



СВФУ

СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.К. АММОСОВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Ахременко Я.А.

К.м.н., доцент, зав. курсом микробиологии и иммунологии МИ
СВФУ

- Приобретенные карбапенемазы у Enterobacterales
- БЛРС
- Приобретенные БЛ у Enterobacterales (AmpC)
- Приобретенные карбапенемазы у НГОБ
- Резистентность к полимиксину у Грам(-) бактерий
- Резистентность к метициллину у стафилококков
- Резистентность к гликопептидам у энтерококков
- Нечувствительность к пенициллину у пневмококков

Российские рекомендации по выявлению наиболее важных механизмов антибиотикорезистентности

Стафилококки

Род *Staphylococcus*

>35 ВИДОВ

Коагулазопозитивные стафилококки:

S. aureus, *S. intermedius*, *S. hyicus*

Коагулазонегативные стафилококки:

S. epidermidis, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. capitis* и др.

Вопросы терминологии

- В лаборатории используем оксациллин или цефокситин
- Говорим о метициллинрезистентности (MRSA)
 - Подразумеваем клиническую устойчивость ко всем бета-лактамам

Первая "MRSA-волна" - 60-ые годы XX века

- Метициллин начал использоваться **1959** году как первый пенициллин, устойчивый к β -лактамазам
- Метициллин-резистентный *S. aureus* впервые описан **в 1961 году**
- Распространение одного архаичного клона по всему миру

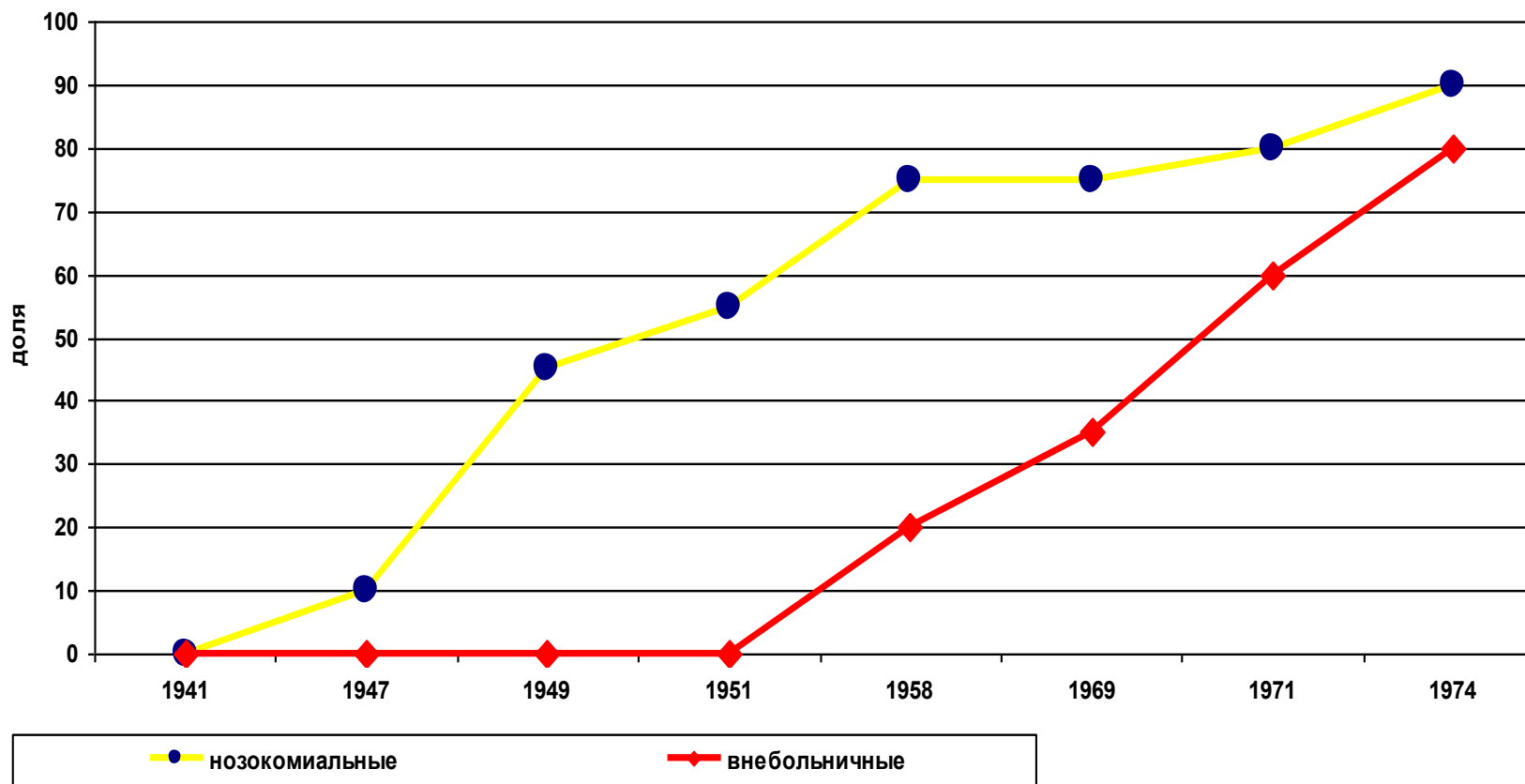
Вторая “MRSA-волна” -80-ые годы XX века

- Вспышки в больницах
- Идентификация эпидемических штаммов
- Появление штаммов, устойчивых к гентамицину

Третья "MRSA-волна"- с конца 90- годов XX века

- 5 (11) доминирующих клонов среди госпитальных MRSA
- Выделение MRSA у амбулаторных пациентов (появление популяционного MRSA или с-MRSA)
- Появление штаммов со сниженным уровнем чувствительности к ванкомицину (VISA) и ванкомицинрезистентных (VRSA) 2002г.

Общие тенденции роста числа штаммов, резистентных к пенициллину, среди нозокомиальных и внебольничных S.aureus



Механизмы резистентности к бета-лактамам

- Резистентность к пенициллину и аминопеницилинам связана с продукцией пенициллиназ (класс А)
- MRSA = устойчивость к оксациллину, метициллину и другим бета-лактамам; определяется наличием дополнительного ПСБ, кодируемого геном *mecA*
- *mecA* входит в состав генетических элементов SCC_{mec}

Кассета метициллин-резистентности

- SCCmec - Staphylococcal Cassette Chromosome
mec
- представляет собой «геномный остров»,
содержащей множество генов и мобильных
генетических элементов
- способы распространения не ясны

MRSA =

**МЕТИЦИЛЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫЕ S.aureus =
МНОЖЕСТВЕННОРЕЗИСТЕНТНЫЕ S.aureus**

Резистентны ко всем бета-лактамным антибиотикам
(пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы),
макролидам, аминогликозидам, фторхинолонам и др.

Чувствительны только к гликопептидам: ванкомицин, тейкопланин

оксазалидонам: линезолид

Антибиотик	Диск, мкг	Стандарт Ч \geq	Стандарт Р <	Интерпретация результата (Ч/У/Р)	Примечание
Цефокситин-скрининг* - <i>S. aureus</i> и КНС - <i>S. epidermidis</i>	FOX 30	22 25	22 25	При Р – стафилококк считается метициллин Резистентным	В бланке ставится оксациллин
Клиндамицин**	DA 2	22	19	Выявляется Д-феномен	Диски всегда должны лежать рядом
Эритромицин***	E 15	21	18		
Гентамицин	CN 10	18	18		
Тетрациклин***	TET 30	22	19		
Линезолид	LZD10	22	22		
Левифлоксацин	LEV 5	24	24		
Триметоприм- сульфаметоксазол	TS 25	17	14		
Ципрофлоксацин****	CIP 5	21	21		

* Возбудители, чувствительные к цефокситину, оцениваются как чувствительные к оксациллину и ко всем β -лактамам без дополнительного определения чувствительности

** наличие Д-зоны говорит об индуцибельной устойчивости к клиндамицину

*** чувствительные к тетрациклину расцениваются как чувствительные ко всем тетрациклинам, чувствительные к эритромицину – чувствительны ко всем макролидам

**** Для выявления резистентности к фторхинолонам в качестве метода скрининга можно использовать ДДМ с норфлоксацином. Изоляты, чувствительные к норфлоксацину, также расцениваются как чувствительные к ципрофлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину и офлоксацину. Для изолятов, нечувствительных к норфлоксацину, следует определять чувствительность к каждому препарату.

Определение чувствительности к ванкомицину MRSA, MRSE/MRCNS

- Результаты определения МПК гликопептидов зависят от использованного метода. МПК гликопептидов следует определять только методом микроразведений в бульоне (ISO 20776).
- МПК ванкомицина 2 мг/л – значение эпидемиологической точки отсечения (ECOFF), разграничивающее популяцию "дикого" и "недикого типа". Клиническая эффективность терапии инфекций, вызванных такими штаммами, может быть сниженной.
- Пограничное значение для категории "резистентный" снижено до 2 мг/л с той целью, чтобы изоляты "GISA" не оценивались как умеренно-резистентные, так как терапия серьезных инфекций, вызванных "GISA", повышенными дозами ванкомицина и тейкопланина не эффективна.

КР «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» Версия-2018-03

Энтерококки

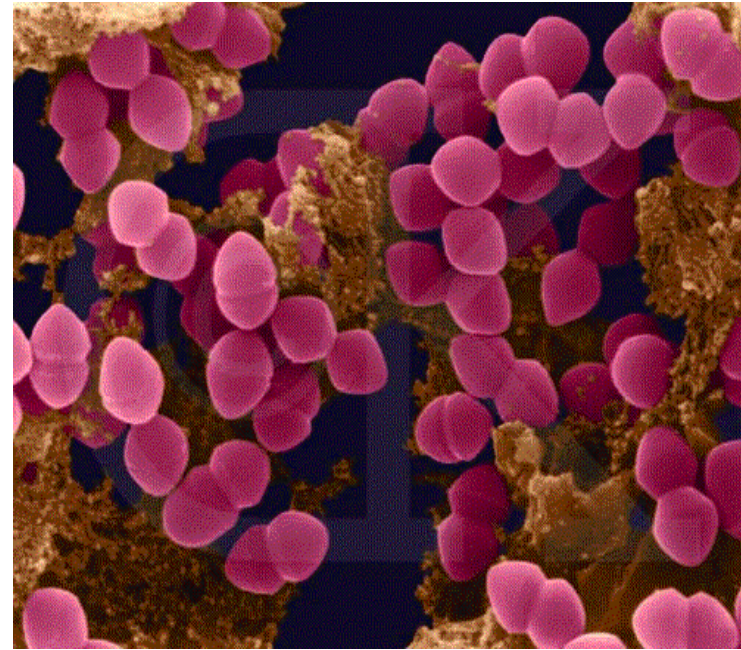
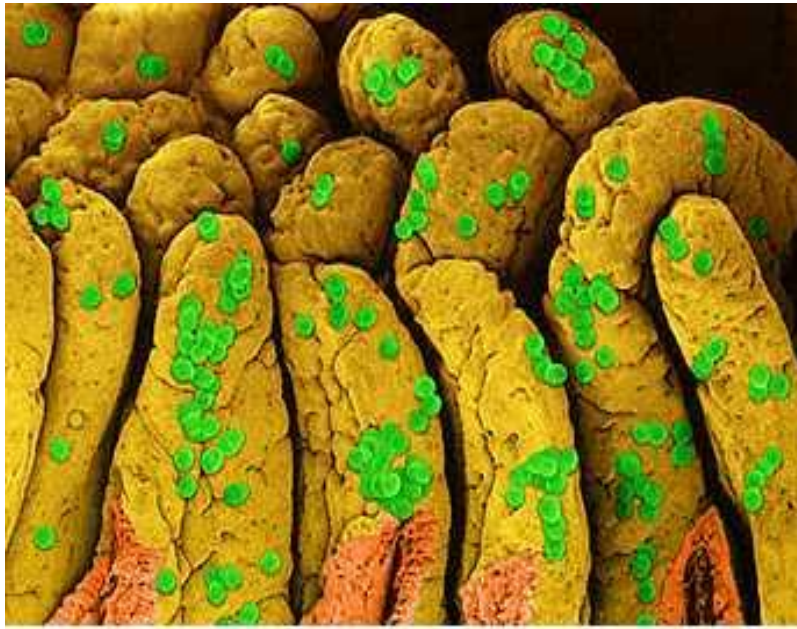
Род

Enterococcus

50 ВИДОВ!

Вид	Характеристика
<i>E. faecalis</i>	Наиболее частый изолят клинических проб из кишечника человека, обнаруживается также в кишечнике домашней птицы, крупного рогатого скота, свиней, собак, лошадей, овец и коз
<i>E. faecium</i>	Выявляется в клинических пробах от людей; более резистентен к антимикробным средствам, чем <i>E. faecalis</i> ; также выявляется в кишечнике разных видов животных
<i>E. avium</i>	Выделяют из кишечника птиц, собак, человека, штаммы могут иметь групповые D- и G-антигены по Лэнсфилду, образуют H ₂ S
<i>E. durans</i>	Редкий клинический изолят: обнаруживают главным образом в молоке и других молочных продуктах
<i>E. casseliflavus</i>	Выявляют в растениях, почве и редко – в фекалиях цыплят; первоначально классифицировали как подвид <i>E. faecium</i> ; продуцирует желтый пигмент, подвижен; может выделяться при инфекциях у человека
<i>E. gallinarum</i>	Изолируют из фекалий цыплят; один из двух подвижных видов <i>Enterococcus</i> ; также был изолирован при инфекциях людей, подвергавшихся гемодиализу
<i>E. raffinosus</i>	Первоначально рассматривался как <i>E. avium</i> (вместе с <i>E. solitarius</i> и <i>E. pseudoavium</i>); назван за свою способность продуцировать кислоту из раффинозы; выделяют при инфекциях человека, включая культуры из крови, мочи и абсцессов
<i>E. dispar</i>	Первоначально считали биохимическим вариантом <i>E. hirae</i> , но анализ сиквенса 16S РНК показал, что он является новым видом; обнаруживают в пробах от человека (в фекалиях, синовиальной жидкости)
<i>E. flavescens</i>	Новый, образующий желтый пигмент подвижный вид; изолирован из проб от человека (крови, абсцессов и гнойного отделяемого больных остеомиелитом)

Энтерококки: патогены или комменсалы?



Штаммы энтерококков, применяемые в пищевой промышленности

Штамм энтерококков	Вид пищевого продукта	Ссылка
E. faecalis B114	Сыр «камамбер»	Sulzer, Busse, 1991
E. faecium 7C5	Сыр Taleggio	Giraffa et al., 1995
E. faecalis INIA 4	Сыр Manchego	Joosten et al., 1995
E. faecalis INIA 4	Сыр Hispano	Garde et al., 1997
E. faecalis INIA 4	Сыр Manchego	Nunez et al., 1997
E. faecalis INIA 4	Сыр Hispano	Oumer et al., 2001
E. faecium CCM 4231	Сыр Saint-Paulin	Laukova et al., 2001
E. faecium CCM 4231	Испанская колбаса холодного копчения	Callewaert et al., 2000
E. faecium RZS C13	Испанская колбаса холодного копчения	Callewaert et al., 2000
E. faecium CTC49 2	Колбаса твердого копчения	Aymerich et al., 2000
E. faecium CTC49 2	Копченая свинина	Aymerich et al., 2002
E. faecalis TAB 28	Творог	Rodriguez et al., 2001
E. faecium RZS C5	Сыр Cheddar	Foulquie Moreno et al., 2003
E. faecium DPC 1146	Сыр Cheddar	Foulquie Moreno et al., 2003
E. faecium FAIR-E 198	Сыр «фета»	Sarantinopoulos et al., 2002
E. casseliflavus IM 416K1	Итальянская колбаса (Cacciatore)	Sabia et al., 2003

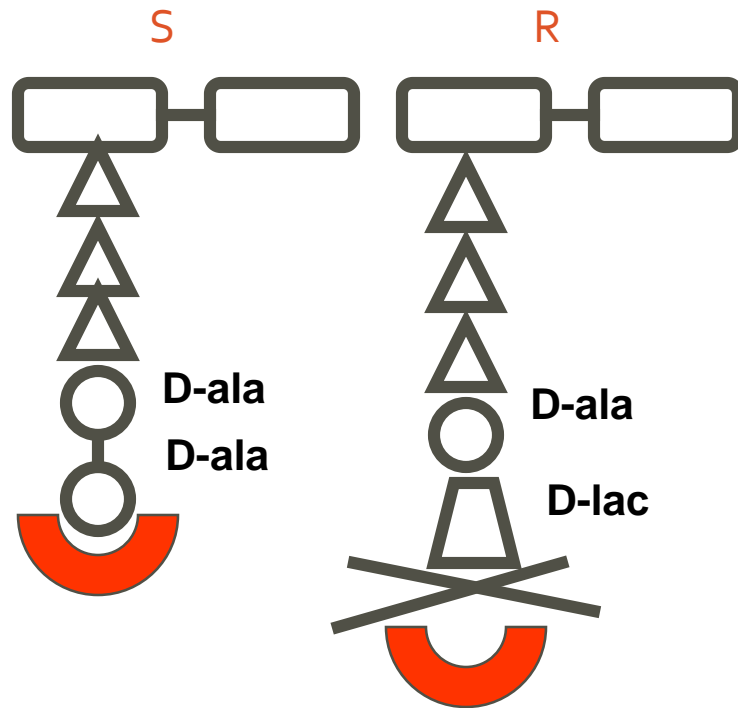
Некоторые энтероцины, выделенные из энтерококков

Энтероцин	Применение	Ссылка
Enterocin 226 NWC	Сыр Mozzarella	Villani et al., 1993
Enterocin 4	Молочная промышленность	Rodriguez et al., 1997
Enterocin CCM 4231	Корм для скота	Laukova et al., 1998
Enterocin CCM 4231	Соевое молоко	Laukova, Czikkova, 199
Enterocin CCM 4231	Сосиски Hornad salami	Laukova et al., 199
Enterocin CCM 4231	Брынза	Laukova, Czikkova, 2001
Enterocin CRL 35	Козий сыр	Farias et al., 199
Enterocin CRL 35	Мясные продукты	Vignolo et al., 2000
Enterocin CTC 49 2	Мясные продукты	Aymerich et al., 2000
Enterocin CTC 49 2	Свинина копченая	Aymerich et al., 2002
Энтероцины А и В	Закваска «Авена»	Суворов и др., 2003

Некоторые пробиотики

штамм	производитель	продукт	назначение
E. faecium SF68	GAIO, MD Foods, Aarhus, Denmark	Кисломолочный продукт	Лечение диарейного синдрома, антигиперхолистеринемическое действие
E. faecium PR88	E. faecium Fargo 688® from Quest International, Naarden, Netherlands	Пробиотический сыр «чеддер»	Лечение синдрома раздраженного кишечника
L3	«Авена», РФ	Пробиотический препарат	Лечение дисбиоза различной этиологии
LX	«Линекс» (фирма Lek, Словения)	Пробиотический препарат	Профилактика антибиотикоассоциированной диареи
E. faecium Walthers ECOFLOR	Walthers Health Care, Den Haag, Netherlands	Кисломолочный продукт	Лечение диарейного синдрома

Механизмы устойчивости к гликопептидам - энтерококки



Механизмы

- Формирование нового метаболического пути синтеза модифицированного предшественника пептидогликана – гены в составе транспозона на плазмиде

Антибиотик	Диск, мкг	Стандарт Ч \geq	Стандарт Р <	Интерпретация результата (Ч/У/Р)	Примечание
Ампициллин*	AMP 2	10	8		
Гентамицин	CN 30	8	8		Выявляется природная устойчивость к аминогликозидам
Линезолид	LZD10	19	19		
Норфлоксацин**	NOR10	12	12		
Ванкомицин	VAN 5	12	12		При менее 12- VRE!
Нитрофурантоин	F 100	15	15		Только при ИМП

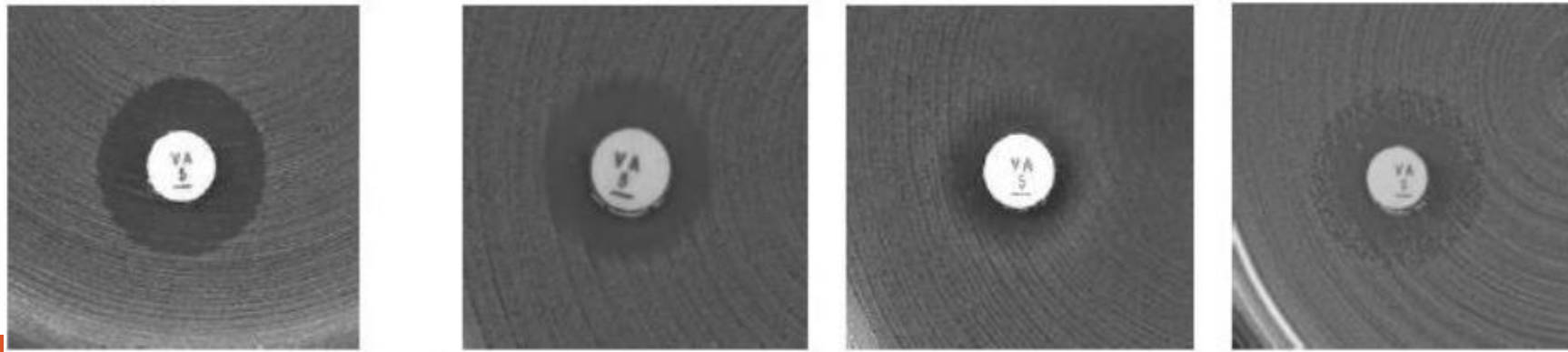
*чувствительность к β -лактамам оценивается по чувствительности к ампициллину

** чувствительные к норфлоксацину энтерококки чувствительны ко всем фторхинолонам

Чувствительность к ванкомицину: оценка ДДМ

- Зону подавления роста необходимо учитывать в проходящем свете. Четкий край зоны подавления роста и диаметр ≥ 12 мм свидетельствует о чувствительности изолята к ванкомицину. Нечеткий край зоны подавления роста или рост изолированных колоний внутри зоны свидетельствуют о резистентности к ванкомицину
- Если край зоны подавления не четкий, но ее диаметр ≥ 12 мм, необходимо продолжить инкубацию до 24 ч. Заключение о чувствительности изолята к ванкомицину может быть сделано только после 24 ч инкубации.

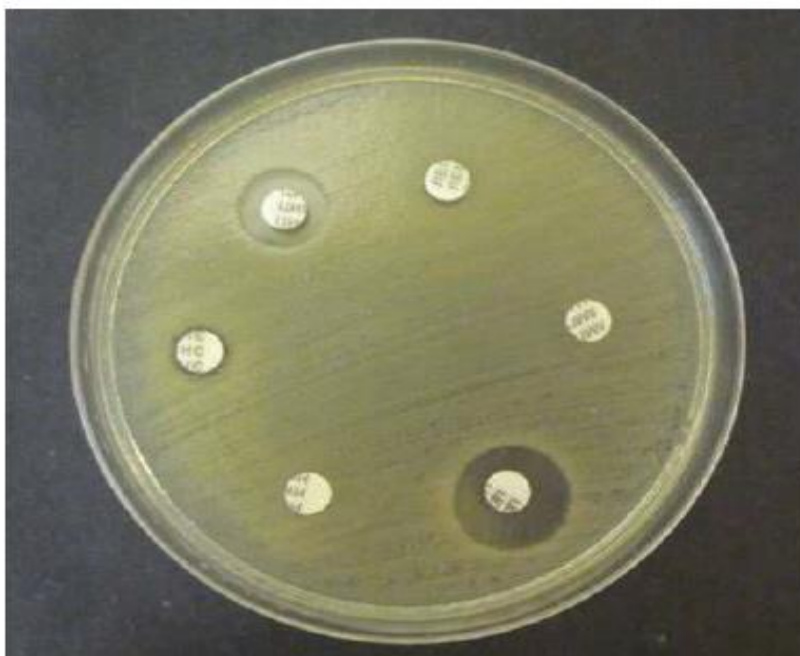
Нечеткая (размытая) граница зоны подавления роста.
Изолят оценивается как резистентный, даже если диаметр зоны подавления роста ≥ 12 мм.



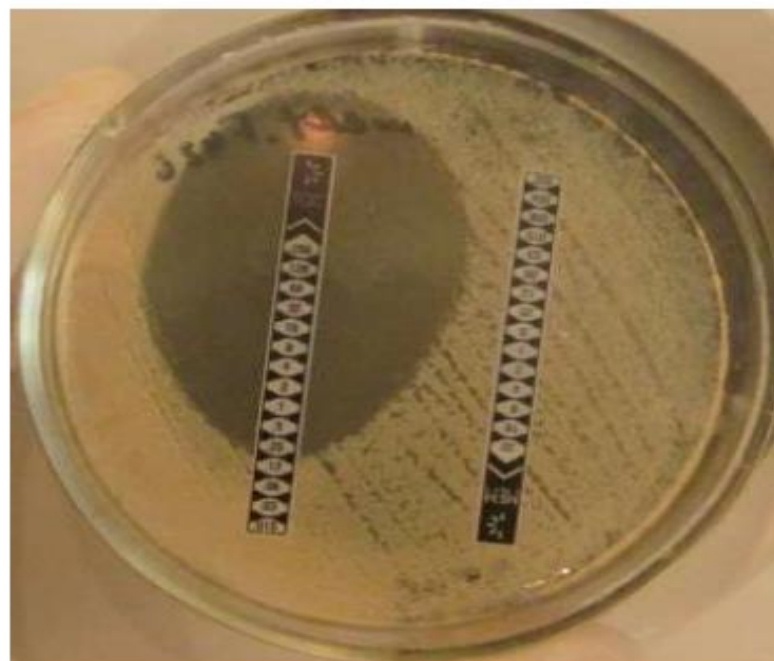
Пограничное значение МПК 4 мг/л

Методы определения чувствительности энтерококков к ванкомицину

Диско-диффузионный метод



Определение МПК (Е-тест)



Новые МР регламентируют использование кроме метода «дисков», методы определения МПК. Это актуально для определения чувствительности *E. faecalis* к ванкомицину

СанПиН 2.1.3.2630-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность"

10.3.3 Пациенты с инфекцией любой локализации, независимо от срока ее возникновения, вызванной **метициллин (оксациллин) - резистентным золотистым стафилококком** или **ванкомицинрезистентным энтерококком**, подлежат изоляции в боксированные палаты

- при входе в палату персонал надевает маску, спецодежду, перчатки и снимает их при выходе;
- предметы ухода, а также стетоскоп, термометр и др. используются только для данного пациента;
- перевязка пациента проводится в палате;
- при входе и выходе из палаты персонал обрабатывает руки спиртосодержащим кожным антисептиком;
- после выписки пациента проводится заключительная дезинфекция, камерное обеззараживание постельных принадлежностей, обеззараживание воздуха;
- после дезинфекции проводится лабораторное обследование объектов окружающей среды (в палате). Заполнение палаты проводится после получения удовлетворительных результатов микробиологического исследования

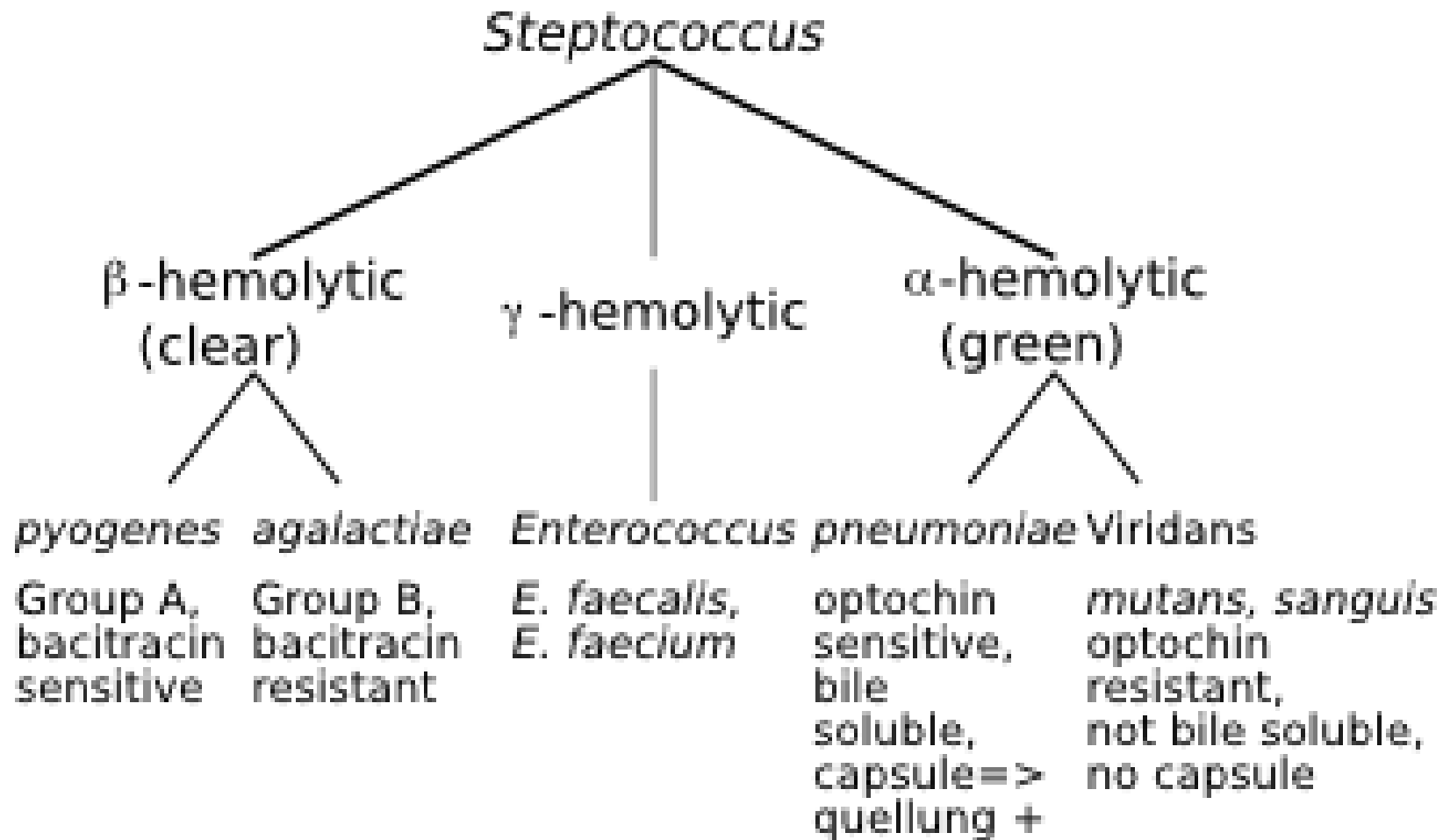
Стрептококки

Относятся к отделу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*.

Классификация:

1. Серологическая (по Р. Лэнсфильд) – 20 серогрупп (от А до Н и от L до V) Основные:
 - А. *S. pyogenes* – бета-гемолитические
 - S. pneumoniae* – альфа-гемолитические
 - В. *S. agalactiae* - бета-гемолитические
2. По биохимическим свойствам разделены на виды

Классификация стрептококков по гемолитическим свойствам





- α – неполный или «зеленящий» гемолиз;
- β – полный гемолиз;
- γ – отсутствие гемолиза.

- Современная классификация стрептококков основана на использовании нумерических, хемотаксономических и молекулярно-биологических подходов и филогенетического анализа, с помощью которых проведена группировка 55 видов стрептококков.
- В результате выделены группы "pyogenes", "anginosus", "mitis", "salivarius", "bovis", "mutans" (Facklam R., 2002)
- По экологическому критерию среди стрептококков можно выделить возбудителей антропонозов, зоонозов, сапронозов, а также большую группу стрептококков, которые не имеют медицинского значения



Стрептококки группы «viridans»

- *Данная группа бактерий включает много видов, которые могут быть сгруппированы следующим образом:*

Группа S. anginosus: S. anginosus, S. constellatus, S. intermedius

Группа S. mitis: S. australis, S. cristatus, S. infantis, S. mitis, S. oligofermentans, S. oralis, S. peroris, S. pseudopneumoniae, S. sinensis

Группа S. sanguinis: S. sanguinis, S. parasanguinis, S. gordonii

Группа S. bovis: S. equinus, S. gallolyticus (S. bovis), S. infantarius

Группа S. salivarius: S. salivarius, S. vestibularis, S. thermophilus

Группа S. mutans: S. mutans, S. sobrinus

Патогенность стрептококков, имеющих медицинское значение

Группа	Виды
Истинные патогены	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. agalactiae</i>
Условные патогены	<i>S. milleri</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. gallinaceus</i> , <i>S. equi</i> , <i>S. massiliensis</i> , <i>S. iniae</i>
Оппортунистические патогены	<i>S. mutans</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. salivarius</i> и др.

S. pneumoniae

Мукозальные:	Инвазивные:
<ul style="list-style-type: none">✓ Отит✓ Синусит✓ Конъюнктивит	<ul style="list-style-type: none">✓ Пневмония✓ Бактериемия✓ Менингит✓ Эндокардит

S. pneumoniae

- β-лактамы и макролиды являются препаратами выбора при лечении пневмококковых инфекций, поэтому рост резистентности S. pneumoniae к этим антибиотикам становится существенной клинической проблемой.
- Пневмококковые инфекции традиционно (и успешно) лечили пенициллином. До конца 1960-х гг. S. pneumoniae был полностью чувствителен к пенициллину и большинству других антибиотиков.
- Первый штамм пневмококка со сниженной чувствительностью к пенициллину был описан в Австралии в 1967 г., имел минимальную подавляющую концентрацию (МПК) 0,6 мкг/мл и обладал резистентностью к тетрациклину. Затем, в 1974 г. появились сообщения о пенициллиннечувствительных изолятах из Новой Гвинеи, а в 1977 г. в Южной Африке произошла вспышка инвазивных пневмококковых инфекций, вызванная высокорезистентными штаммами пневмококка (МПК 2–8 мкг/мл). Эти штаммы характеризовались полирезистентностью и относились к серотипам 6А и 19А.
- В течение 1980-х гг. сообщения о росте антибиотикорезистентности пневмококка стали поступать из многих стран. Возникло понятие «множественная устойчивость», или «полирезистентность», которое подразумевало устойчивость к трем и более классам антибиотиков. Публикация новых данных сопровождалась указаниями на неудачи при лечении пенициллином, особенно при пневмококковом менингите .

Механизмы устойчивости *S. pneumoniae* к бета-лактамам

- Продукция бета-лактамаз не описана
- Устойчивость к бета-лактамам связана с модификацией ПСБ

PEN	CTX	Изменения ПСБ
S	S	-
S	S/I	изм ПСБ 2х
S/I	R	мут ПСБ 1а, 2х
R	R	изм ПСБ 1а, 2х, 2b

Механизмы устойчивости *S. pneumoniae* к макролидам

- Первый механизм обусловлен модификацией сайта связывания макролидов с 23S-рРНК вследствие ее метилирования, которое нарушает взаимодействие антибиотика с мишенью. Метилирование осуществляется ферментом метилазой, который кодируется геном *erm* (англ. erythromycin ribosome methylation) и обуславливает высокий уровень устойчивости к макролидам
- Описано около 20 разновидностей *erm*, однако наибольшее значение для формирования резистентности у пневмококка играет вариант *ermB*. Большинство пневмококков, имеющих *ermB*, демонстрируют перекрестную резистентность ко всем макролидам, а также к линкозамидам и стрептограмину В, поскольку их мишени частично перекрываются. Этот фенотип получил название MLSB.

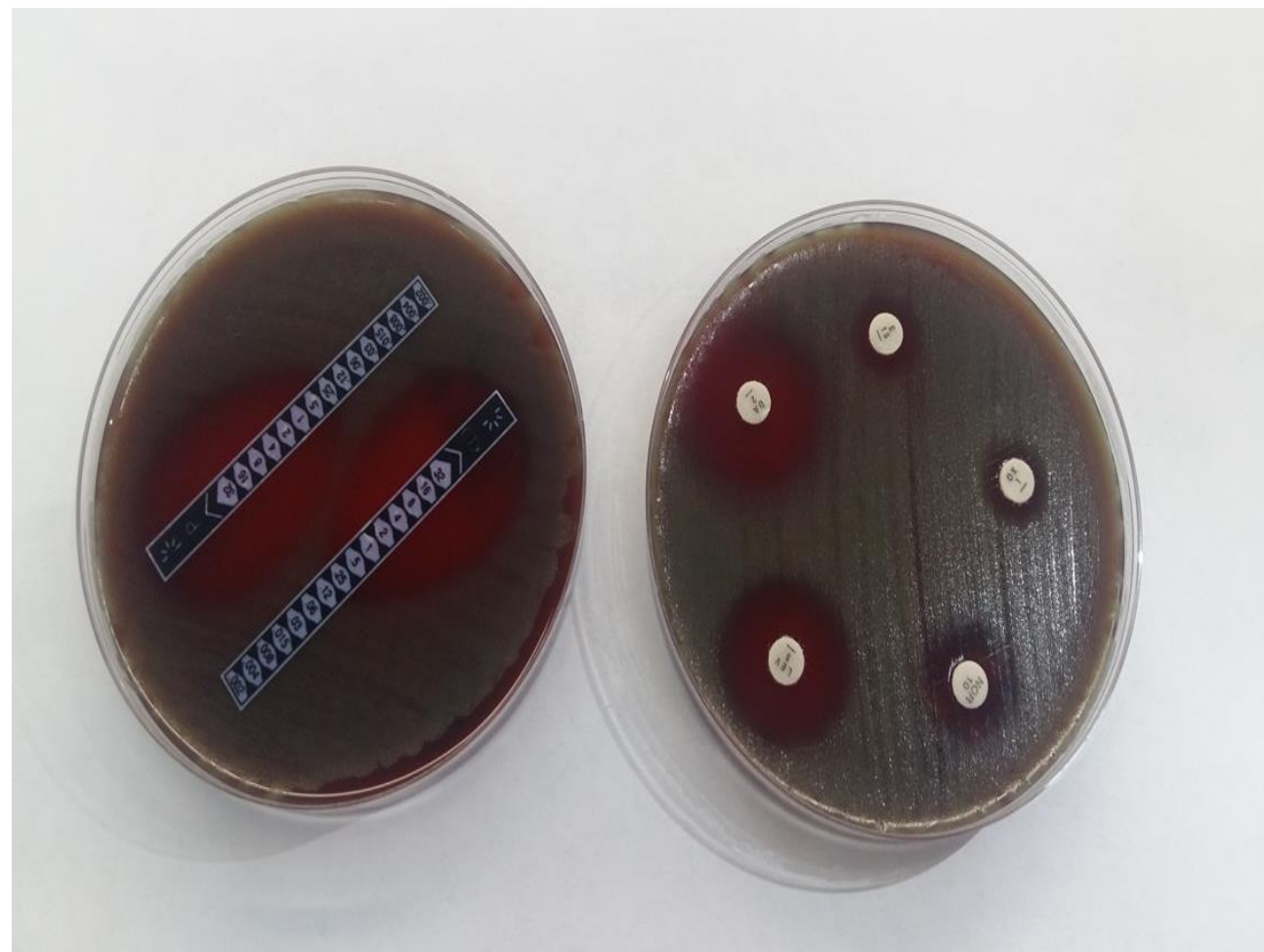
- Второй механизм резистентности к макролидам связан с их активным выведением (эффлюксом) из бактериальной клетки с помощью особой помпы, встроенной в клеточную стенку. Эффлюксная помпа кодируется несколькими вариантами гена *mef* (англ. macrolide efflux). Mef-позитивные пневмококки имеют M-фенотип, который характеризуется резистентностью к четырнадцати- и пятнадцатичленным макролидам, но сохранением чувствительности к шестнадцатичленным макролидам, линкозамидам и стрептограмину В

Параметры диско-диффузионного метода:

- Питательная среда: агар Мюллера-Хинтон + 5% дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л βНАД (МХ-П)
- Инокулюм: 0,5 по стандарту мутности МакФарланда при приготовлении с кровавого агара или 1,0 - с шоколадного агара
- Инкубация: 5% CO₂, 35±1°C, 18±2ч
- Учет результатов: Если не указано другое, чашку Петри помещают дном книзу, так чтобы свет падал на поверхность агара под углом 45° (учет в отраженном свете), крышку снимают. При измерении зон подавления роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста

Антибиотик	Диск, мкг	Стандарт Ч \geq	Стандарт Р <	Интерпретация результата (Ч/УР/Р)	Примечание
Оксациллин-скрининг*	OX 1	20	8	Если менее 20, но более 8, то Ч	При Р – необходимо определение МПК бензилпенициллина, цефтриаксона и меропенема особенно при менингите
Клиндамицин**	DA 2	19	19	Выявляется Д-феномен	Диски всегда должны лежать рядом
Эритромицин***	E 15	22	19		
Ванкомицин	VAN 5	16	16		
Норфлоксацин-скрининг****	NOR10	11	-		
Линезолид	LZD10	22	19		
Левифлоксацин	LEV 5	16	16		
Триметоприм-сульфаметоксазол	TS 25	18	15		
Ципрофлоксацин	CIP 5	21	21		
Тетрациклин***	TET 30	25	22		

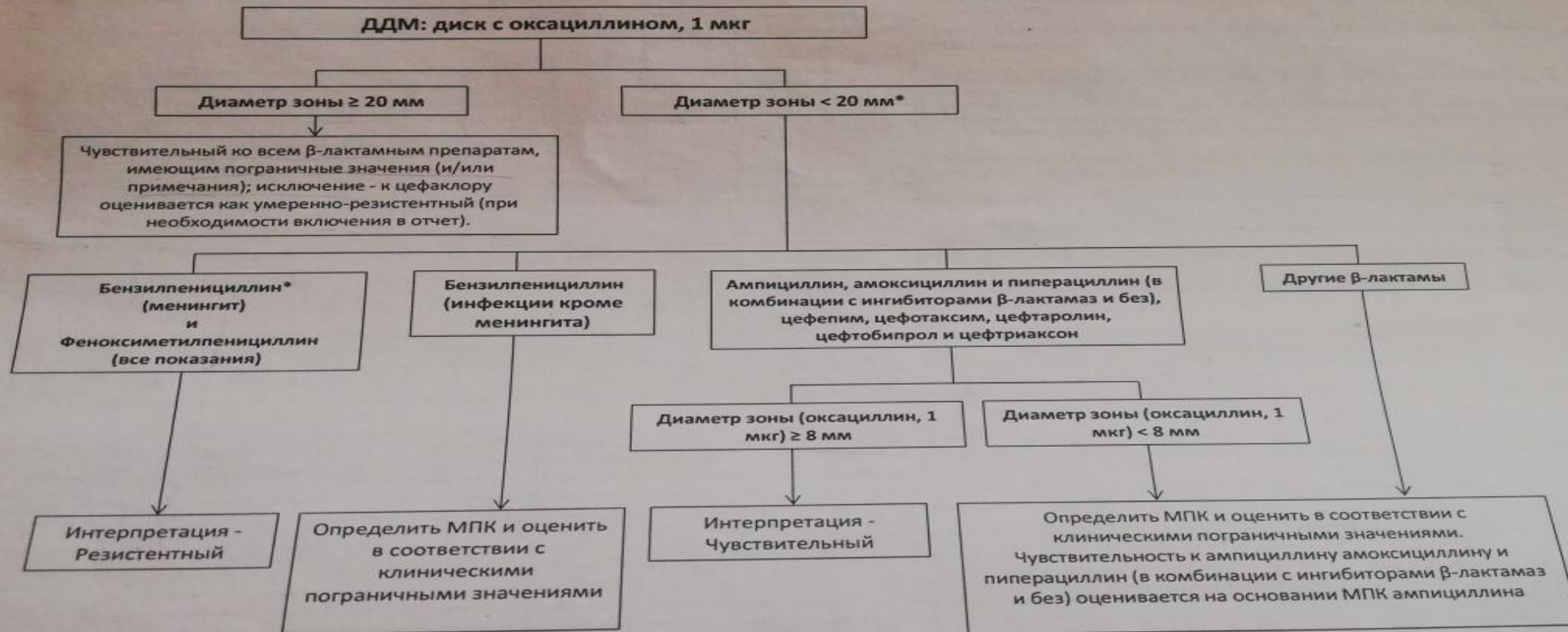
- *Возбудители, чувствительные к оксациллину, оцениваются как чувствительные к пенициллину и ко всем β -лактамам без дополнительного определения чувствительности
- **наличие Д-зоны говорит об индуцибельной устойчивости к клиндамицину
- *** чувствительные к тетрациклину расцениваются как чувствительные ко всем тетрациклинам, чувствительные к эритромицину – чувствительны ко всем макролидам
- ****чувствительные к норфлоксацину штаммы чувствительны ко всем фторхинолонам



Интерпретация и выписка результата

ДД	Выписка результата	Примечание
Оксациллин 1 мкг	НЕТ!	
	Бензилпенициллин	МПК, если ОХ < 20 мм (менингит)
	Амоксициллин	МПК, если ОХ < 8 мм
	Цефтриаксон	МПК, если ОХ < 8 мм
	Меропенем	МПК, если ОХ < 20 мм
Эритромицин 15 мкг	Эритромицин, klarитромицин, азитромицин	
Норфлоксацин 10 мкг	НЕТ!	
	Левифлоксацин и/или моксифлоксацин	Если Р, то отдельно ДД для лево- и моксифлоксацина
Тетрациклин 30 мкг	Тетрациклин, доксициклин, миноциклин	
Ванкомицин 5 мкг		
Линезолид 10 мкг		

Скрининг резистентности к β -лактамам у *S. pneumoniae*



* Во всех случаях требуется определение МПК бензилпенициллина, но нельзя откладывать сообщение результата "Резистентный" при менингите.

Вопросы?

