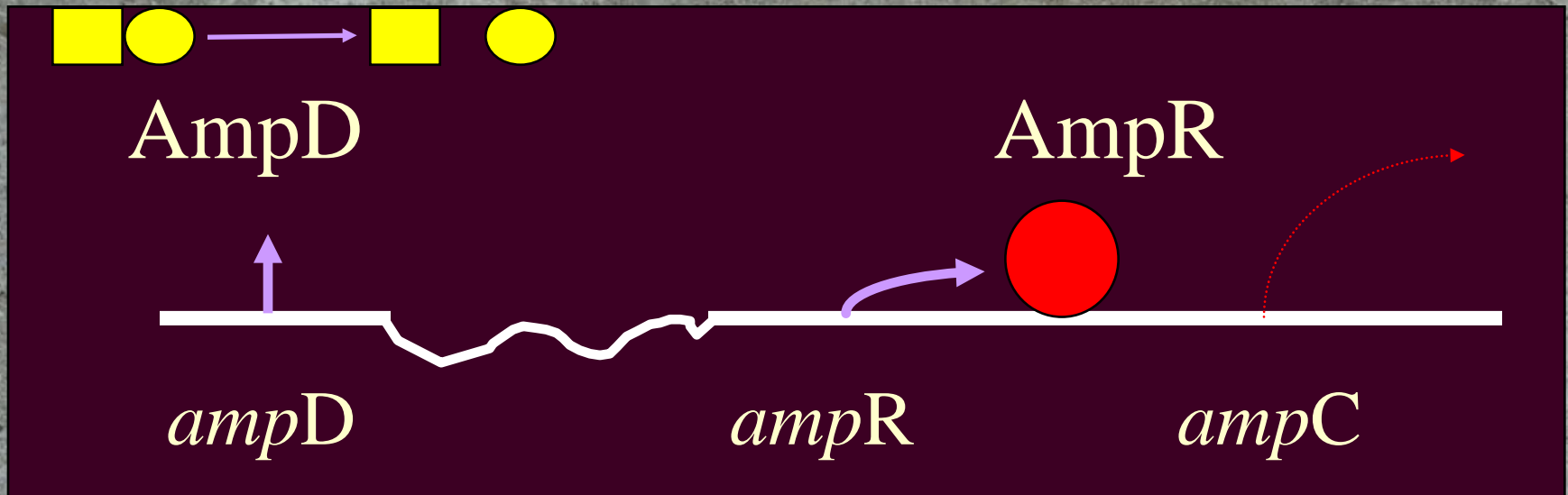
- *E. coli* & shigellas

Индуцибельные у:

- *Enterobacter*
- *C. freundii*
- *M. morgani*
- *Serratia*
- *Providencia*
- *P. aeruginosa*
- *Aeromonas*
- *Hafnia alvei*

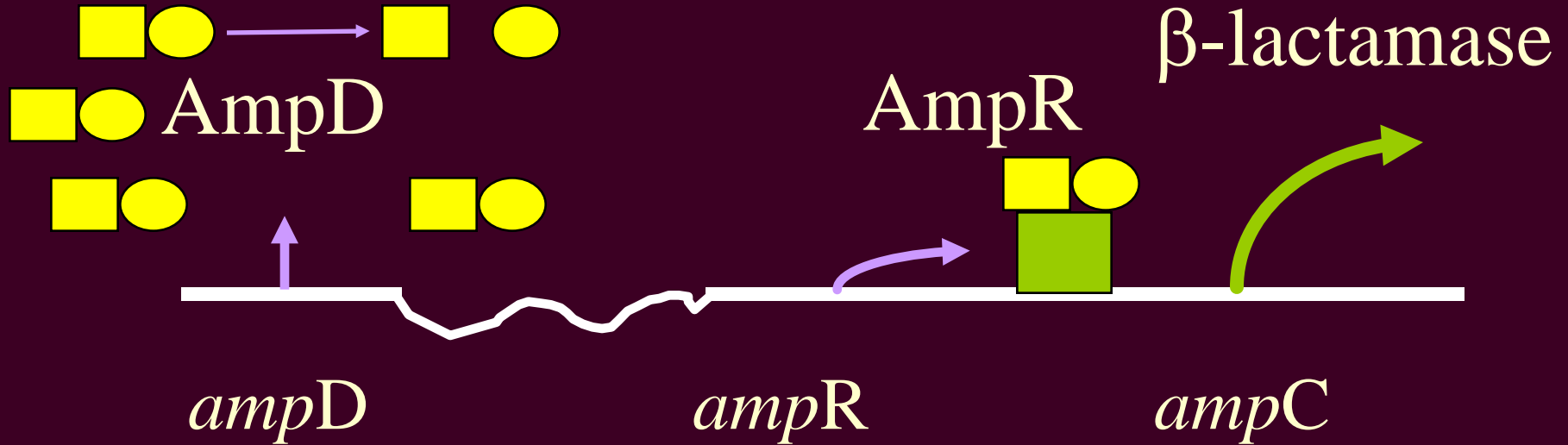


Неиндуцированные



- Переработка фрагментов клеточной стенки AmpD
- AmpR в конформации репрессора
- *ampC* ген НЕ экспрессируется

Индуцированные



- Больше продуктов переработки: насыщение AmpD
- Фрагменты клеточной стенки превращают AmpR в активатор
- Ген *ampC* экспрессируется



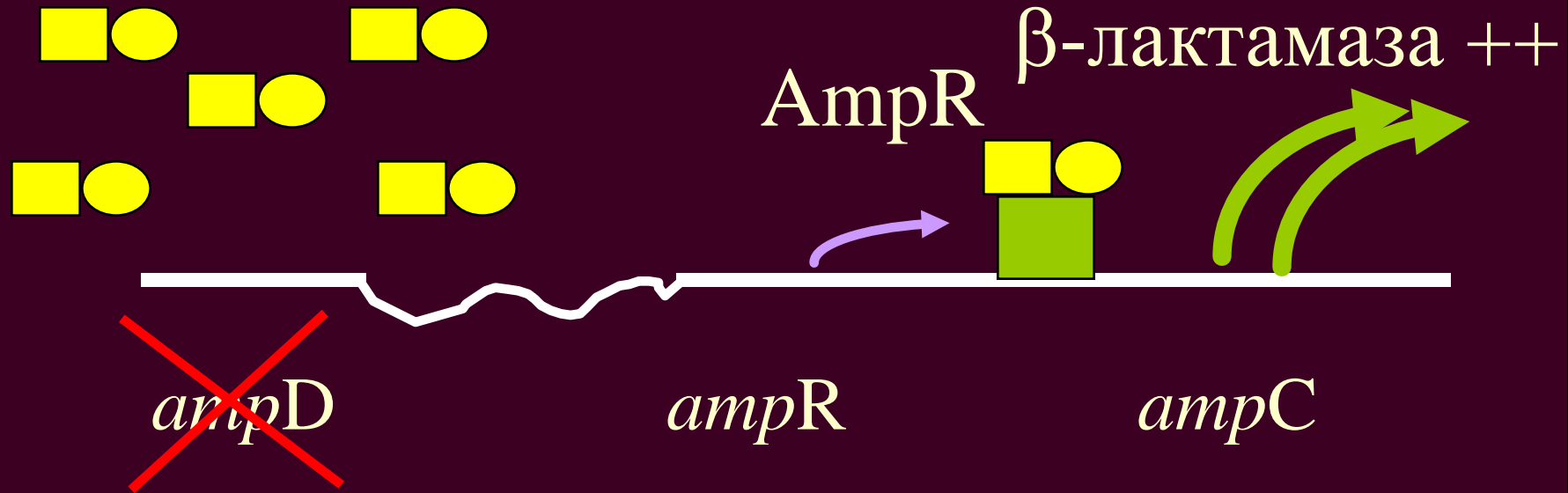
CTX
30

FOX
30

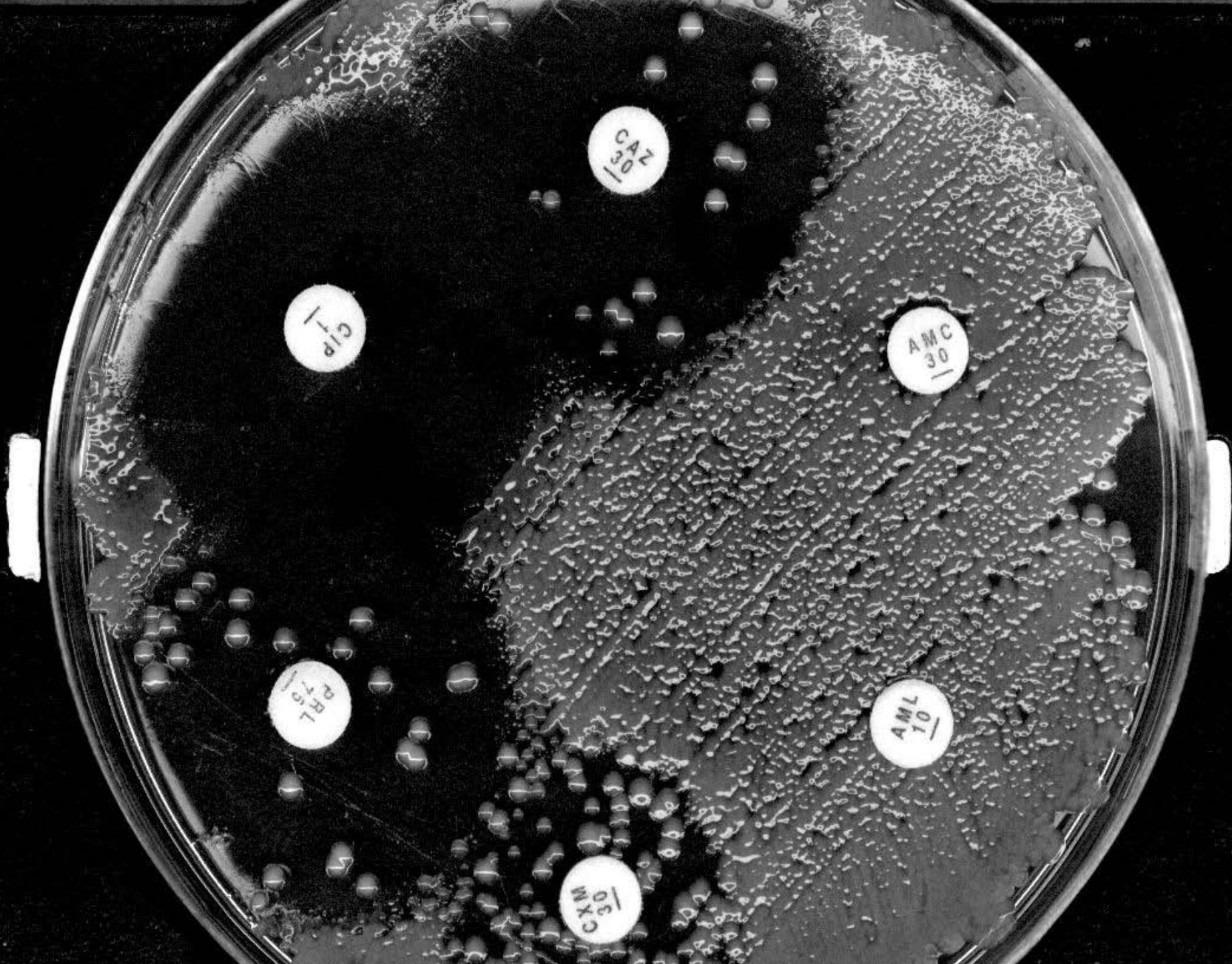
CPD
10

CP
01

Дерепрессированные



- *ampD* инактивируется в результате мутации
- AmpR превращается в постоянно действующий активатор
- Ген *ampC* гиперэкспрессируется



CAZ
30
|

GIP
1
|

AMC
30
|

PRL
150
|

AML
10
|

CXM
30
|

Плазмидные Amp^C

Класс	Источник
CMY-2-подобные LAT CFE	<i>C. freundii</i>
DNA-подобные (индуцибельные)	<i>M. morgani</i>
MIR ACT	<i>Enterobacter</i> spp.
CMY-1-подобные FOX MOX	<i>Aeromonas</i> spp.
ACC	<i>H. alvei</i>
ABA	<i>Acinetobacter baumannii</i>

Идентифицирован в 1980г. В основном встречается у *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* и *P. mirabilis*.

Описание AmpC

- β -лактамазы молекулярного класса C (по Ambler)
- Гидролизуют пенициллины и цефалоспорины
 - в т.ч. третьего (но обычно не четвертого) поколения и монобактамы
- Плохо ингибируются clavulanic acid
- Гидролизуют цефокситин
 - Кроме ACC-1
 - Резистентность к цефокситину также может быть вызвана нарушением поринов

Фенилбороновая кислота и цефокситин

	Расширение (мм) зоны FOX 30 мкг с 400 мкг фенилбороновой кислоты	Кратность снижения МПК цефокситина в присутствии 400 мг/л фенилбороновой кислоты
<i>Klebsiella</i> MOX-1	12	128
<i>E. coli</i> LAT-2	12	64
<i>Klebsiella</i> DHA-1	14	128
<i>Klebsiella</i> DHA-2	13	64
<i>E. coli</i> ACC-1	4	4
<i>Klebsiella</i> ACT-1	13	64
ALL ESBL +ve	≤2	≤2

Следует учитывать, что производные бороновой кислоты также подавляют карбапенемазы класса А

Клоксациллин и цефотаксим

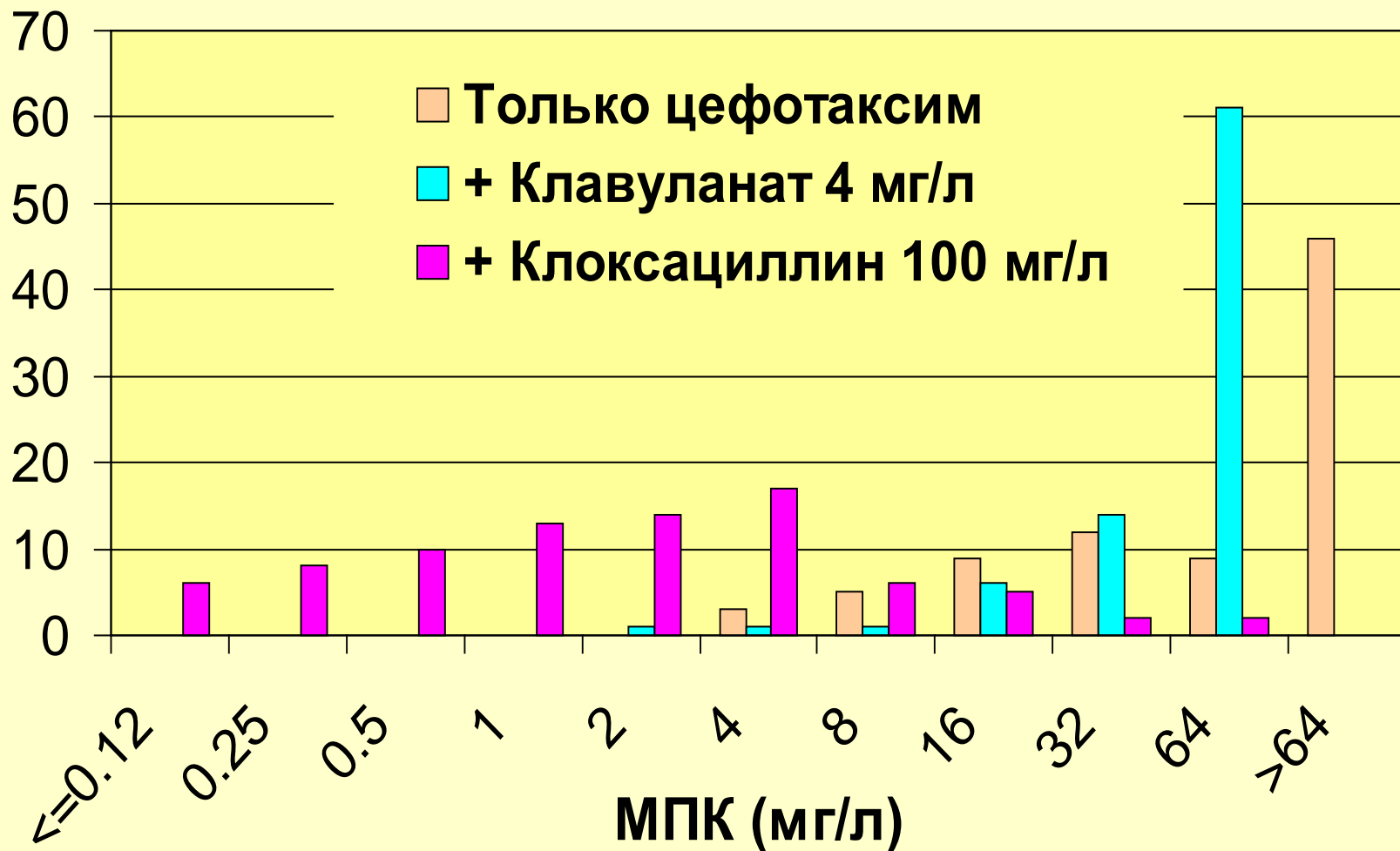


Fig. A: cefotetan +/- cloxacillin



Fig. B: cefoxitin +/- cloxacillin

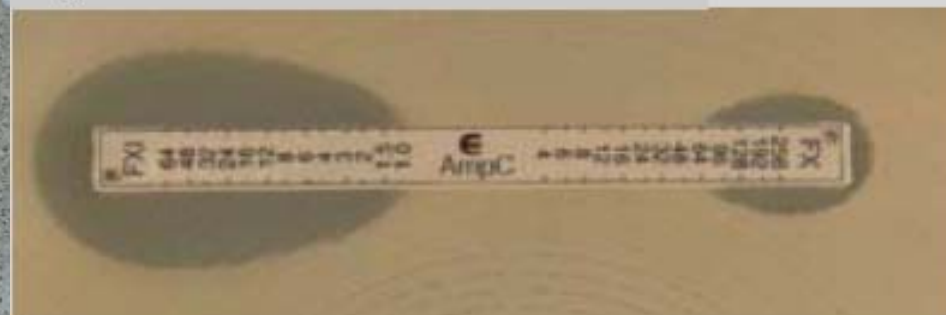


Fig. C: cefoxitin +/- cloxacillin






Fig. D: cefoxitin +/- boronic acid



Fig. E: EDTA synergy test

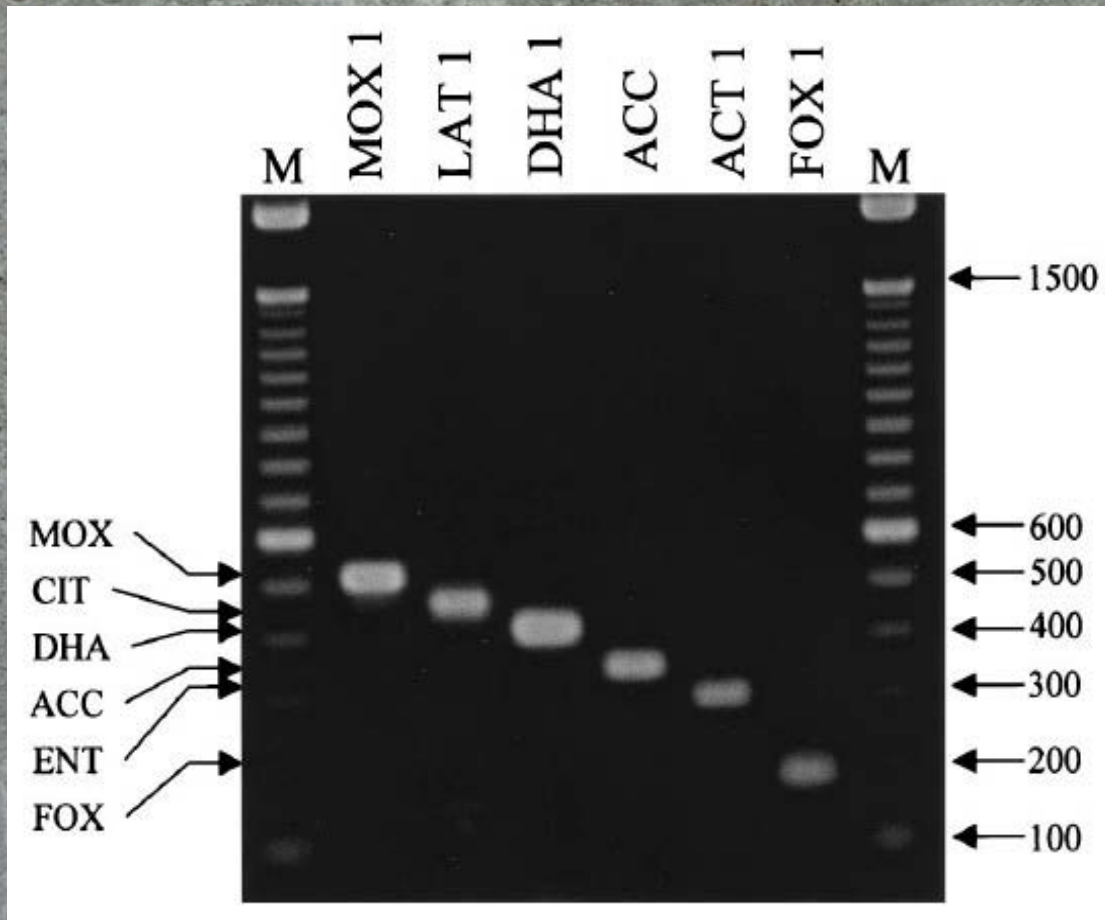


Коммерчески доступные тесты

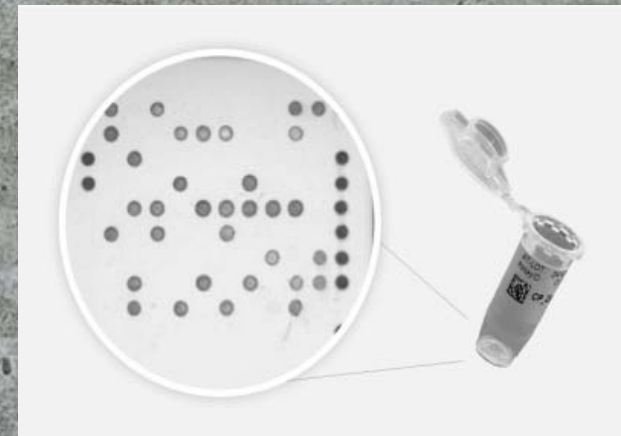
Наборы	Чувствительность	Специфичность
  AmpC набор ДИСКОВ	96 – 100%	98 – 100%
 «таблетки»	96%	92%
 AmpC градиентный тест	84 – 93%	70 – 100%

*J.Antimicrob.Chem. (2012) 67 2303; J.Med.Microbiol. (2011) 60 715; APMIS (2012) 120 724;
Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis (2013) 32 1205; J.Med.Microbiol. (2011) 60 715;
J.Clin.Microbiol. (2011) 49 2924.*

Мультиплексная ПЦР для детекции AmpC



Method of Perez-Perez & Hanson JCM (2002) 40 2153



Check-Points
гибридизационный чип

J.Antimicrob.Chemother. (2012) 67 1865

ПЦР позволяет различить плазмидо-опосредованную и конститутивную гиперпродукцию у *E. coli* and *Shigella* spp.

β-лактамазы расширенного спектра

- Молекулярный класс A (по Ambler)
- Большинство - плазмидоопосредованы
- Гидролизуют большинство пенициллинов и цефалоспоринов
 - в т.ч. второго, третьего, четвертого поколения; азтреонам
 - неактивны в отношении цефамицинов и карбапенемов
- Инактивируются ингибиторами β-лактамаз
 - Клавулановой кислотой, сульбактамом, тазобактамом
- Уровень продукции - различный, отличаются по своим свойствам и часто присутствуют в сочетании с другими механизмами резистентности
 - Большое разнообразие фенотипов резистентности

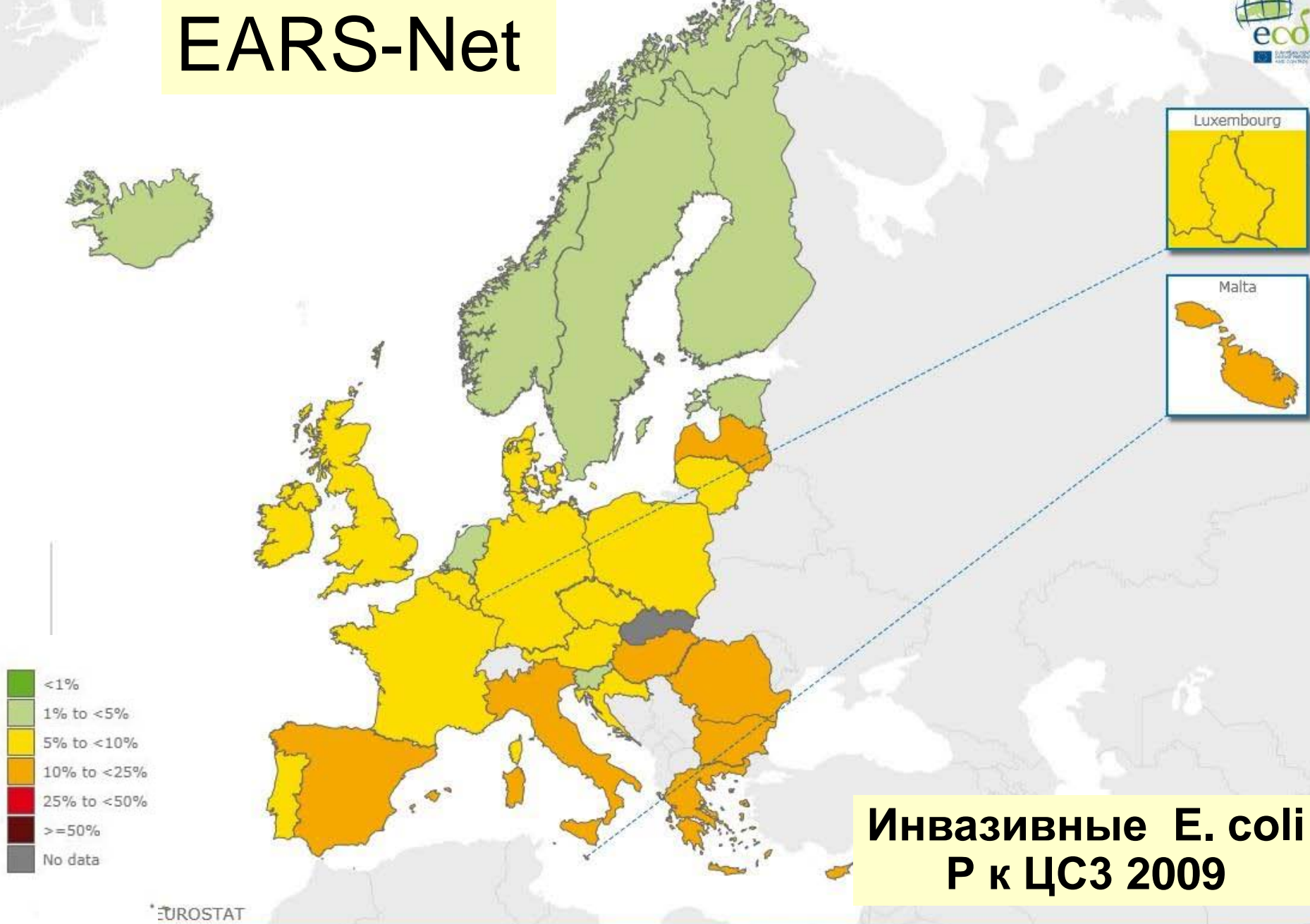
ESBL до 2000-х

- Замены аминокислот в TEM-1, TEM-2 и SHV-1
SHV-2 (1983) → SHV-182 (Dec 2013)
TEM-3 (1989) → TEM-216 (Dec 2013)
- Активный центр вмещает больше субстратов, главным образом у госпитальных штаммов *Klebsiella* spp.
- В основном вспышки, небольшое число эпидемических штаммов
e.g. K. pneumoniae K25 SHV-4 France
e.g. E. aerogenes TEM-24 Belgium
- Часто имеют сочетанную резистентность к аминогликозидам и фторхинолонам

ESBLs после 2000-х

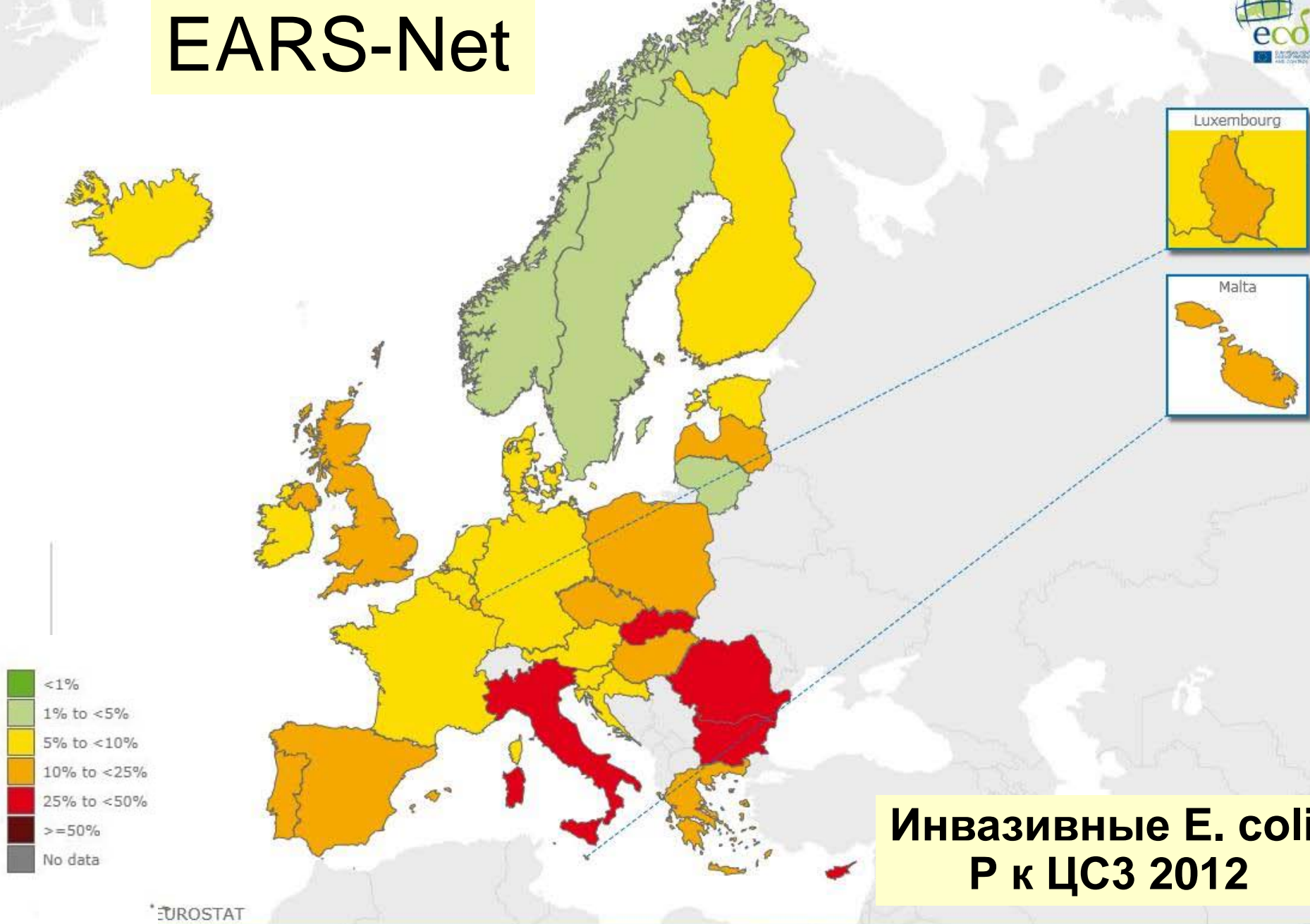
- СТХ-М ESBL
- Главным образом *E. coli*
- Не связаны с TEM и SHV
 - источник генов - *Kluyvera spp.*
- Цефотаксимазы чаще чем цефтазидимазы
 - Точечные мутации могут увеличить активность против цефтазидима
- Встречаются во внебольничной среде
 - амбулаторные больные, здоровые носители, больные и здоровые животные, в продуктах питания
- По крайней мере 9 кластеров

EARS-Net

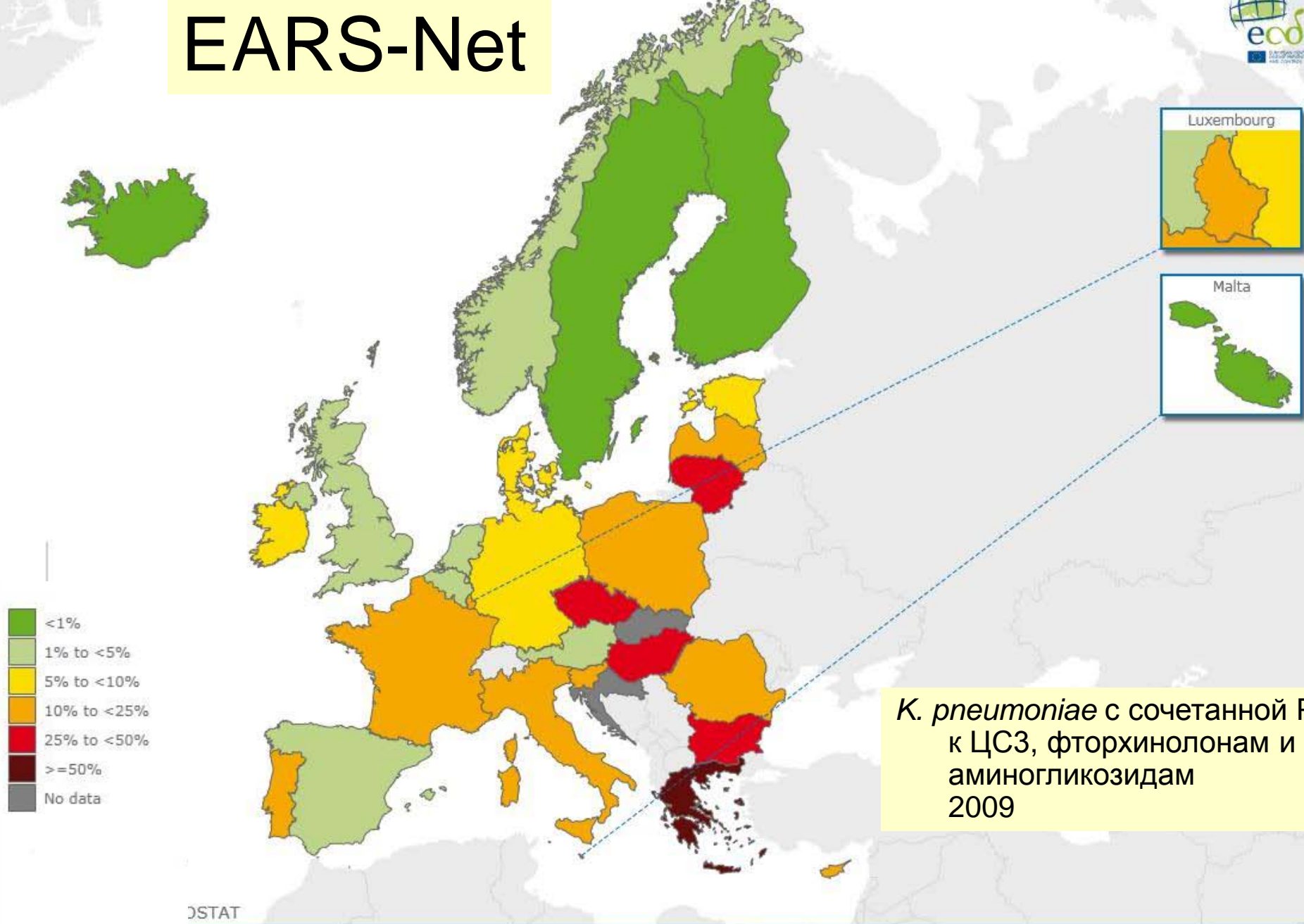


**Инвазивные E. coli
Р к ЦС3 2009**

EARS-Net

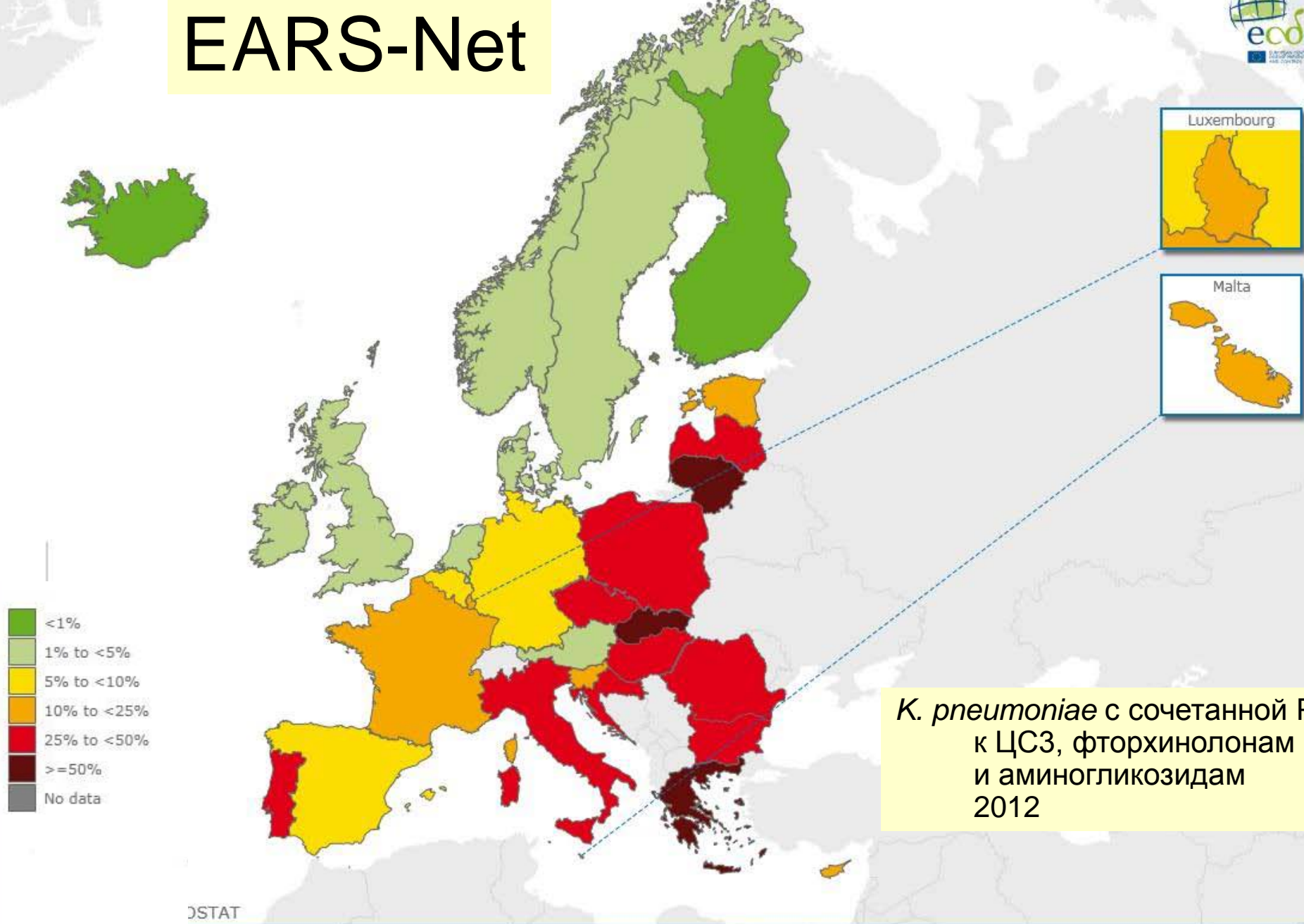


EARS-Net



K. pneumoniae с сочетанной Р
к ЦСЗ, фторхинолонам и
аминогликозидам
2009

EARS-Net



K. pneumoniae с сочетанной R к ЦСЗ, фторхинолонам и аминогликозидам 2012

Рост сочетанной R не наблюдается у *E.coli*, но, тем не менее, приводит к увеличению использования карбапенемов

Скрининг у Enterobacteriaceae

- Цефподоксим
 - > 1 мг/л, лучший субстрат чувствительный, но неспецифичный
- Цефотаксим (или цефтриаксон) и цефтазидим
 - 1 мг/л, хорошие субстраты для СТХ-М и TEM / SHV, соответственно; более специфичные
- Выявление синергизма цефалоспоринов с клавуланатом у резистентных изолятов
 - Цефуроксим или цефалексин не подходят для тестирования
 - Неприменимо для *Acinetobacter* (S к клавулановой кислоте)
 - Неприменимо для *S. maltophilia* (L-2 хромосомная β-лактамаза)



CPD
10

FOX
30

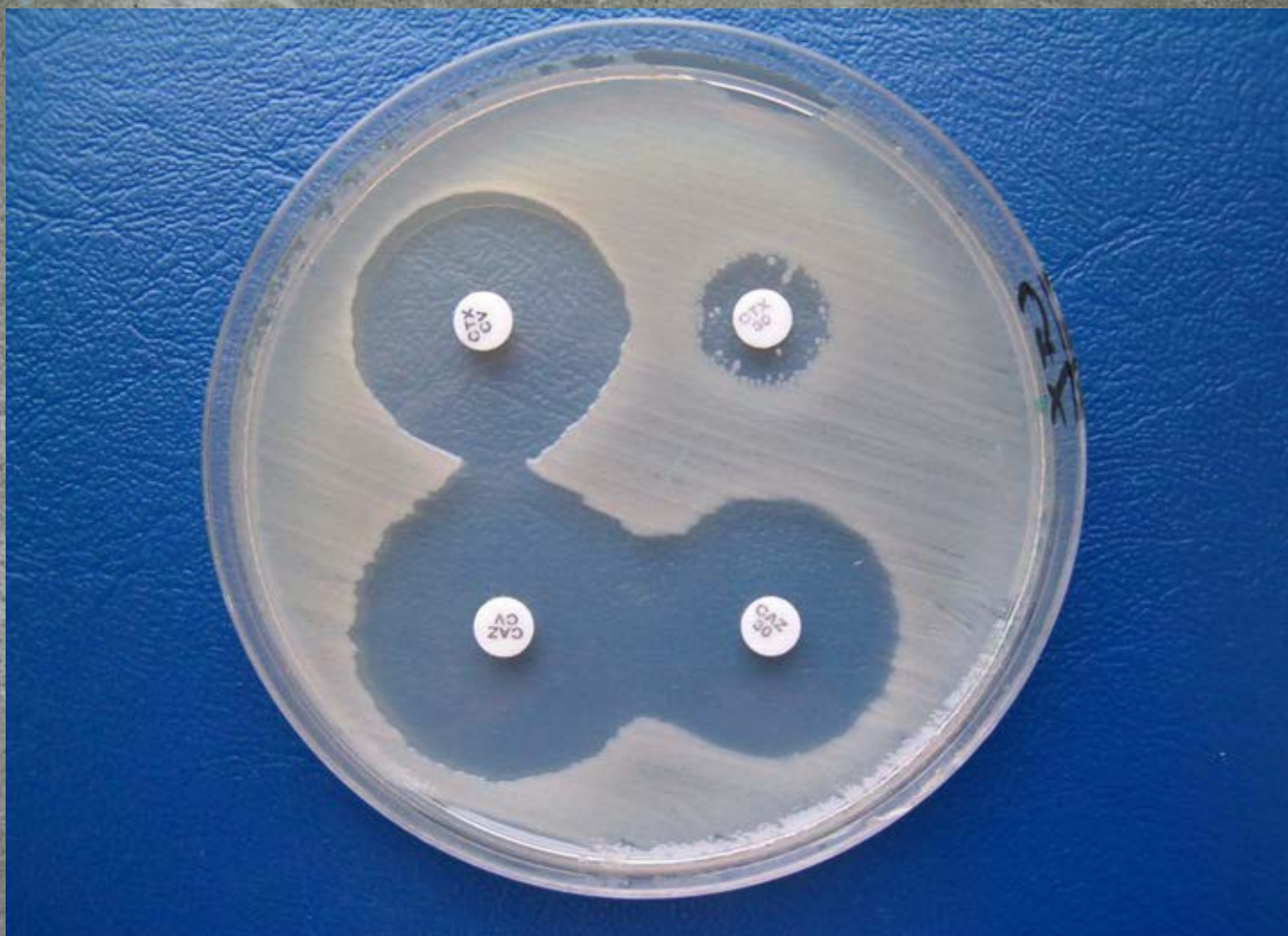
CD
1

CTX
30

AMC
30

G42
30

Комбинированные диски(СТХ-М-3)

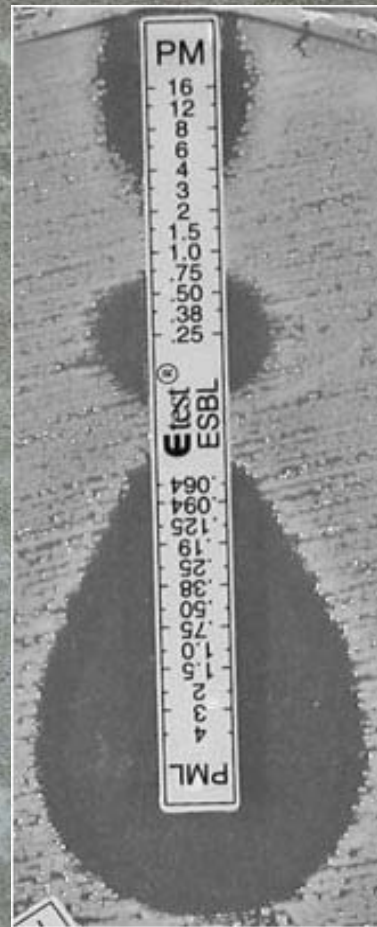


Тест на ESBL положительный, если зона задержки роста вокруг диска с clavulanовой кислотой больше на ≥ 5 мм, чем без нее

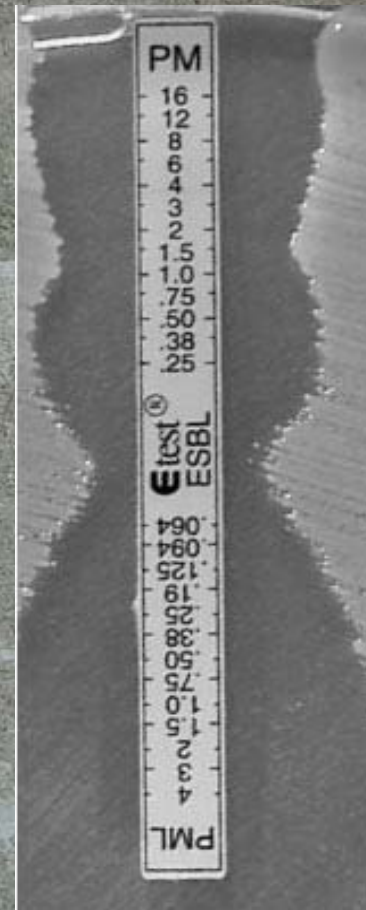
Градиентные тесты: E-test или MICE



Явный рез-т.



Фантомная зона



Деформация зоны

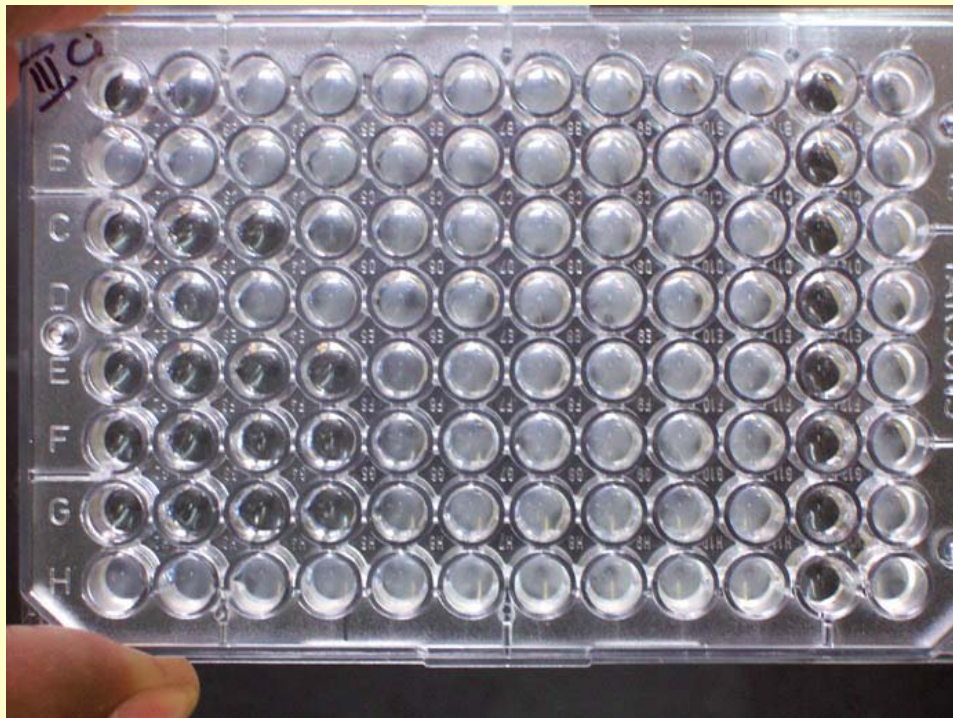


Неинтерпретируемый рез-т.

Положительный тест на ESBL при условии ≥ 8 -кратного изменения МПК в присутствии клавулоновой кислоты; при наличии «фантомной» зоны или деформации зоны

Микроразведения в бульоне

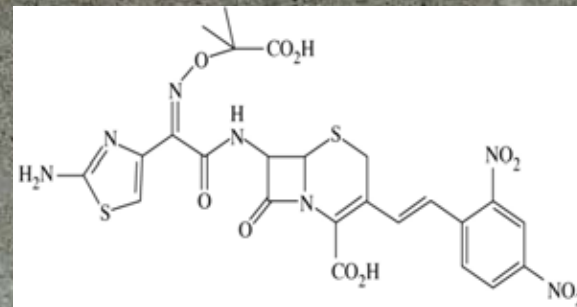
- Бульон Мюллера-Хинтон
- Последовательные двукратные разведения СТХ, СТЗ, FER 0.25 → 512 мг/л +/- клавуланат 4 мг/л



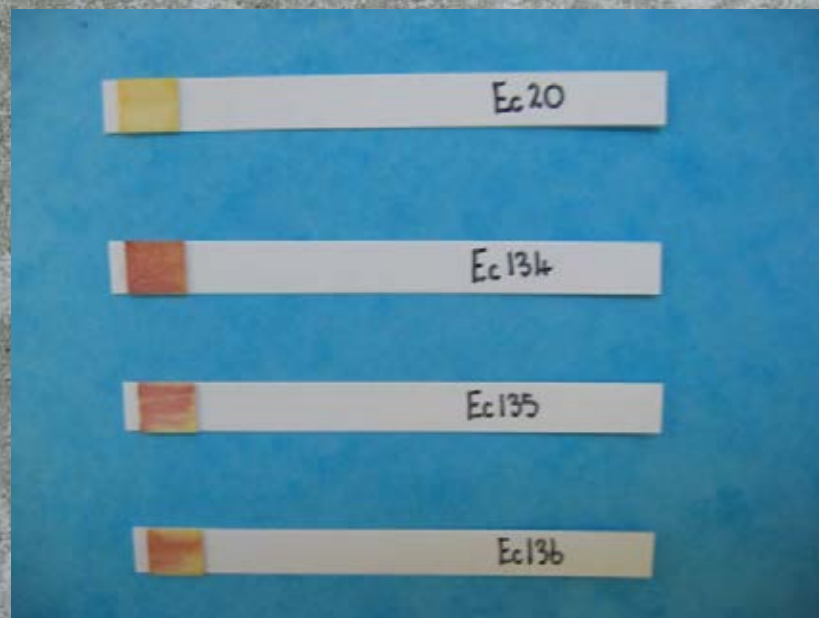
ESBL положит.

**≥ 8-кратное снижение
МПК в присутствии
клавулановой
кислоты**

Beta тесты



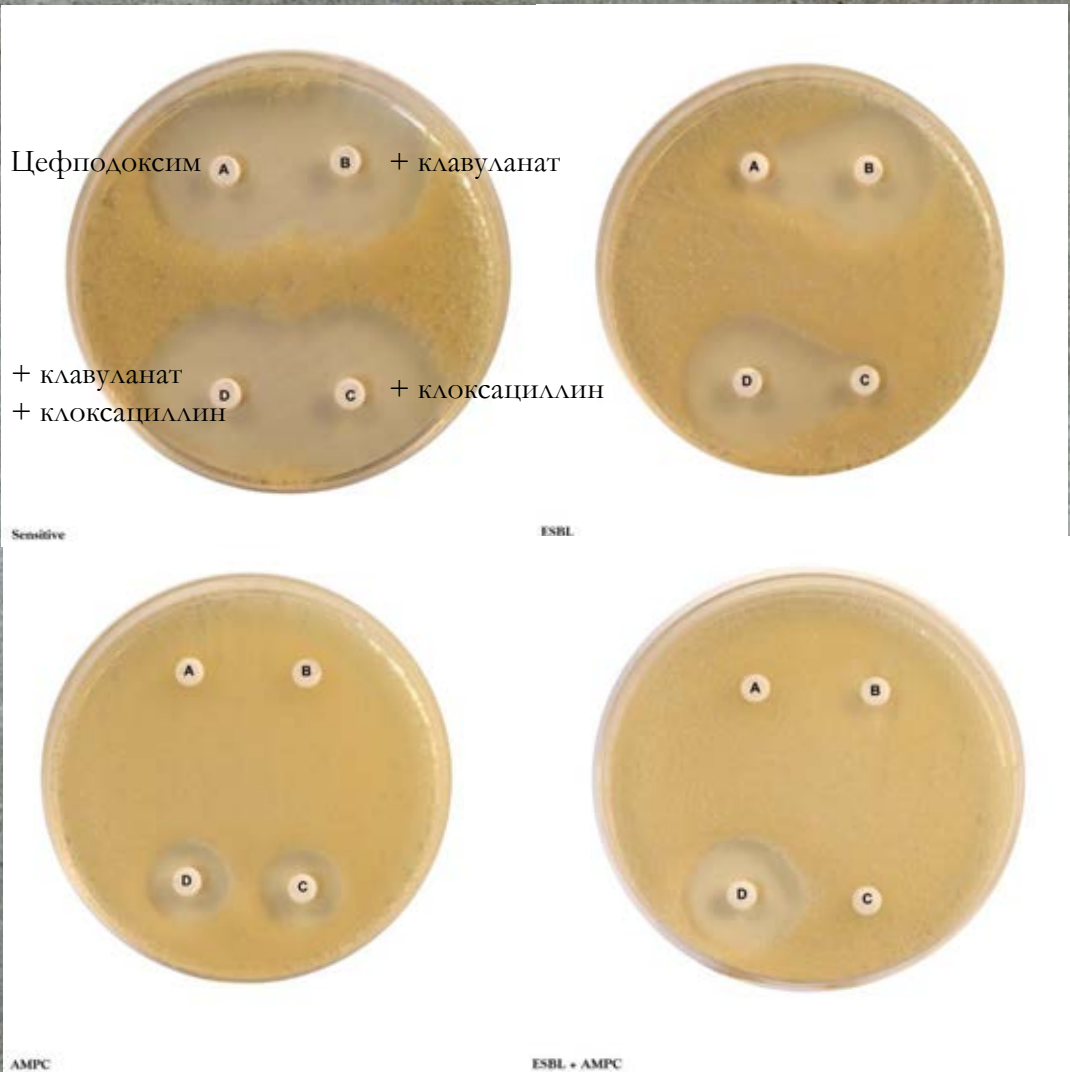
- Хромогенный цефалоспорин (HMRZ-86)
 - *ESBL* (клавулоновая кислота); *AmpC* (бороновая кислота); *MBL* (ЭДТА или меркаптоацетат натрия)



2-15 мин при комн. темп.

MAST D68C

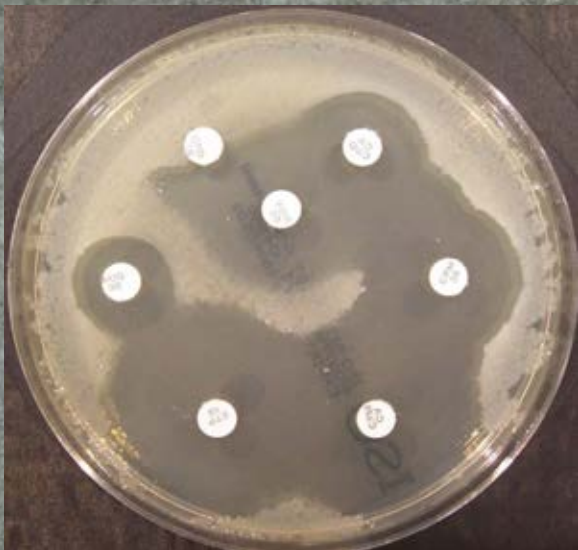
Чувствительный



ESBL

AmpC

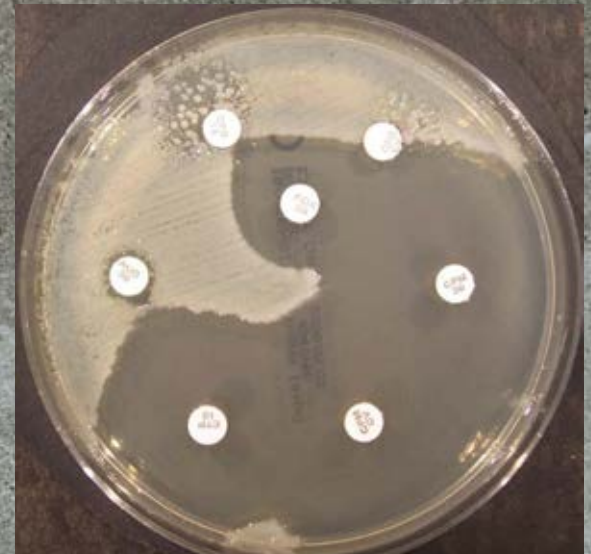
ESBL + AmpC



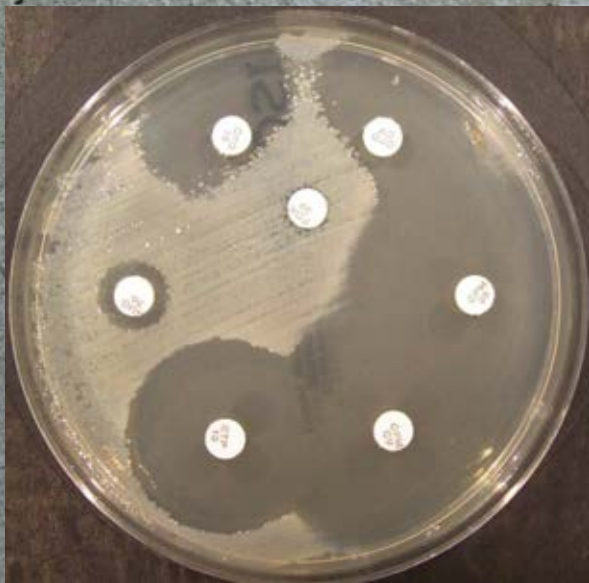
ESBL



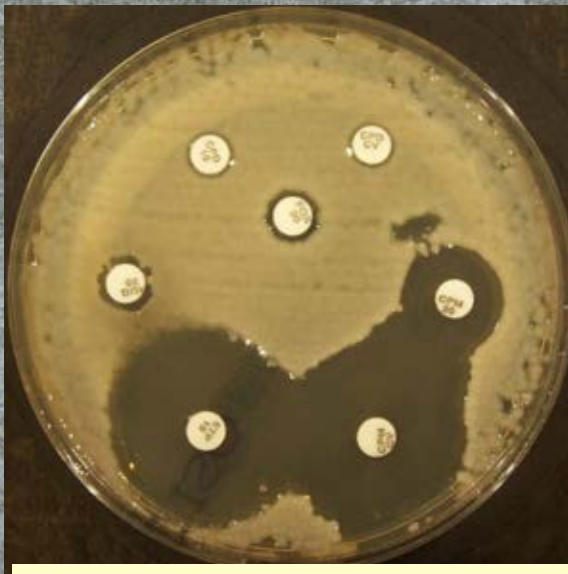
Derepressed AmpC



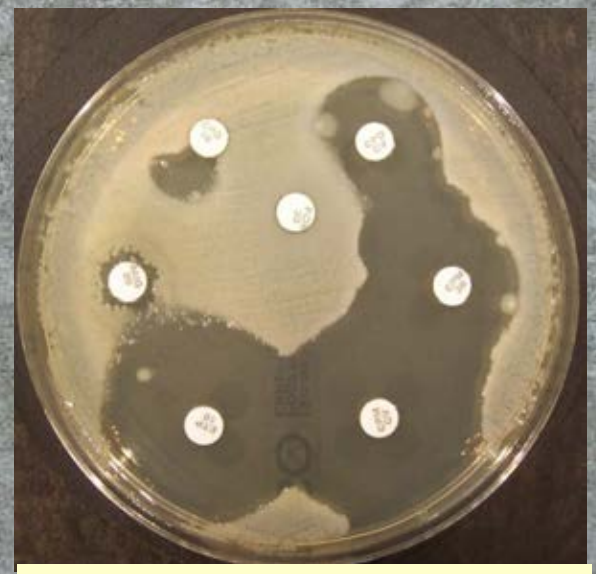
M. morganii AmpC



Inducible AmpC



ESBL + AmpC



ESBL + inducible AmpC

Ложноположительные результаты

- *K. oxytoca*
гиперпродукция K1 β-лактамазы
- *P. vulgaris*, *C. koseri* (*C. sedlakii*,
C. farmeri, *C. amalonicus*), *Kluyvera*
spp.
хромосомные β-лактамазы подавляются
клавуланатом
- Гиперпродукция SHV-1, TEM-1 или
OXA-1 + изменение проницаемости



Прогностическая ценность положительного результата (PPV)

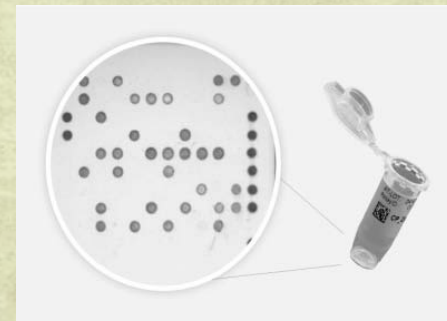


Скрининг	PPV
Vitek 2	69%
Phoenix	68%
Диско-диффузионный метод	92%
Подтверждение	PPV
Etest	61%
Комбинированные диски	91%



Генотипическая детекция ESBLs

- ПЦР и секвенирование генов ESBL
- Check-Points ESBL / KPC микрочип



Определение TEM и SHV ESBL; CTX-M групп 1, 2 и 9
Невозможно определить редко встречающиеся и
новые гены ESBL

Видоспецифические карбапенемазы

- *Stenotrophomonas maltophilia*; *Aeromonas* spp.; хризеобактерии
 - например, *Elizabethkingia meningoseptica*
- *Acinetobacter baumannii*
 - природные ОХА-51-подобные, экспрессируемые в результате активации генов
- Большинство ГНБ резистентны к эртапенему (но не другим карбапенемам)
- *Serratia* spp. и *Proteus* spp. обладают низким уровнем R к имипенему

Приобретенные карбапенемазы

Класс А

K. pneumoniae carbapenemase (KPC)

Наиболее распространенные карбапенемазы в Европе. Эндемичны в США, Греции, Италии, Израиле, Китае. Спорадически встречающиеся - GES / IMI / NMC / SME. Эпидемический клон (ST258).

Класс В

Металло- β -лактамазы (MBL)

В Великобритании – NDM, VIM и редко IMP. Спорадически AIM / DIM / GIM / SPM (еще нет в U.K.). NDM широко распространены на территории Индийского субконтинента и на Ближнем Востоке – медицинский туризм

Класс D

OXA-48 и родственные у Enterobacteriaceae

*OXA-23, -40, -58-подобные, -143-подобные у Acinetobacter spp.
OXA-198 у Pseudomonas spp.*

Эпидемиология

Figure 3.13. *Klebsiella pneumoniae*. Percentage (%) of invasive Isolates with resistance to carbapenems in EU/EEA countries, 2012

- < 1%
- 1% to < 5%
- 5% to < 10%
- 10% to < 25%
- 25% to < 50%
- ≥ 50%
- No data reported or less than 10 isolates
- Not included



- Non-visible countries
- Liechtenstein
 - Luxembourg
 - Malta

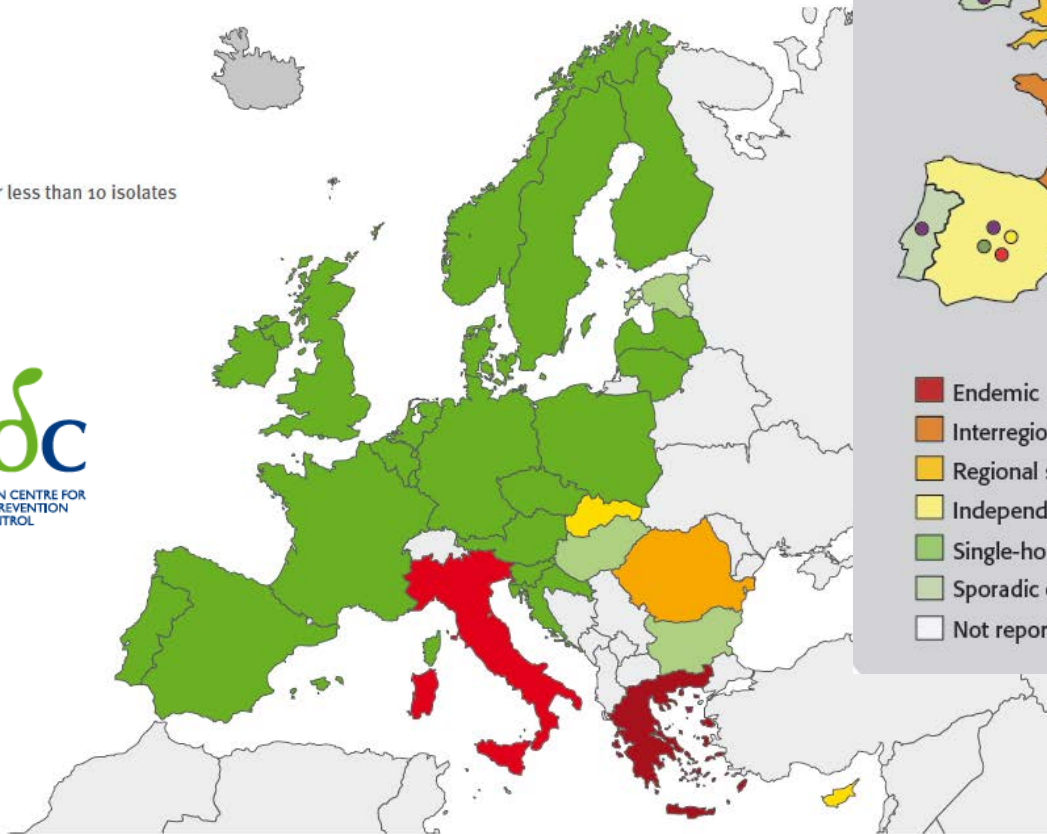
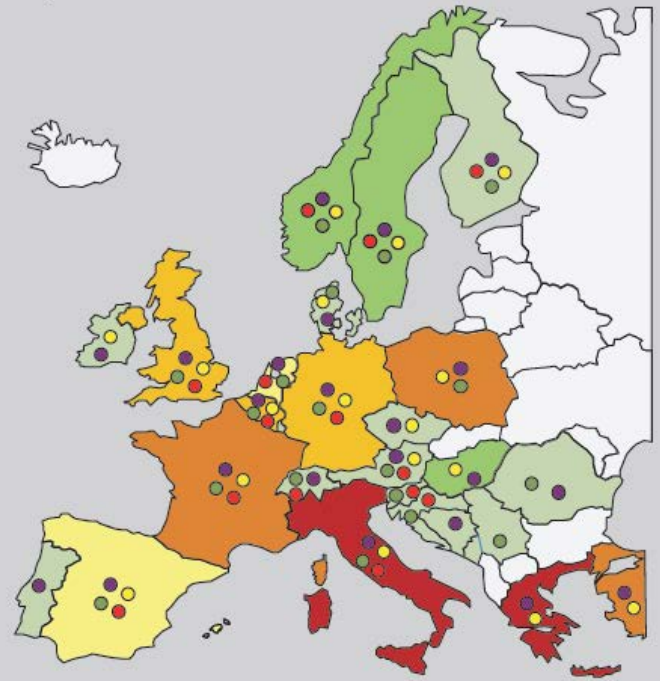


FIGURE 1

European situation regarding carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, using an epidemiological scale of nationwide expansion and carbapenemase types in different countries or geographical areas known until January 2012. Reproduced from citation (1).



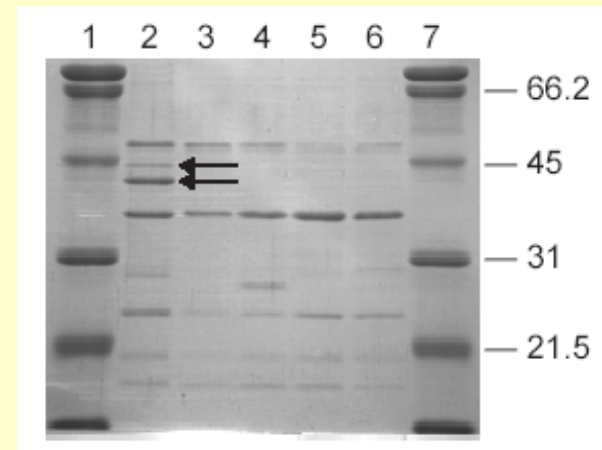
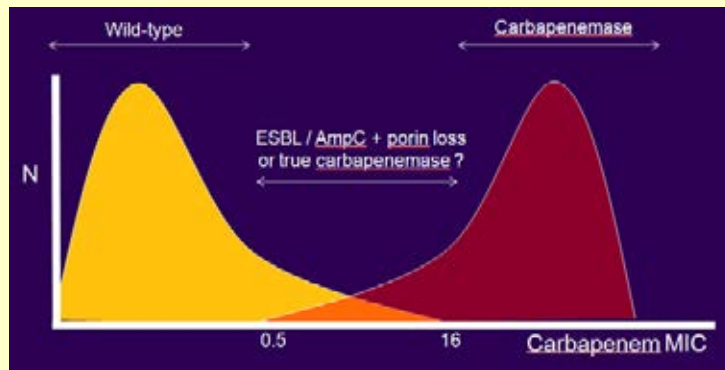
- Endemic
- Interregional spread
- Regional spread
- Independent hospital outbreaks
- Single-hospital outbreaks
- Sporadic occurrence
- Not reported / no data
- KPC
- VIM
- NDM
- OXA-48
- Other countries:
 - Israel
 - Luxembourg

Резистентность к карбапенемам – другие механизмы

Enterobacteriaceae с ESBL или AmpC могут утрачивать порины

Распространение менее вероятно из-за невозможности горизонтальной передачи и снижения адаптивности. Преимущественно Enterobacter spp. и Klebsiella spp.

В основном маркером является устойчивость к эртапенему



Утрата OprD (D2) порина у *P. aeruginosa*

R к имипенему, но не к другим β-лактамам. R к меропенему, в отличие от имипенема, зависит от активации эффлюкса (MexAB-OprM)

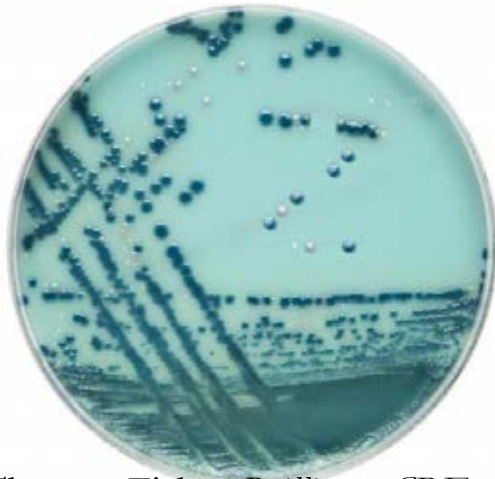
R к карбапенемам, не связанная с карбапенемазами, у *Acinetobacter* spp.?

Вероятно вследствие неспособности обнаружения ОХА ферментов

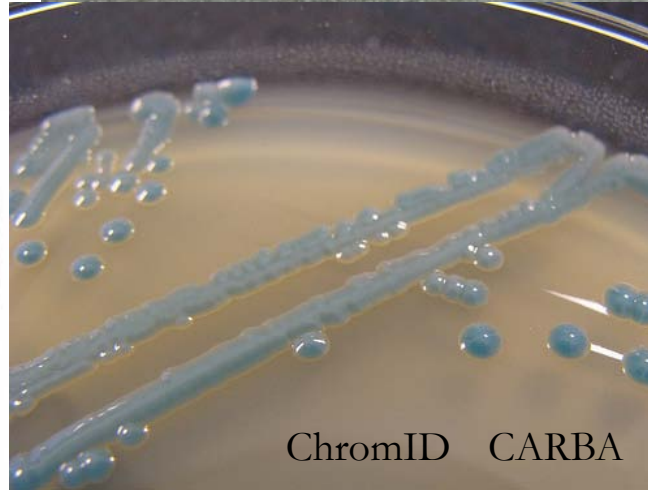
Проблема



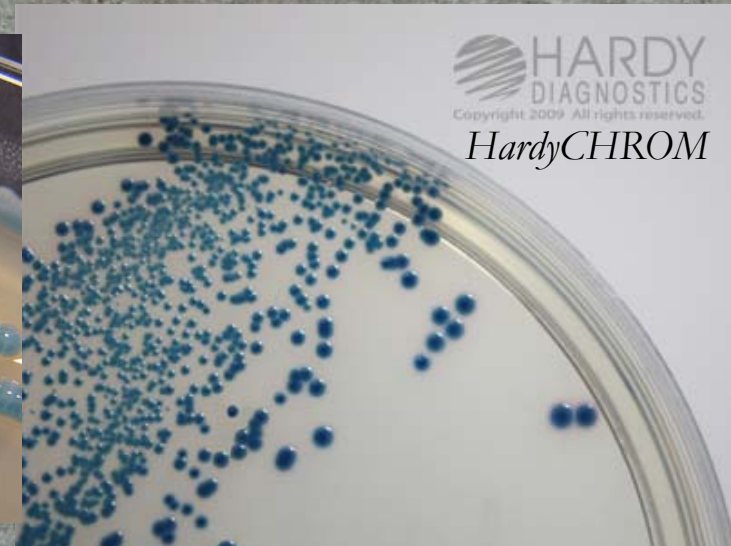
Первичный скрининг в образцах стула / ректальных тампонов



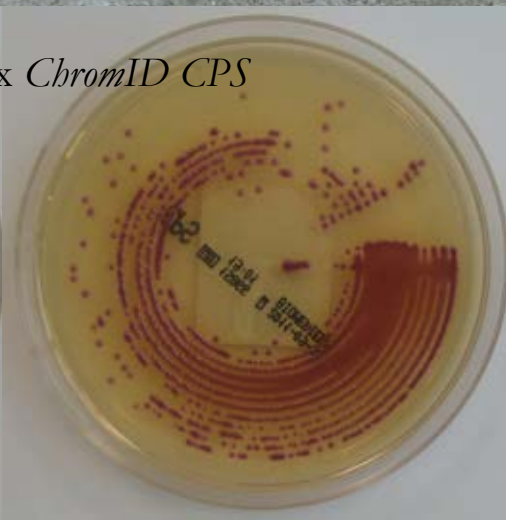
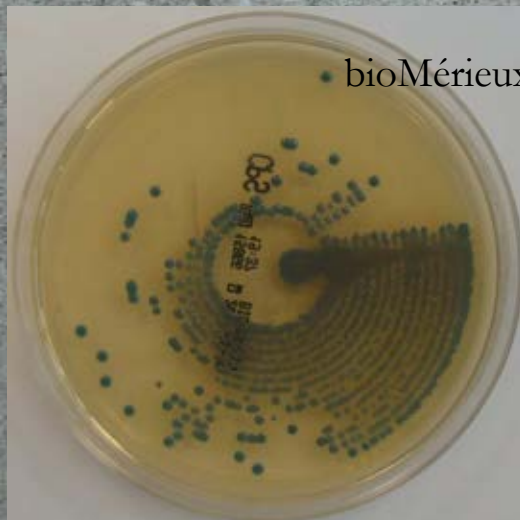
Thermo Fisher *Brilliance CRE*



ChromID CARBA



bioMérieux *ChromID CPS*



Mast *ChromAGAR KPC*
(*Colorex KPC*)

SUPERCARBA

Cloxacillin + zinc +
ertapenem

Превосходная
чувствительность/
специфичность

EUCAST

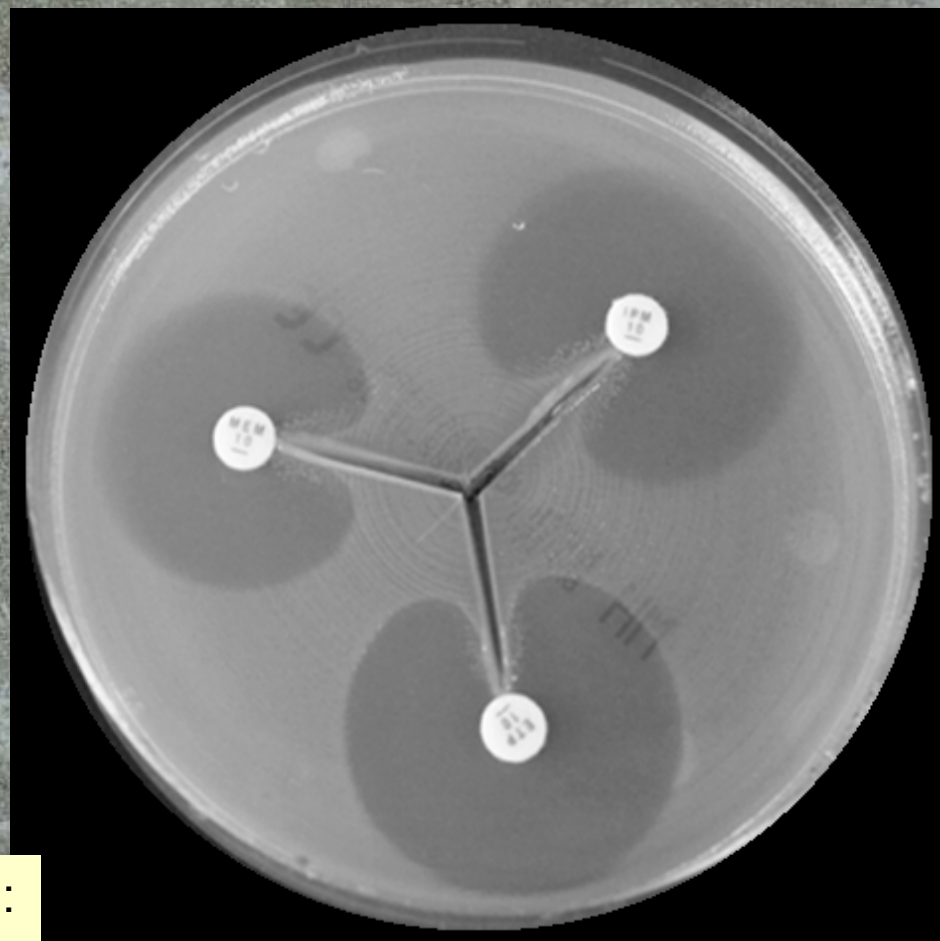
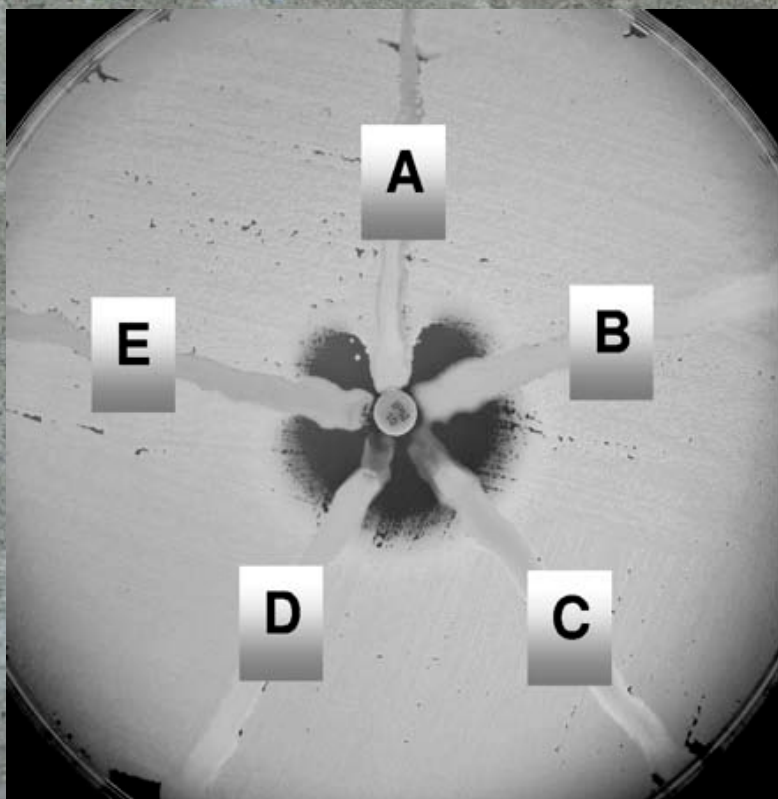
Карбапенем	МПК (мг/л)		Зона 10 мкг (мм)	
	S / I погр. знач.	Скрининг	S / I погр. знач.	Скрининг
Меропенем ^a	≤ 2.0	> 0.125	≥ 22	< 25
Имипинем ^b	≤ 2.0	> 1.0	≥ 22	< 23
Эртапенем ^c	≤ 0.5	> 0.125	≥ 25	<25

^a Лучшее соотношение чувствительности и специфичности

^b Не рекомендуется в качестве самостоятельного субстрата для скрининга

^c Высокая чувствительность, но низкая специфичность

Модифицированный тест Ходжа



Диски 10 мкг. Метод не рекомендуется: результат сложен для интерпретации; чувствительность и специфичность довольно низкие.

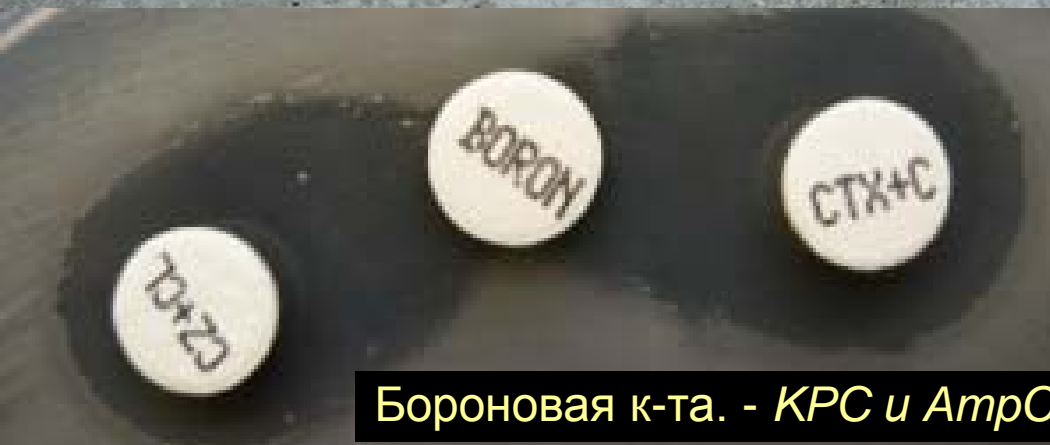
Ингибиторы



Клоксациллин - *AmpC*



ЭДТА / дипиколиновая к-та. - *MBL*



Бороновая к-та. - *KPC* и *AmpC*



Диагностический тест

Определение карбапенемаз

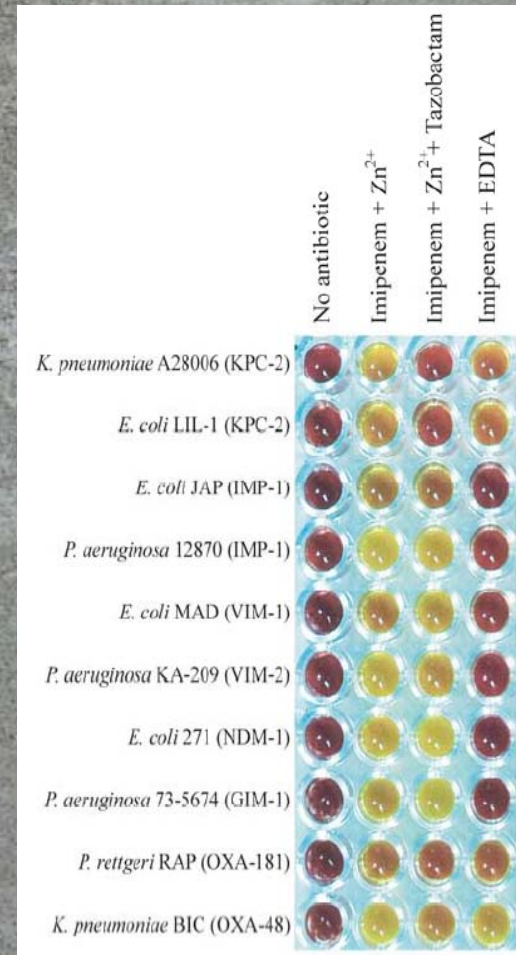
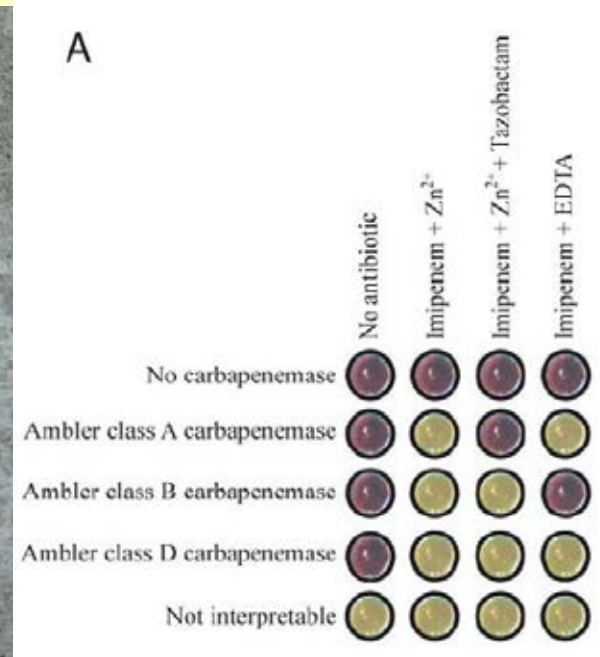
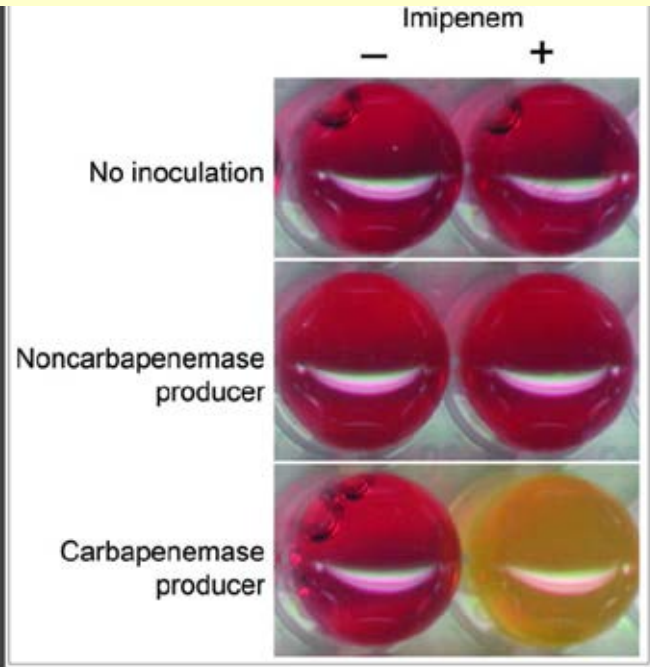
	Бороновая к-та.	Клокса-циллин	ДПК или ЭДТА	Клавуланат или тазобактам	Темоциллин R Пиперациллин-тазобактам R	Азтреонам
KPC	+	-	-	Слабые	- / +	R
AmpC	+	+	-	-	- / +	R
MBL	-	-	+	-	- / +	S
OXA-48	-	-	-	-	+	S

Комбинированные диски (Mast, Rosco) – увеличение зоны задержки роста на > 5 мм для дисков 10 мкг; Двусторонние E-тесты; разведения в агаре с ЭДТА (320 мг/л) – снижение МПК в ≥ 8-раз. Темоциллин > 32 мг/л. Выполняется на агаре Мюллера-Хинтон. 18 часов.

Carba-NP тест

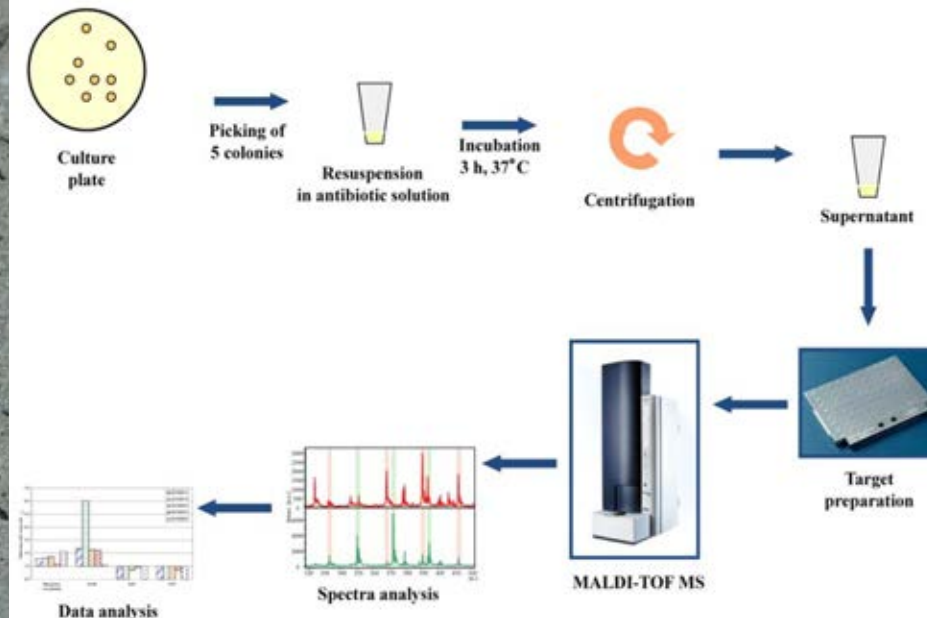
Ацидометрический тест.

Карбапенем инкубируют с тестируемой культурой < 2 часов. Можно использовать ингибиторы для определения класса β-лактамаз. Метод требует валидации.

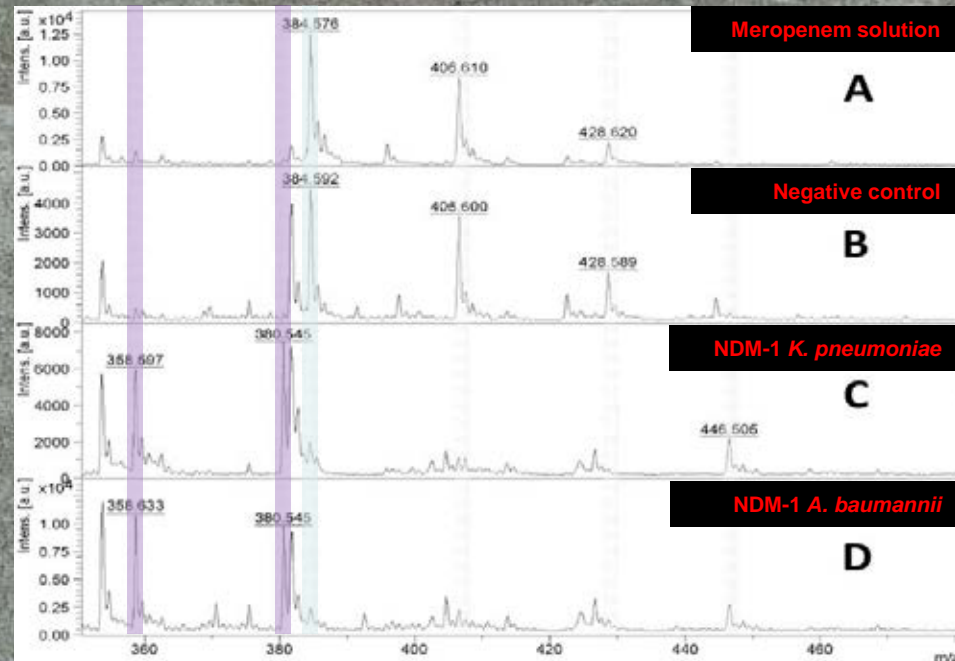


MALDI-TOF MS

Preparation scheme for the detection of β -lactamase activity



(Ledeboer, N. A. et al. 2011)



(Hrabák J et al. 2012)

Вследствие гидролиза молекулы карбапенема изменяется ее масса. < 2 часа. Нет ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов.

Потенциально может применяться для изучения других механизмов резистентности. Метод требует валидации.

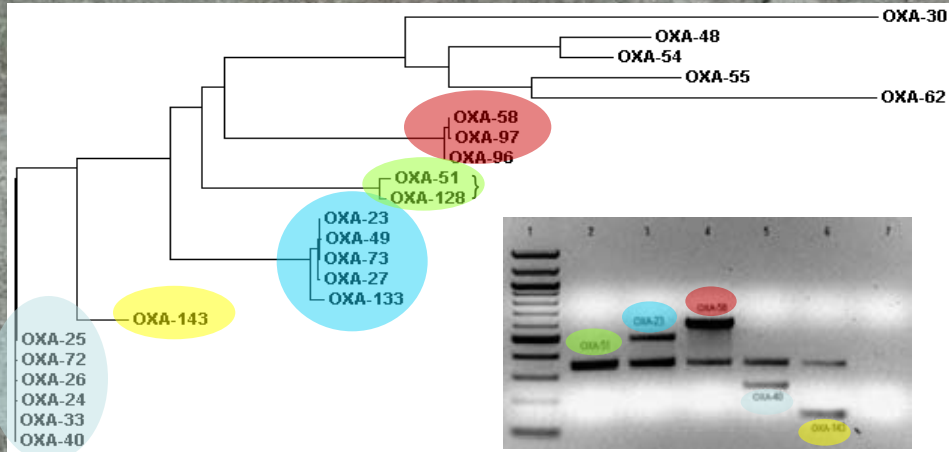
ДНК - тесты: ПЦР



Распространенные TEM и SHV ESBL, CTX-M групп 1, 2 и 9

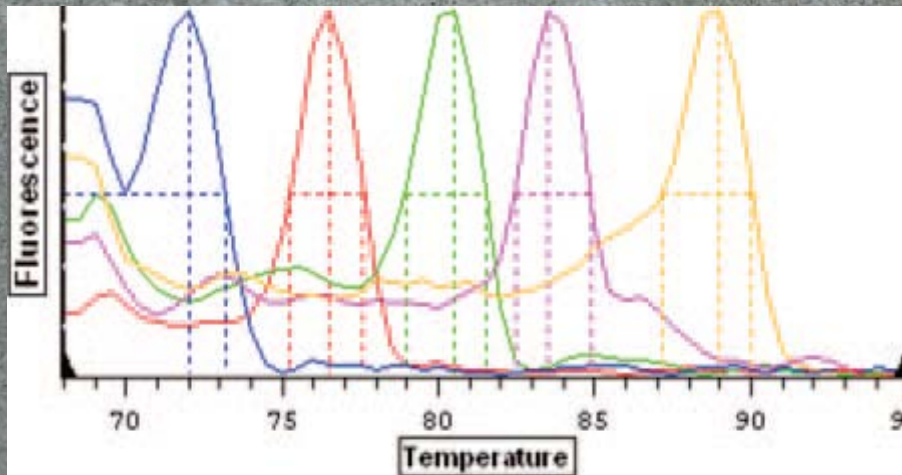


Все варианты NDM, KPC и OXA-48; частые IMP и VIM



(Woodford et al. 2006; Higgins et al. 2010)

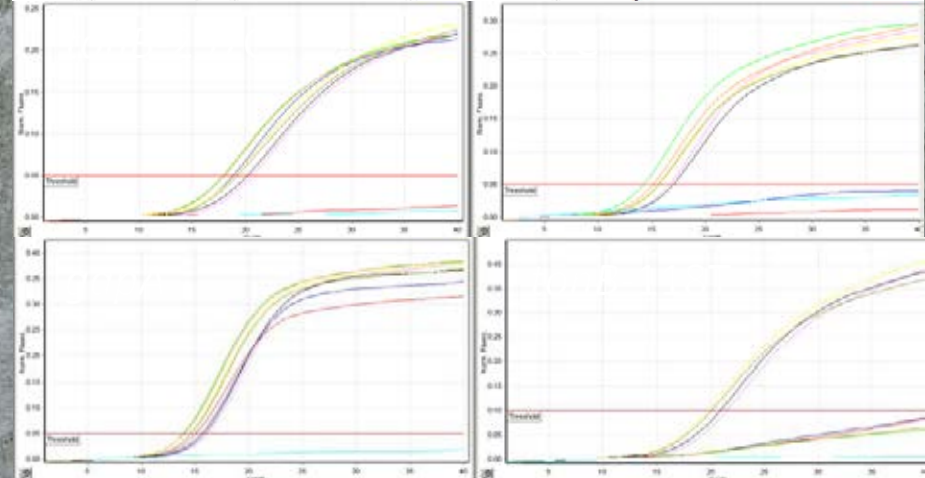
GIM IMP SIM SPM VIM



(Mendes et al. 2007)

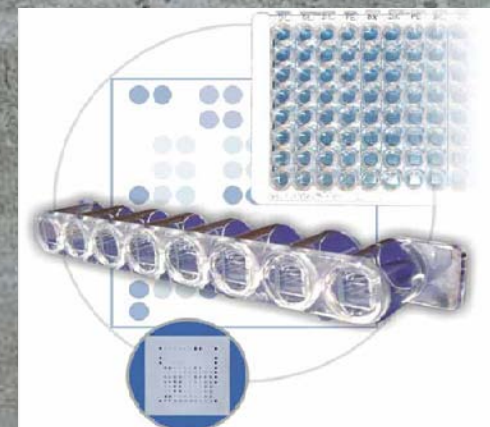
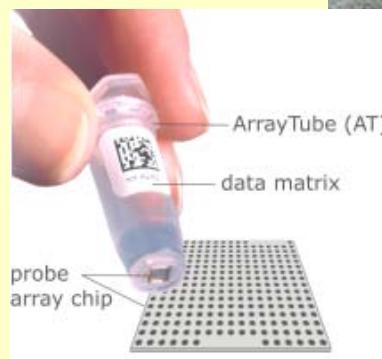
Multiplex Real-Time PCR for Detection of an Epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 Clone

Liang Chen,^a Kalyan D. Chavda,^a José R. Medlavilla,^a Yanan Zhao,^a Henry S. Fraimow,^b Stephen G. Jenkins,^c Michael H. Levi,^d Tao Hong,^a Albert D. Rojzman,^e Christine C. Ginocchio,^g Robert A. Bonomo,^h and Barry N. Kreiswirth^a

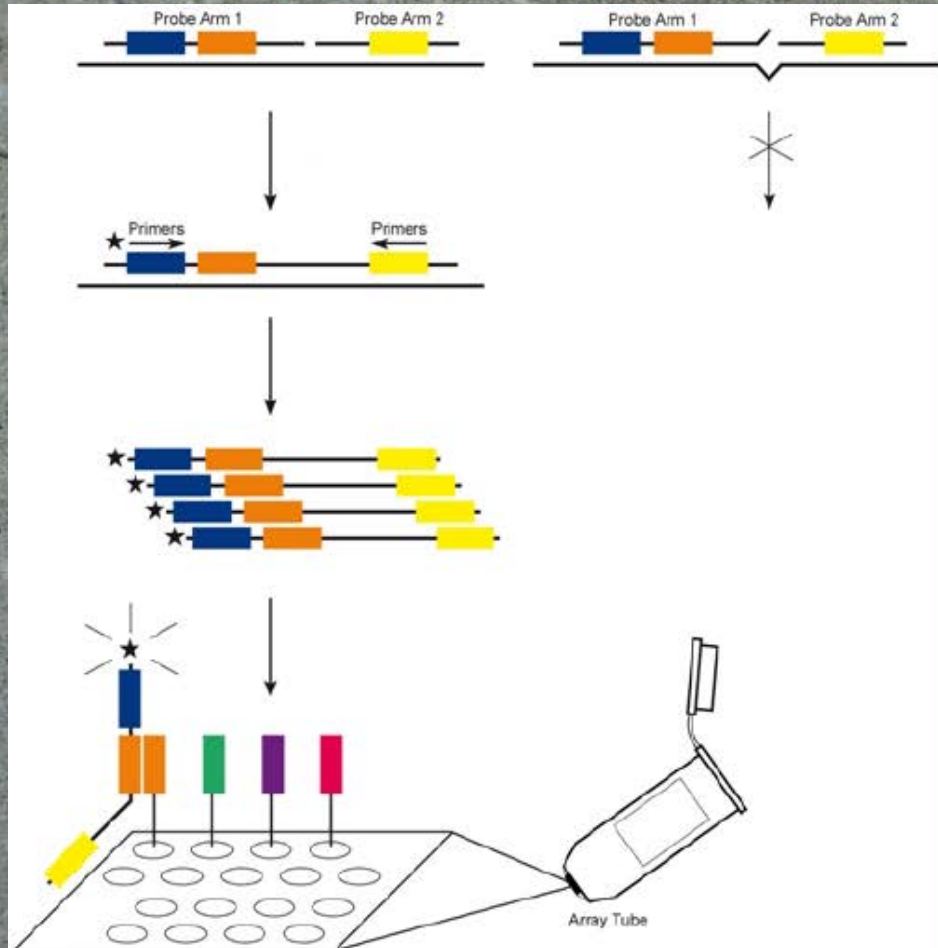


ДНК-микрочипы

- Clondiag Chip Technologies
 - ESBL
 - AmpC
 - Карбапенемазы
 - *и т.д.*
- Checkpoints CT-102



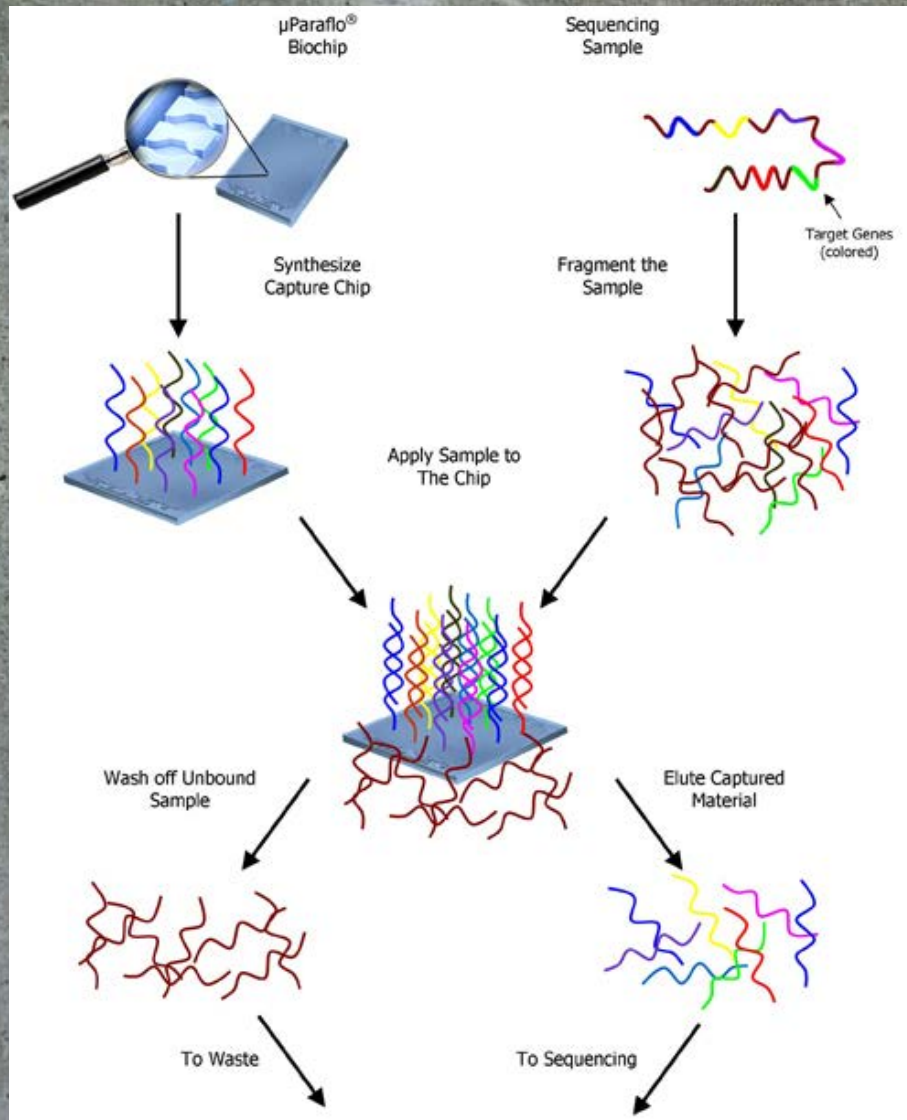
Микрочипы Checkpoints



	Array +ve	Array -ve
OXA-48 (11)	11	0
KPC (8)	8	0
IMP (12)	12	0
VIM (3)	3	0
NDM (7)	7	0
Imperm (16)	0	16
-ve Controls (7)	1	6

<http://www.check-points.com>

Секвенирование нового поколения



Полногеномное секвенирование

- Резистентность
- Вирулентность
- Эпидемичность
- типирование e.g. MLST
- Биомаркеры:
 - резистентности
 - патогенности
 - генетической адаптации
- *настольные системы*
 - 48 часовой цикл
- *Высокая пропускная способность*
 - одновременно до 100 геномов

Carbapenemases @ AMRHA1

Тест с ЭДТА «+»

- Мультиплексная ПЦР
 - *IMP, VIM, GIM, SPM, SIM*
- Моноплексная ПЦР на NDM
 - *NDM* может выполняться первично в случае истории путешествий (в эндемичные районы) и *R* ко всем аминогликозидам

SIM: 570-bp

GIM: 477-bp

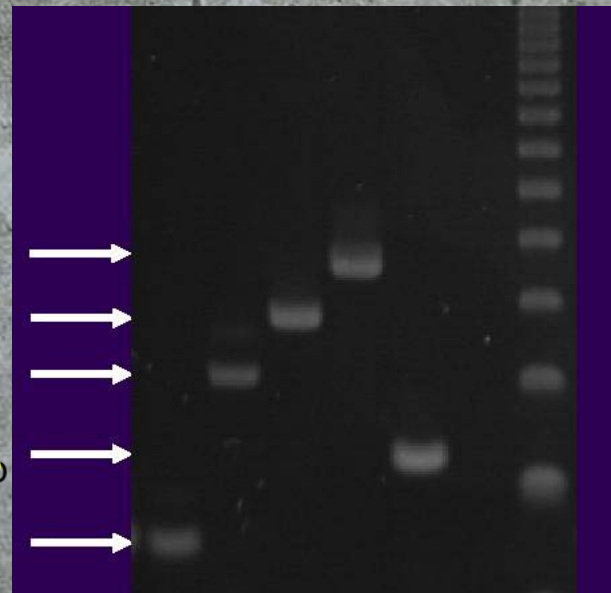
VIM: 390-bp

SPM: 271-bp

IMP: 188-bp

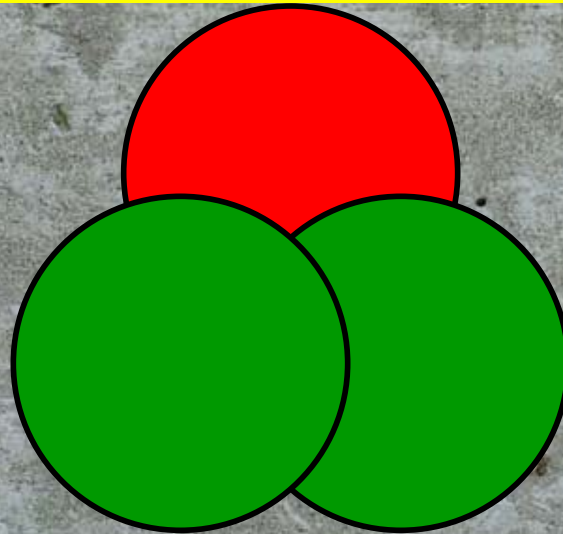
Тест с EDTA «-»

- Моноплексные TaqMan ПЦР
 - *OXA-48; KPC; IMI; NMC; SME; GES*



Важность определения

Определение категории чувствительности



Инфекционный контроль

Общественное здоровье

Позиция EUCAST по AmpC, ESBL и карбапенемазам:

Более низкие пограничные значения (S/I/R) позволяют выдавать результат определения чувствительности без коррекции - «как есть».

ESBL – терапевтическая эффективность может быть непредсказуемой при различных инфекциях кроме ИМП.

Рекомендуется использовать карбапенемы с «крайней осторожностью» при тяжелых инфекциях, вызванных продуцентами карбапенемаз, и избегать назначения в виде монотерапии.