

DRG International Inc./DRG Techsystems  
Suite 2, Building 1, 34, Novocheryomushkinskaya, Moscow, Russia, 117218  
Tel./Fax: 7 (499) 277 07 20  
zakaz@drgtech.ru/office@drgtech.ru  
[www.drgtech.ru](http://www.drgtech.ru)

# Хромогенные среды в детекции антибиотикорезистентности: опыт практического применения

---

Калашников Д.С., к.б.н.

А. Флеминг  
(1881-1955)



З. В. Ермольева  
(1898-1974)



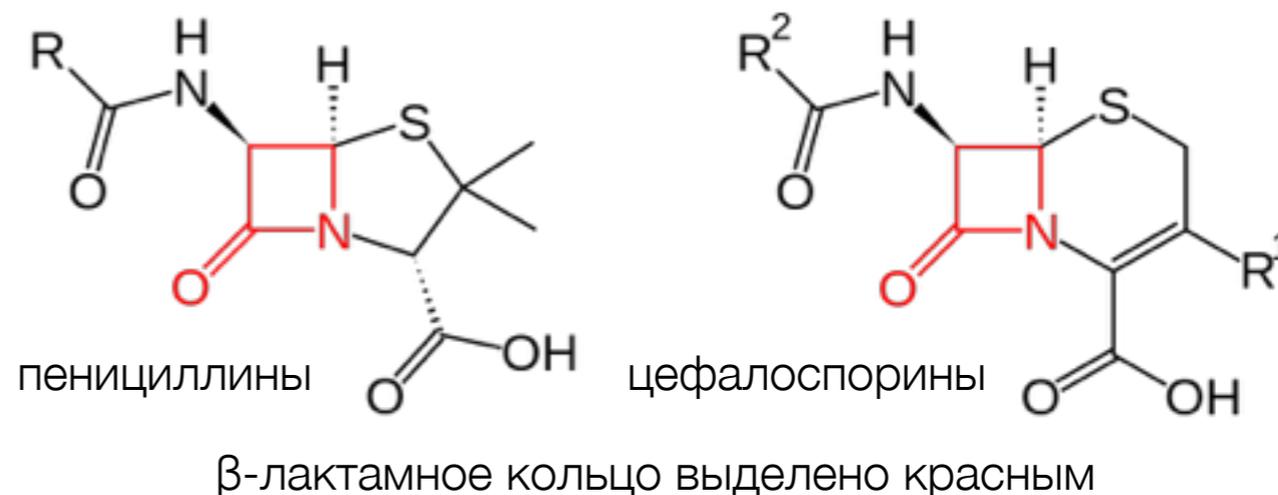
Дыня-кantalупа

## Что такое антибиотики?

Антибиот́ики (от др.-греч. ἀντί — против + βίος — жизнь) — вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток, чаще всего прокариотических или простейших.

По ГОСТ 21507-81 (СТ СЭВ 1740-79):

Антибиотик — вещество микробного, животного или растительного происхождения, способное подавлять рост определённых микроорганизмов или вызывать их гибель.



## Что такое бета-лактамы антибиотики?

Бета-лактамы антибиотики ( $\beta$ -лактамы антибиотики,  $\beta$ -лактамы) — группа антибиотиков, которые объединяет наличие в структуре  $\beta$ -лактамного кольца.

В бета-лактамах относятся подгруппы пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов и монобактамов. Сходство химической структуры предопределяет одинаковый механизм действия всех  $\beta$ -лактамов (нарушение синтеза клеточной стенки бактерий), а также перекрёстную аллергию к ним у некоторых пациентов.

# Антибиотики – самая многочисленная группа лекарственных средств

Почему же до сих пор нет идеальных или почти идеальных режимов терапии для многих инфекций?

## Мишени действия антибиотиков

Клеточная структура	Препарат
Клеточная стенка	Пенициллины
	Цефалоспорины
	Бацитрацин
	Гликопептиды
	Циклосерин
	Фосфомицин
Рибосома	Хлорамфеникол
	Макролиды
	Фузидиевая кислота
	Тетрациклины
	Аминогликозиды
Нуклеиновые кислоты	Хинолоны
	Рифампицин
	Нитроимидазолы
	Нитрофураны
Клеточная мембрана	Полимиксины
Синтез фолатов	Сульфаниламиды
	Диаминопиримидины

# Что такое антибиотикорезистентность?

---

Антибиотикорезистентность — феномен устойчивости штамма возбудителей инфекции к действию одного или нескольких антибактериальных препаратов, снижение чувствительности (устойчивость, невосприимчивость) культуры микроорганизмов к действию антибактериального вещества.

## Три группы инфекций в зависимости от уровня антибиотикорезистентности

### 1. Антибиотикорезистентность отсутствует или клинически незначима:

*Treponema pallidum* - пенициллин,  
Стрептококки гр. А - пенициллин,  
Хламидии - макролиды, тетрациклины.

### 2. «Управляемая» антибиотикорезистентность:

Гонококки, устойчивые к пенициллину - циклоспорины 3-го поколения парентерально,  
Пенициллинорезистентные пневмококки - амоксициллин + клавулонат, особенно в высоких дозах,  
Макролидорезистентные стрептококки -  $\beta$ -лактамные антибиотики, либо фторхинолоны,  
Грамотрицательные неспорообразующие анаэробы - ингибиторзащищенные  $\beta$ -лактамы, карбапенемы и т.д.

### 3. «Трудноуправляемая» антибиотикорезистентность:

Полирезистентные нозокомиальные грамотрицательные бактерии,  
Ванкомицинорезистентный *Enterococcus faecium*.

# Антибиотикорезистентность – основная проблема антимикробной терапии

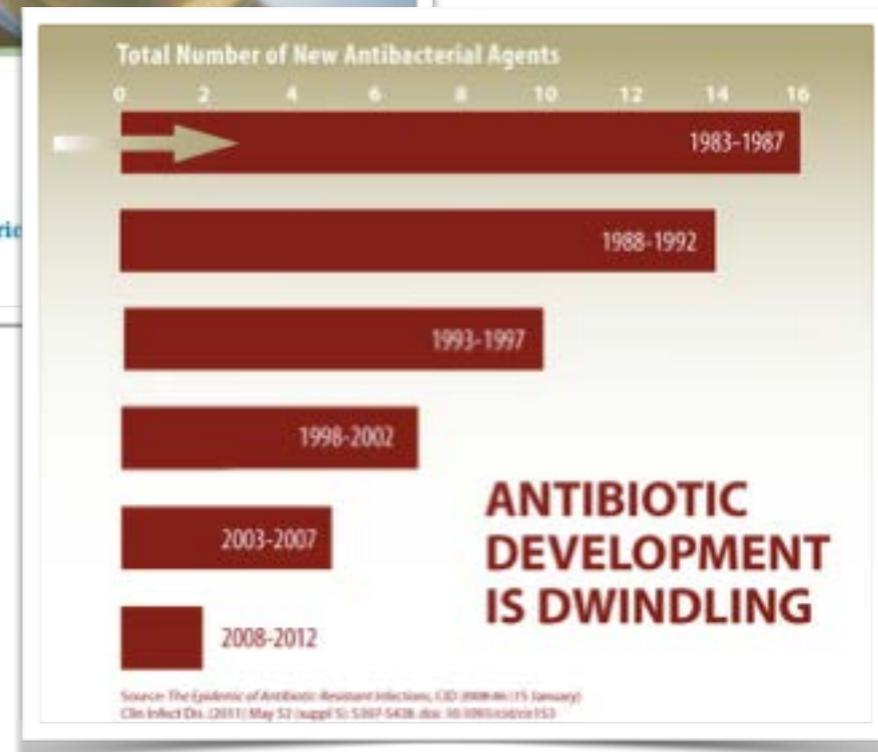
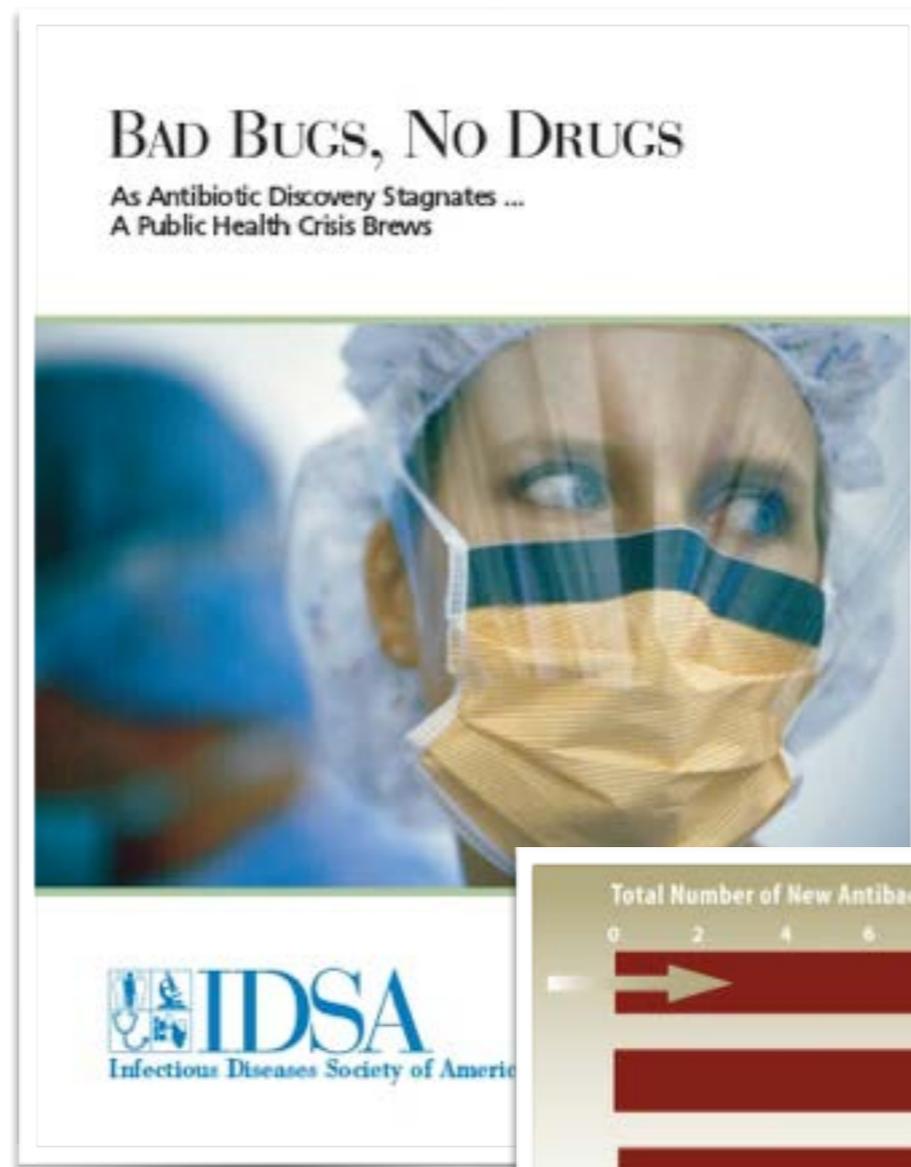
Монорезистентность



Полирезистентность



Панрезистентность



# Источники развития антибиотикорезистентности у бактерий

---

- Селекция штаммов с природной антибиотикорезистентностью;
- Приобретение чужеродной ДНК (плазмиды, транспозоны и другие мобильные генетические элементы);
- Мутации.

# Природная антибиотикорезистентность

---

*Stenotrophomonas maltophilia* - часто резистентна ко всем антибиотикам, за исключением триметоприма/сульфаметоксазола;

*Enterococcus faecium* - часто резистентен ко всем антибиотикам, кроме ванкомицина.

# Приобретенная антибиотикорезистентность

---

Многие метициллинорезистентные стафилококки и пенициллинорезистентные пневмококки резистентны ко многим антибиотикам, кроме ванкомицина;

До 70-90% клебсиелл, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра, резистентны к аминогликозидам и фторхинолонам в сравнении с 6-10% штаммов, которые не продуцируют  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра.

## Характеристика мобильных генетических элементов бактерий, вовлеченных в распространение генов антибиотикорезистентности в природе

Элемент	Характеристики	Роль в распространении генов резистентности
Конъюгативные плазмиды	Кольцевые, автономно реплицирующиеся генетические элементы, передающие гены между бактериями благодаря конъюгации	Перенос генов резистентности; мобилизуют перенос других генетических элементов, включающих гены резистентности
Конъюгативные транспозоны	Интегрирующиеся элементы, которые могут «вырезаться» из хромосомы в виде нереплицирующегося кольцевого производного, способного к конъюгации	Такая же
Мобилизуемые плазмиды	Носители генов, которые могут переноситься между бактериями благодаря конъюгационному аппарату конъюгативных плазмид	Перенос генов резистентности
Нерепликативные единицы Bacteroides	Интегрированные в геном бактероидов элементы, которые самостоятельно не способны из него «вырезаться» и переноситься между бактериями; но эти процессы могут быть инициированы конъюгативными транспозонами	Такая же
Транспозоны	Могут перемещать фрагмент ДНК из одного участка генома бактерии в другой	Перемещение генов антибиотикорезистентности от плазмиды к хромосоме и наоборот
Генные кассеты	Кольцевые нереплицирующиеся ДНК-сегменты, включающие только ORF, интегрируются в интегроны	Включение генов резистентности
Интегрон	Интегрировавшийся в хромосому бактерии фрагмент ДНК, включающий ген интегразы, промотор и сайт интеграции для генных кассет	Формирование кластеров генов резистентности, находящихся под контролем промотора интегрона
Инсерционные криптические последовательности (ISCR-элементы)	Образование комплексных интегронов первого класса	Мобилизация генов, прилегающих к ISCR-элементу

# Антибиотикорезистентность в следствие мутаций

---

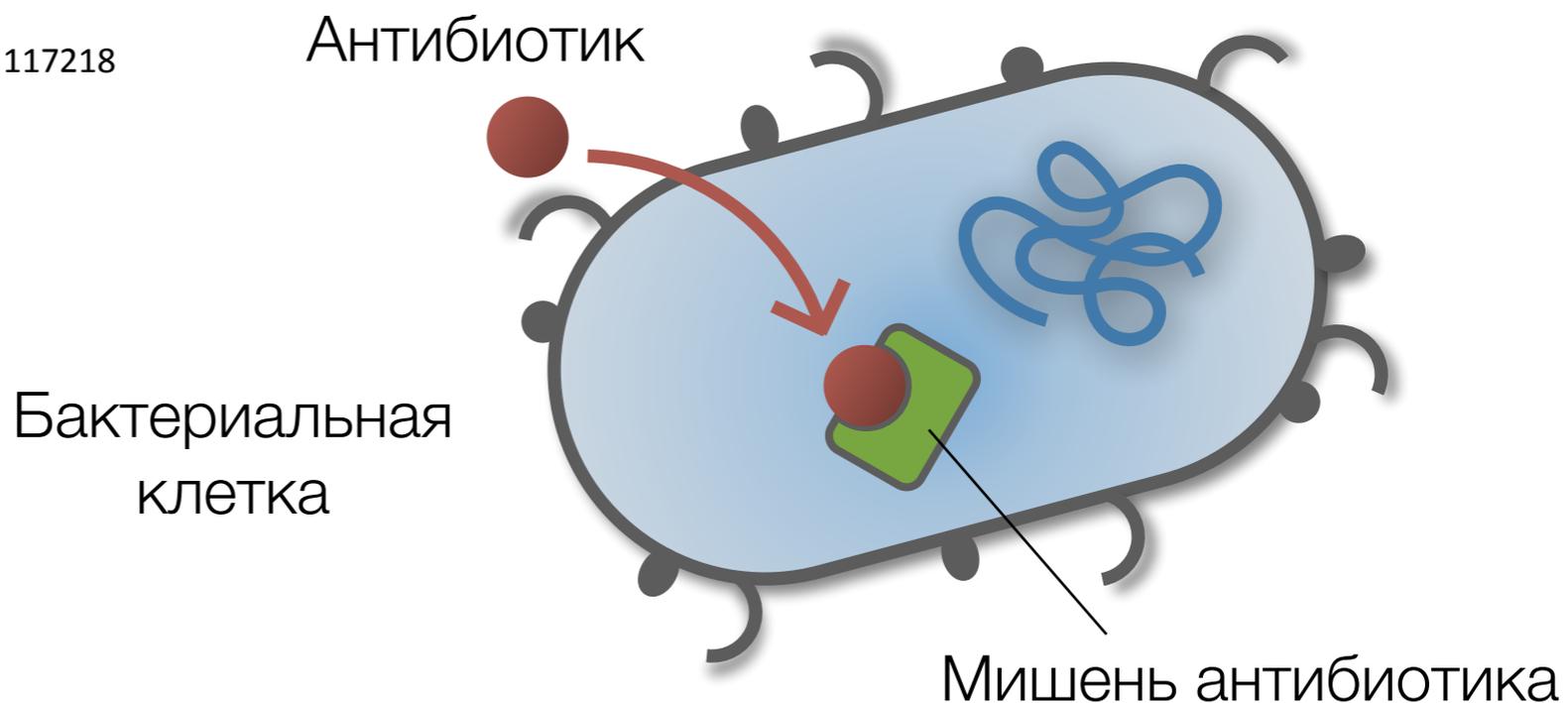
Бактериальная клетка раз в 20 минут;

За 10 часов одна бактериальная клетка дает 1 000 000 потомков;

Мутации возникают у одной клетки из 10 000 000;

Мутантные клетки подвергаются селекции под действием антибиотиков;

Результатом селекции антибиотикорезистентных штаммов оказывается клиническая неэффективность терапии.

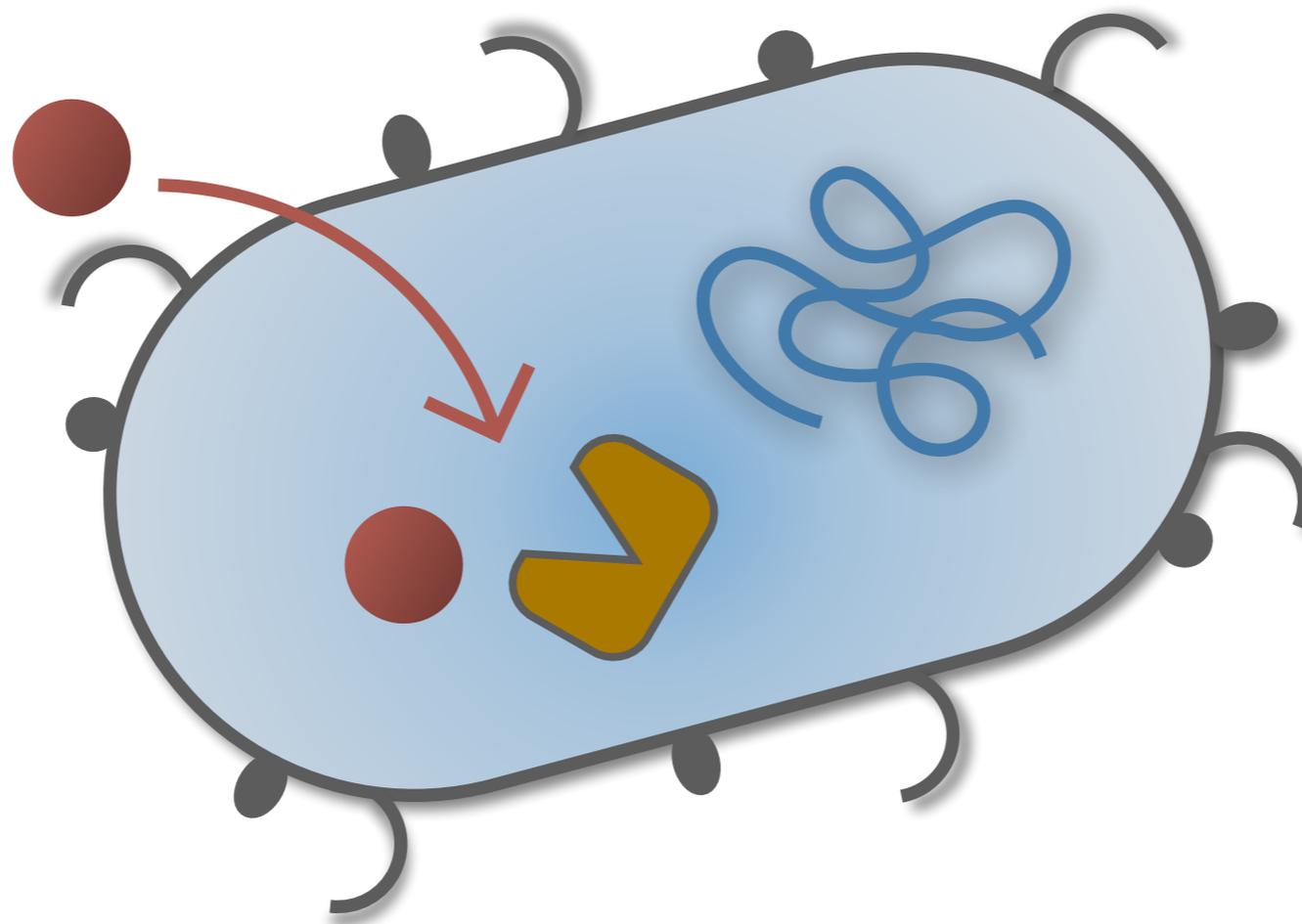


## Механизмы антибиотикорезистентности

Известны следующие биохимические механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам:

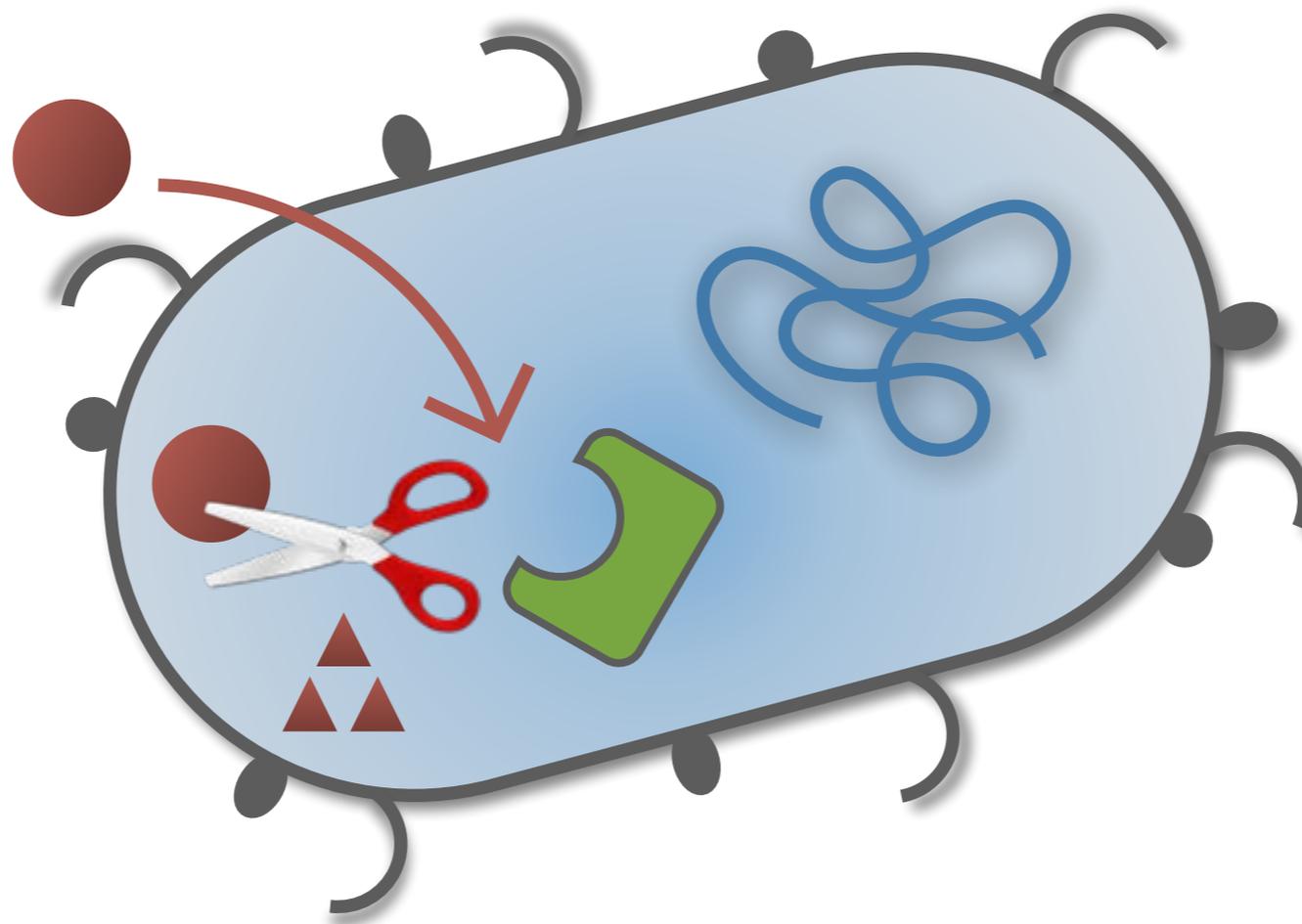
1. Модификация мишени действия.
2. Инактивация антибиотика.
3. Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс).
4. Нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки.
5. Формирование метаболического «шунта».

# Механизмы антибиотикорезистентности



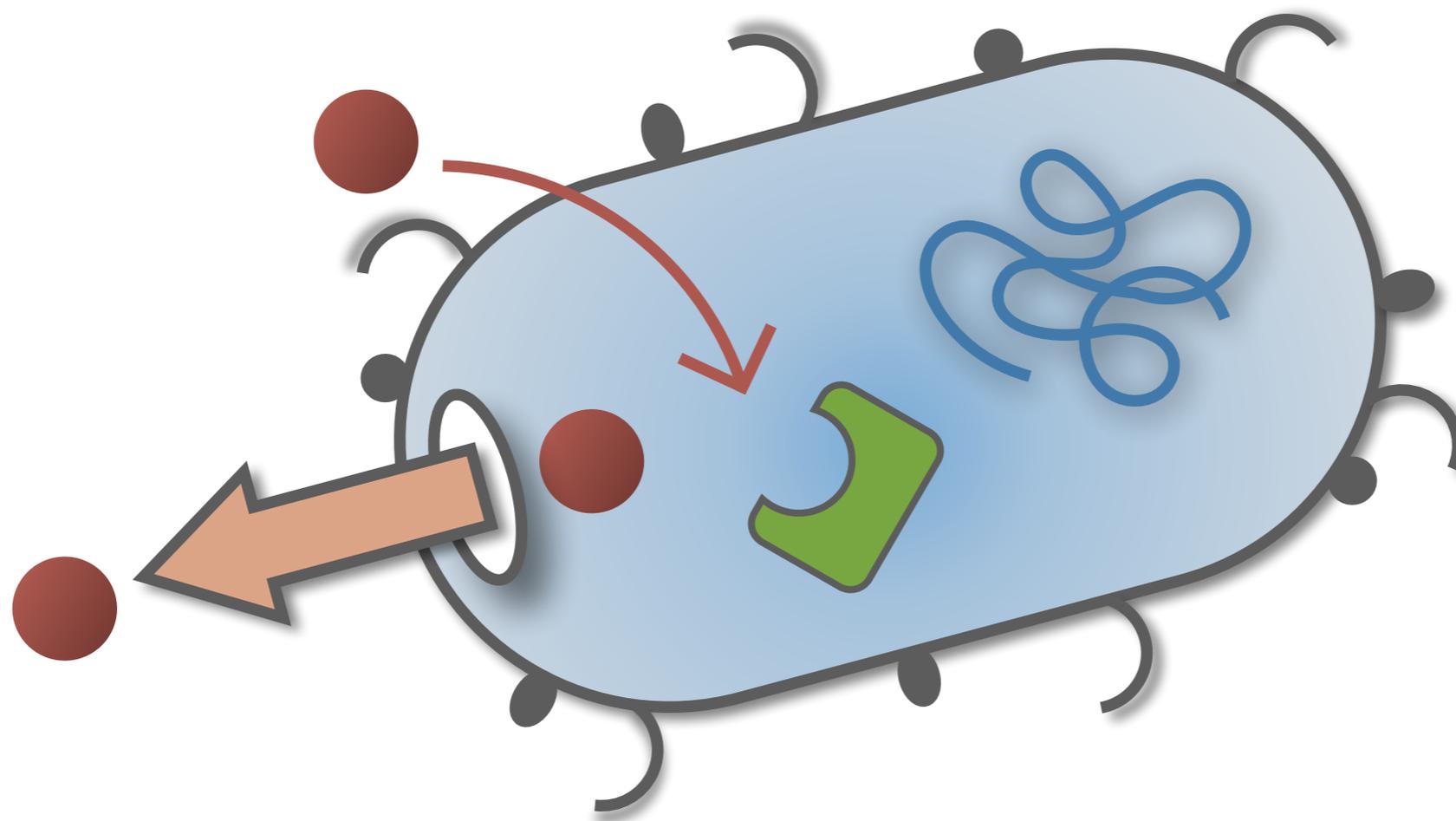
1. Модификация мишени действия.

# Механизмы антибиотикорезистентности



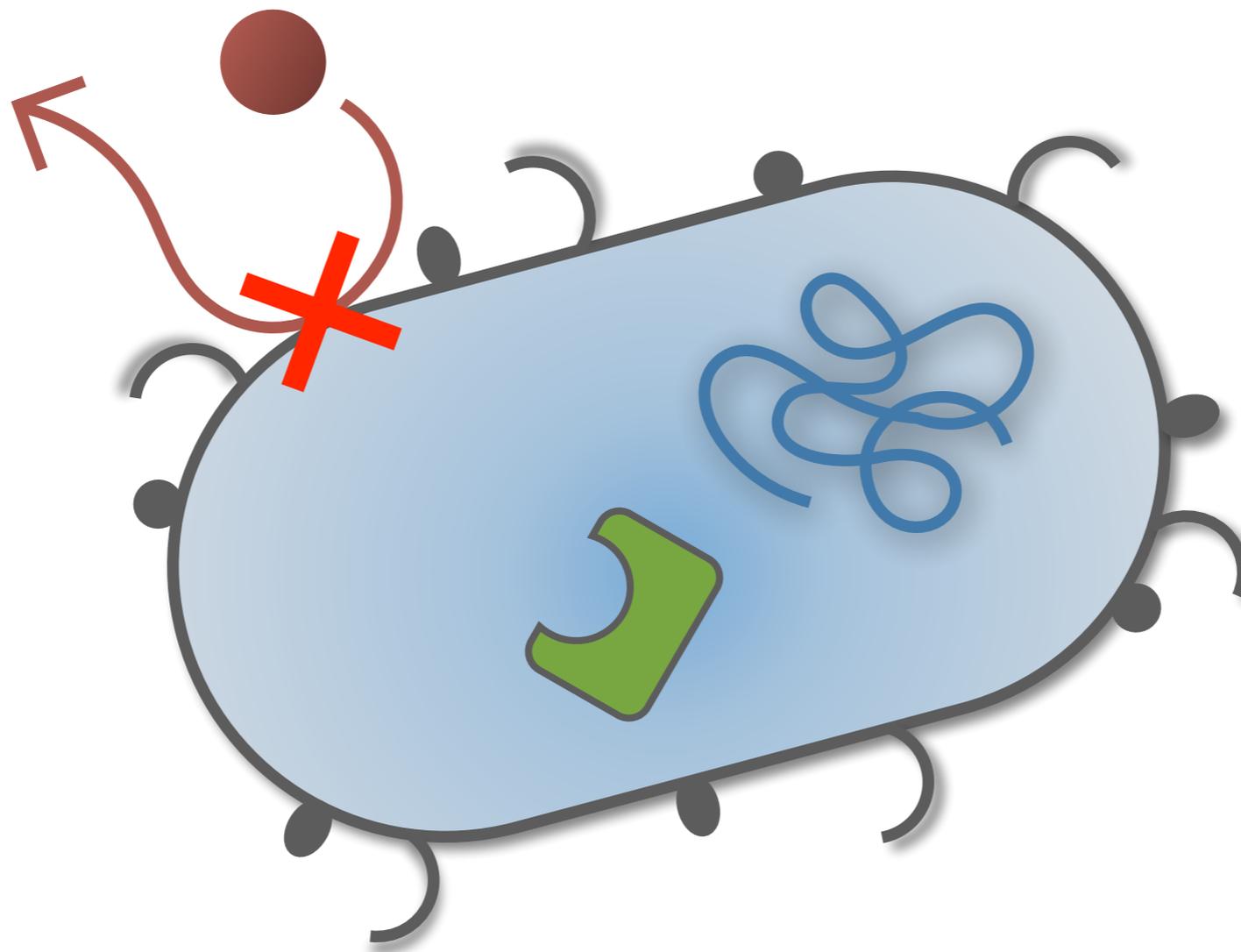
## 2. Инактивация антибиотика.

# Механизмы антибиотикорезистентности



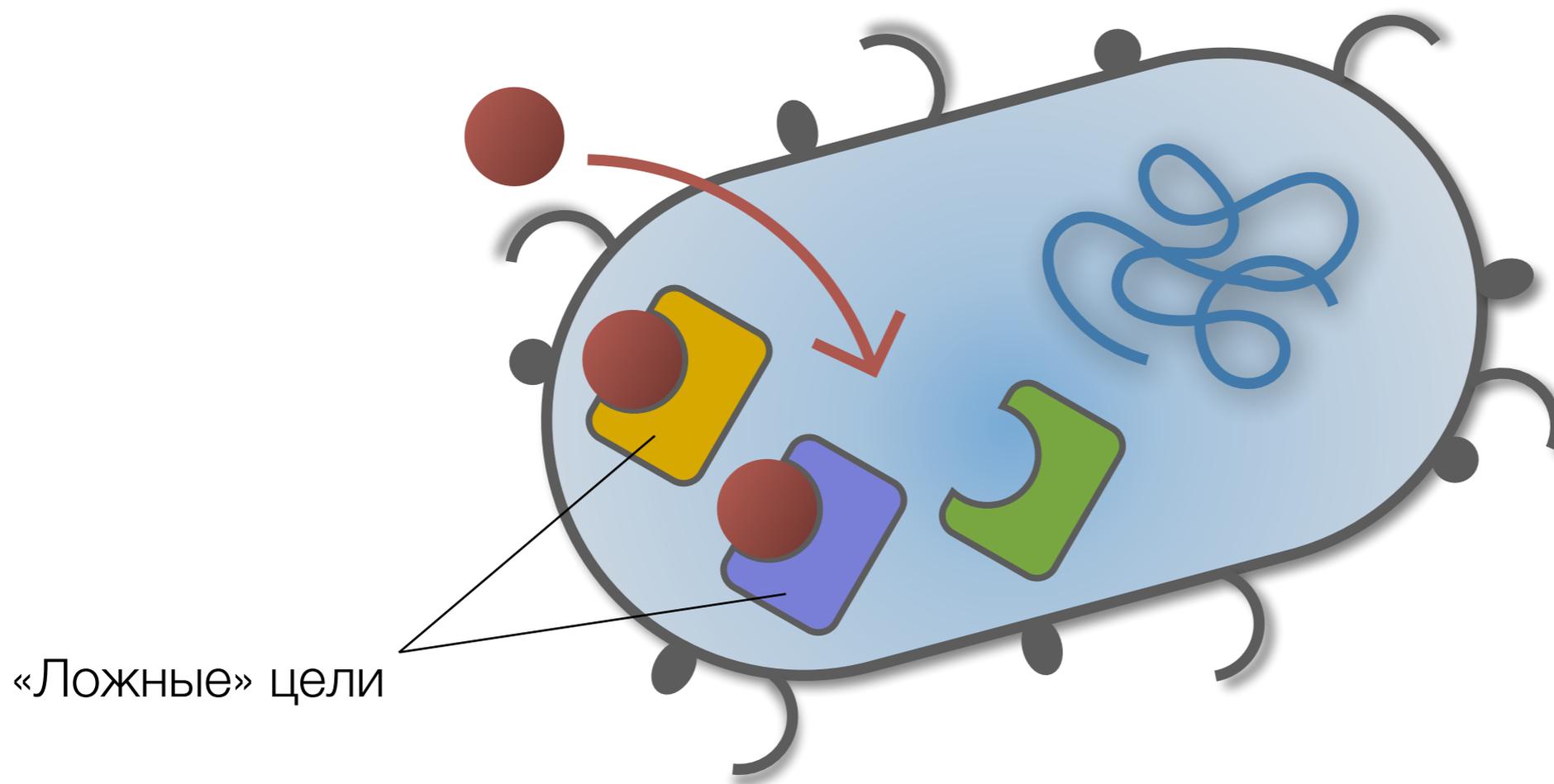
3. Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс).

# Механизмы антибиотикорезистентности



4. Нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки.

# Механизмы антибиотикорезистентности



5. Формирование метаболического «шунта».

## Возможные механизмы резистентности к различным препаратам

Препарат	Модификация мишени действия	Инактивация антибиотика		Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс)	Нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки	Формирование метаболического «шунта»
		Разрушение	Модификация			
Пенициллины	ПСБ	+			+	
Цефалоспорины	ПСБ	+			+	
Карбапенемы	ПСБ	+			+	
Аминогликозиды	+		+		+	
Хинолоны	+			+	+	
Тетрациклины	+		+	+		
Линкозамиды	+		+		+	
Макролиды		+	+	+		
Гликопептиды	+					
Фузидин						
Хлорамфеникол	+		+	+		
Рифампицин	+		+			
Сульфаниламиды						+
Триметоприм						+

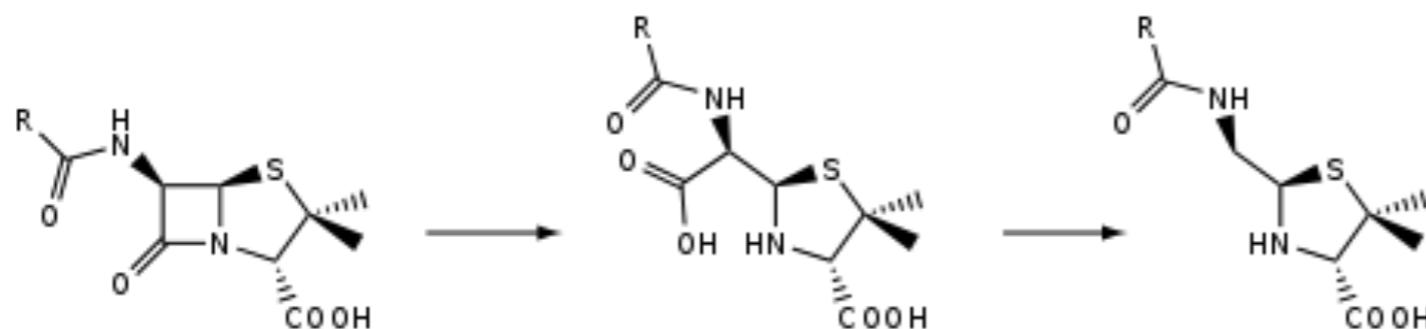
# Резистентность к $\beta$ -лактамным антибиотикам

---

В основе, как правило, лежит разрушение  $\beta$ -лактамных антибиотиков ферментами, называемыми  $\beta$ -лактамазами, а также ряд других механизмов.

## Частота встречаемости различных механизмов резистентности к $\beta$ -лактамам антибиотикам





β-лактамаза

спонтанное декарбоксилирование

Показана связь в β-лактамном кольце, которая подвергается гидролизу бета-лактамазами.

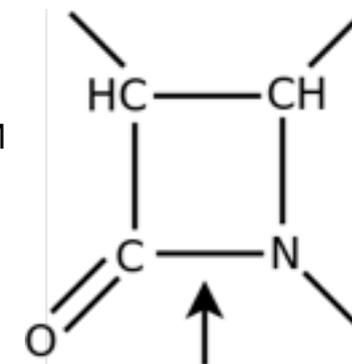


Схема разложения пенициллинов

## Что такое β-лактамазы?

β-лактамазы представляют обширную группу генетически и функционально различных ферментов, отличающихся способностью разрушать β-лактамные антибиотики, тем самым обеспечивая устойчивость к ним бактерий-продуцентов. Природная способность к продукции β-лактамаз характерна для многих видов микроорганизмов.

Наибольшую значимость в последнее время приобретает широкое распространение плазмидно-кодируемых β-лактамаз, являющихся факторами вторичной (приобретенной) резистентности у изначально нечувствительных микроорганизмов.

# Классификация β-лактамаз

Класс / Представитель	Локализация генов	Бактерии
Грам(+)-лактамазы		
	Плазмиды	<i>Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
		<i>Streptococcus uberis</i>
Грам(-)-лактамазы		
Класс А		
TEM-1/TEM-2	Плазмиды / Широкий спектр	<i>Enterobacteriaceae, Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae, Vibrio cholerae</i>
SHV-1		<i>Enterobacteriaceae, Klebsiella pneumoniae</i>
OXA-1	Плазмиды / Оксациллиназа	<i>Escherichia coli</i>
PSE-1	Плазмиды / Карбенициллиназа у <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacteriaceae, наиболее частый тип у Pseudomonas aeruginosa</i>
BRO-1	Плазмиды / Карбенициллиназа	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Класс В		
Цефалоспориноаза	Хромосома	<i>Bacillus cereus</i>
Класс С		
Цефалоспориноаза	Хромосома	<i>Escherichia coli, Bacteroides fragilis</i>
Индуцибельные	Хромосома	<i>Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Providencia rettgeri, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens</i>
Карбапенемаза	Хромосома	<i>Stenotrophomonas maltophilia, Bacteroides fragilis, Serratia marcescens</i>
Класс D		
Оксациллиназы	—	—

## Локализация генов, ответственных за антибиотикорезистентность



# Свойства хромосомных $\beta$ -лактамаз

---

1. Резистентность преимущественно к цефалоспорином,
2. Гены располагаются в хромосомах,
3. Не способны к горизонтальной передаче,
4. Не ингибируются клавулановой кислотой.

# Свойства плазмидных $\beta$ -лактамаз

---

1. Резистентность преимущественно к пенициллинам,
2. Гены располагаются на плаزمидах и транспозонах,
3. Способны к горизонтальной передаче,
4. Ингибируются клавулановой кислотой,  
за исключением ингибиторрезистентных  $\beta$ -лактамаз.

# Эволюция плазмидных $\beta$ -лактамаз

1965 г.	<i>Escherichia coli</i>	TEM-1
1965-70 гг.	Enterobacteriaceae	TEM-1 и TEM-2
1969 г.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	PSE-2/OXA-4
1975 г.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>	ROB
1980-90-е гг.	<i>Klebsiella</i> spp.	SHV-1
90-е годы.	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Escherichia coli</i>	БЛРС

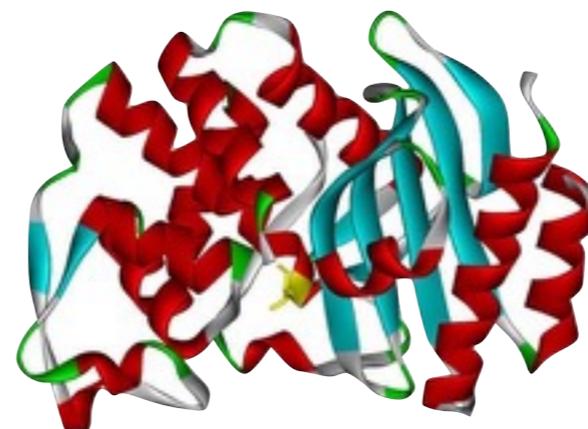
# Соответствие структурной и функциональной классификации $\beta$ -лактамаз



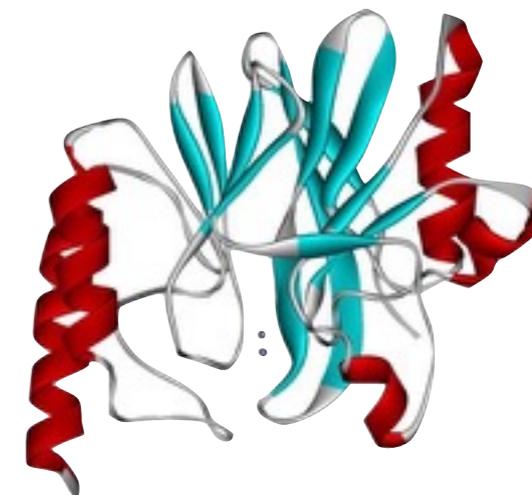
## Классификация $\beta$ -лактамаз на основе молекулярного строения и фенотипических особенностей

Молекулярный класс (Ambler, 1980)	Функциональная группа (Bush et al., 1995)	Активность в отношении субстрата						Способность к ингибированию		
		Пенициллин	Карбенициллин	Оксациллин	Цефотаксим	Азтреонам	Имипенем	Клавулонат	Азтреонам	ЭДТА
A	2a	+++	+	-	-	-	-	++	-	-
	2b	+++	+	+	-	-	-	++	-	-
	2be	+++	+	+	++	++	-	++	-	-
	2br	+++	+	+	-	-	-	-	-	-
	2c	++	+++	+	-	-	-	+	-	-
	2e	++	++	-	++	++	-	++	-	-
	2f	++	+	?	+	++	++	+	-	-
C	1	++	+	-	+	-	-	-	++	-
D	2d	++	+	+++	-	-	-	V	-	-
B (Zn <sup>2+</sup> -содержащие)	3	++	++	++	++	-	++	-	-	++

Активность в отношении субстрата: высокая (+++), «хорошая» (++) , неизвестна (?), отсутствует (-). Способность к ингибированию: сильная (++) , умеренная (+), варьирует в пределах класса (V), отсутствует (-).



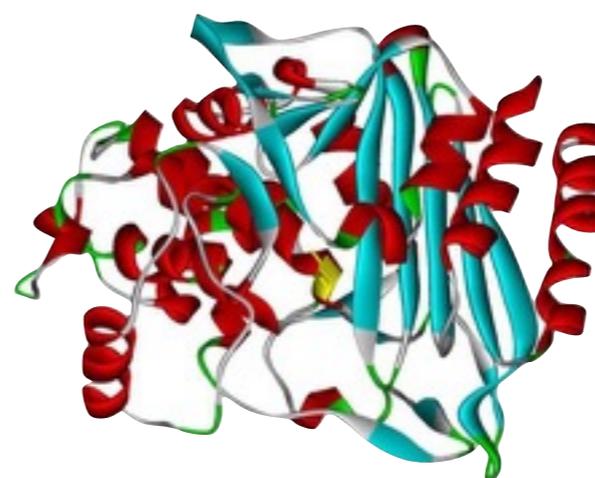
класс А SHV-1



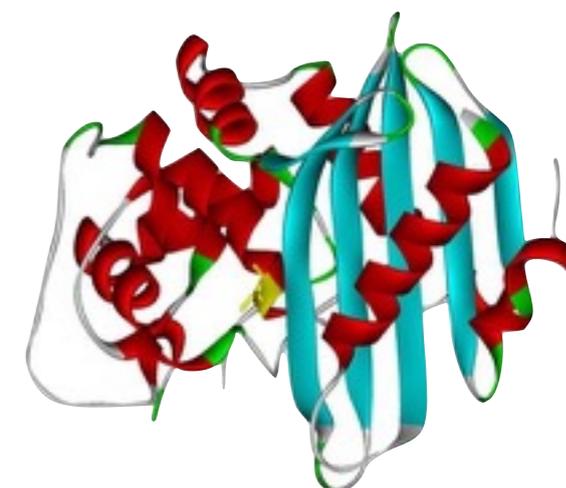
класс В IMP-1

## «Семейный портрет» β-лактамаз

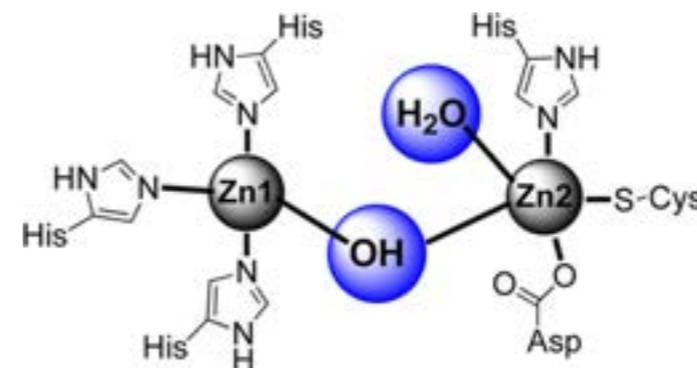
«Семейный портрет» β-лактамаз. По порядку слева направо: класс А SHV-1, класс В IMP-1, класс С *E. coli* AmpC, класс D OXA-1. Для классов А, С, и D в активном центре фермента показан желтым Ser; для класса В показаны два атома Zn в активном центре фермента. Основано на рентгеноструктурных данных из PDB: структуры 1SHV, 1DDK, 2BLS, и 1M6K, соответственно (заимствовано из Sarah M. Drawz, and Robert A. Bonomo Clin. Microbiol. Rev. 2010;23:160-201.



класс С *E. coli* AmpC



класс D OXA-1



Активный центр Zn<sup>2+</sup>-  
содержащей β-лактамазы  
подкласса B1 BcII из  
*B. cereus*

# Из круга проблем, связанных с резистентностью нозокомиальной микрофлоры к антибиотикам в России, наиболее актуальны следующие:

---

Полирезистентность широкого спектра грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. и др.), вызванная образованием этими бактериями  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра.

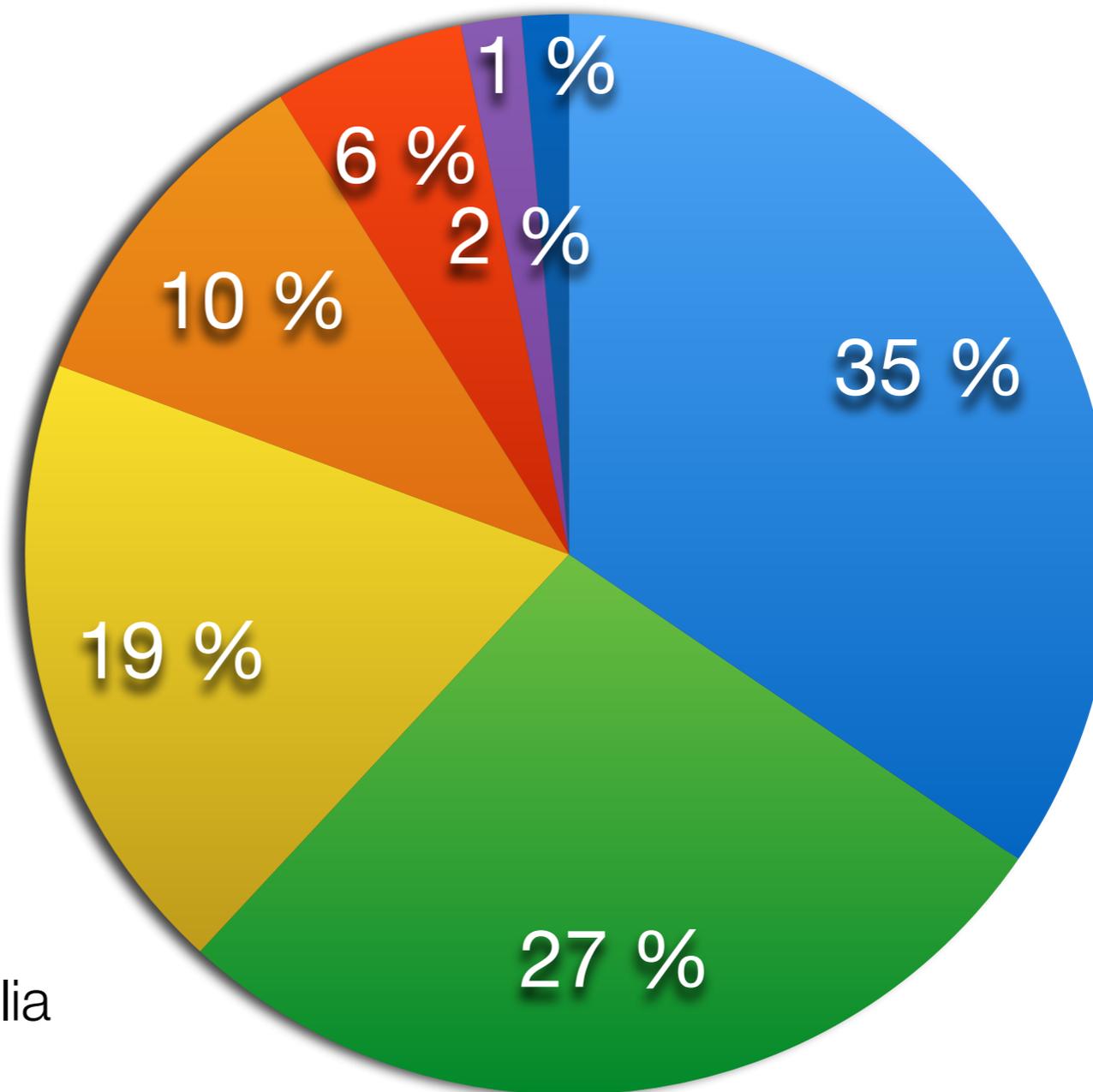
Метициллинорезистентность или, фактически, полирезистентность у *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Резистентность *Enterococcus faecium* к ванкомицину.

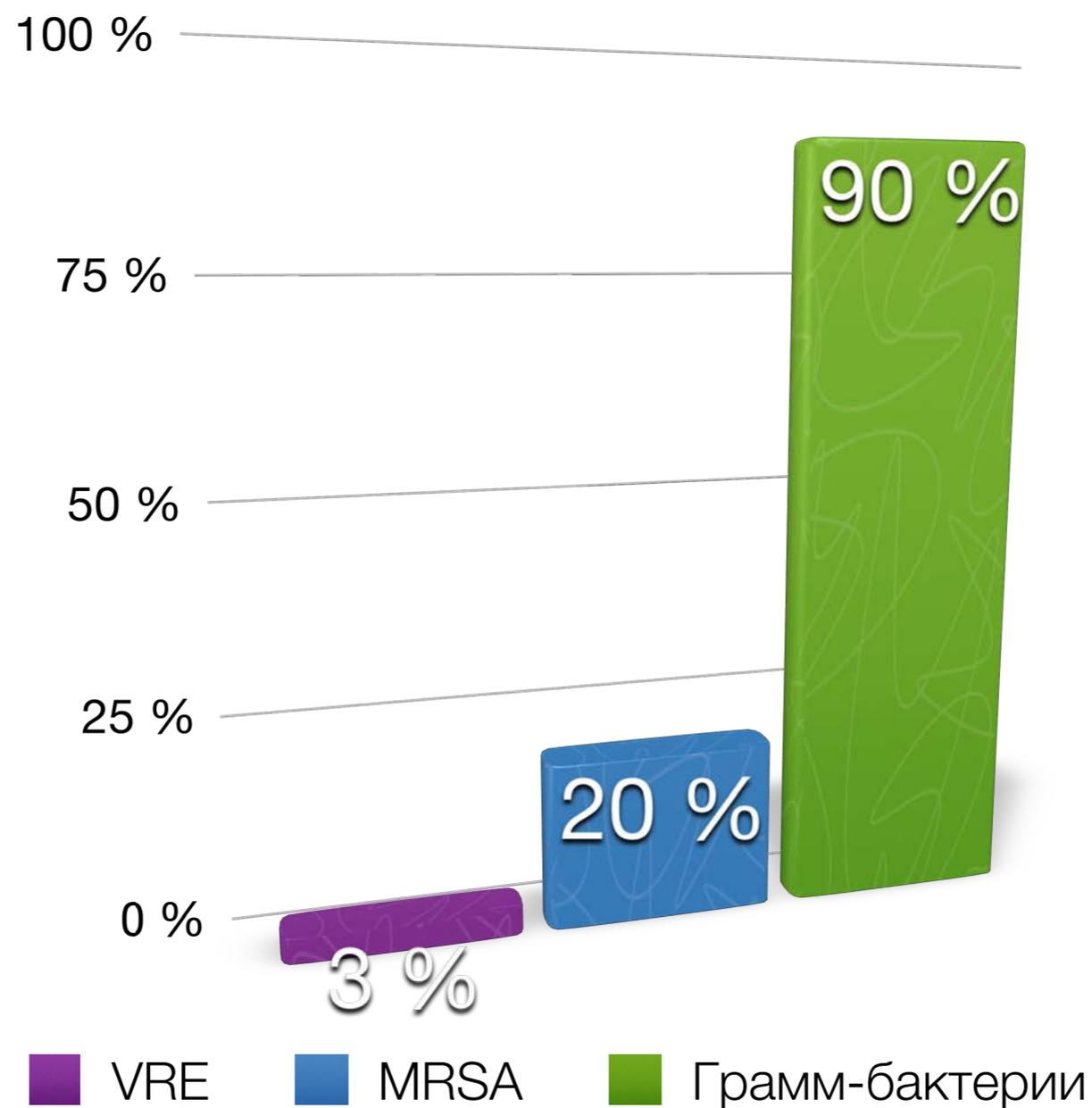
# Этиология нозокомиальных инфекций в России

Грам(-) - 75%  
Грам(+) - 25%

- Enterobacteriaceae
- Pseudomonas aeruginosa*
- Staphylococcus aureus*
- Acinetobacter* spp.
- Enterococcus* spp.
- Stenotrophomonas maltophilia*
- Другие



# Проблемные микроорганизмы по мнению врачей (МАКМАХ, г. Москва 2015 г.)



по неопубликованным данным Куцеваловой О. Ю. (2015)

Полирезистентность широкого спектра грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* и др.), вызванная образованием этими бактериями  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра

# Что такое $\beta$ -лактамазы расширенного спектра?

---

$\beta$ -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), или Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamases (ESBL) – это ферменты, которые вырабатываются грамотрицательными бактериями и обуславливают их резистентность почти ко всем  $\beta$ -лактамным антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином, азтреонаму и др.).

Более или менее «гарантированную» активность (в 99–100% случаев) в отношении продуцентов БЛРС еще проявляют карбапенемы.

## Почему $\beta$ -лактамазы расширенного спектра вызывают такую тревогу?

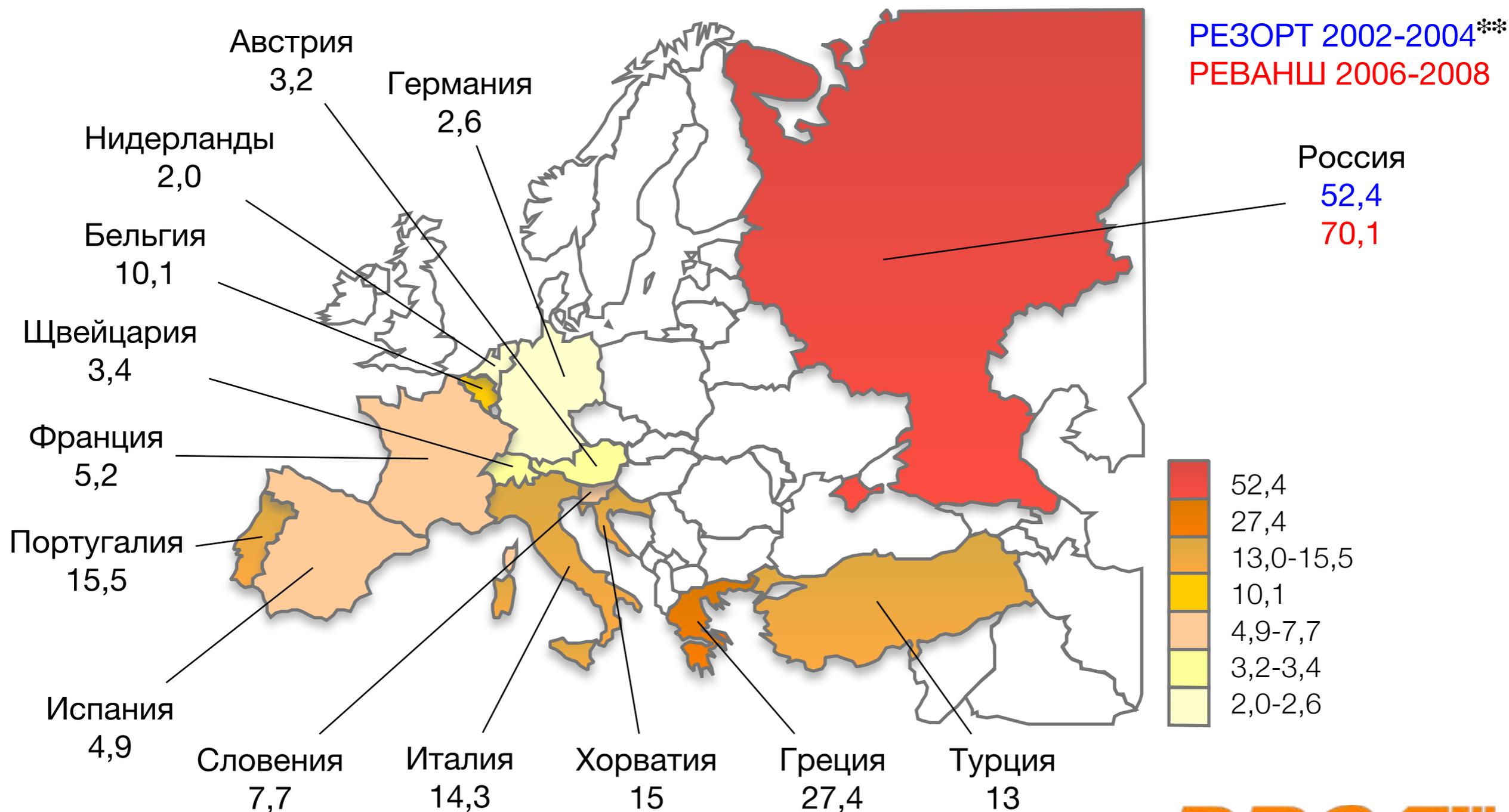
$\beta$ -лактамазы расширенного спектра не наделяют бактерии какими-то особыми факторами патогенности или вирулентности. Опасность инфицирования бактериями – продуцентами  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра обусловлена другими обстоятельствами, среди них:

- резистентность этих бактерий ко всем пенициллинам и цефалоспорином, что ограничивает применение важнейших классов антибиотиков;
- сопутствующая полирезистентность к другим классам антибиотиков (аминогликозидам, фторхинолонам и др.), которые применяются при тяжелых инфекциях;
- быстрое распространение продуцентов  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра среди грамотрицательных бактерий, в том числе принадлежащих к другим родам;

## Почему $\beta$ -лактамазы расширенного спектра вызывают такую тревогу?

- трудность выявления продуцирующие  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра штаммы общепринятыми микробиологическими методами;
- частая клиническая неэффективность лечения, так как инфекции вызванные продуцирующими  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра штаммами гораздо труднее поддаются антибактериальной терапии, как следствие отмечается ухудшение течения инфекций, рост летальности по сравнению с инфекциями, вызванными возбудителями, не продуцирующими  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра;
- экономический ущерб, который связан с усложнением микробиологической диагностики, затратами на инфекционный контроль, необходимостью применять дорогостоящие антибиотики, клинической неэффективностью и дополнительными расходами в связи с увеличением срока пребывания в стационаре.

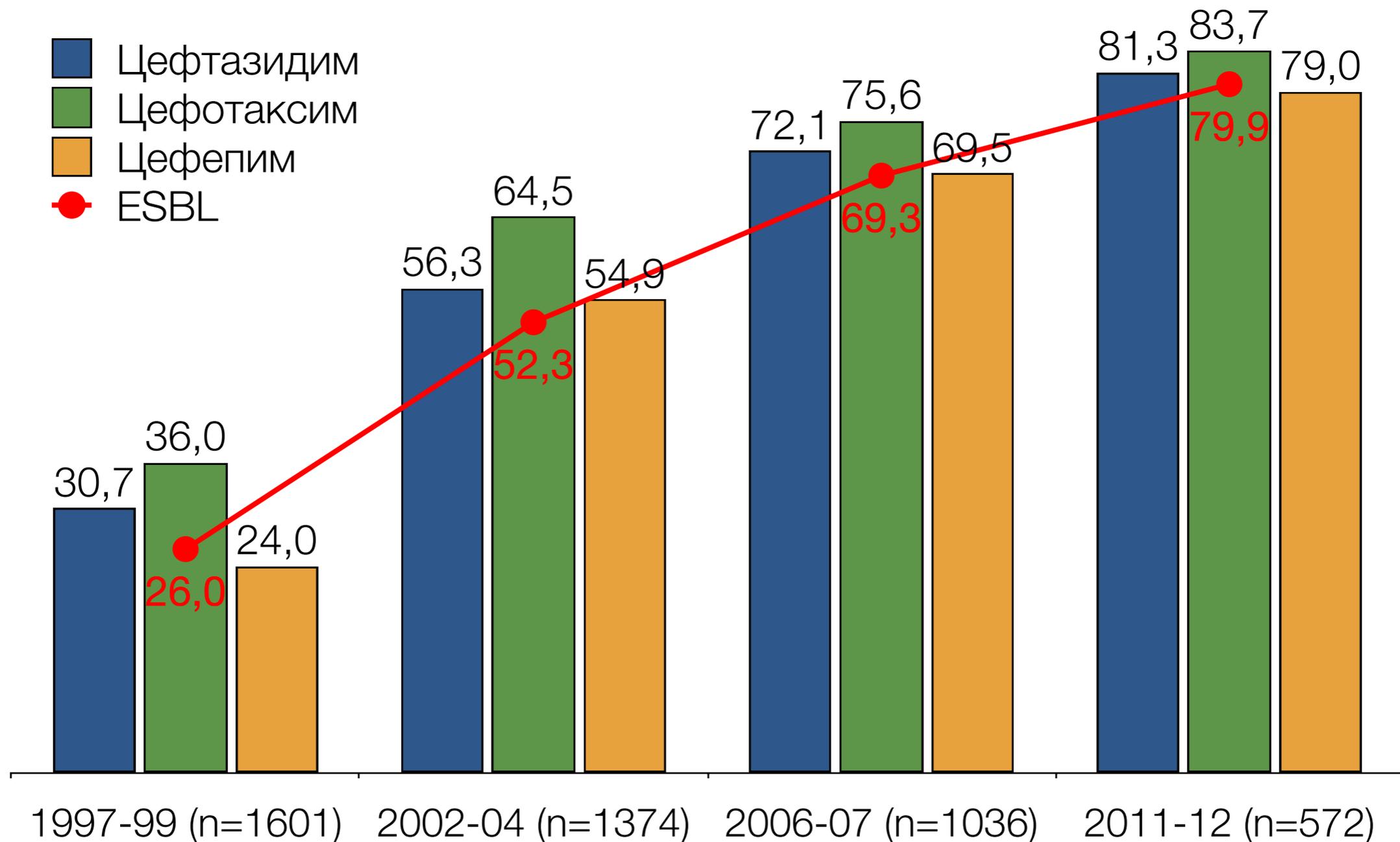
# Распространенность\* продуцентов $\beta$ - лактамаз расширенного спектра среди Enterobacteriaceae, %



\* Bouchillon et al., Int J Antimicrob Agents 2004 (24): 119-24

\*\* Edelstein et al., ICAAC, 2004, Washington, Poster: C2-1331

Рост распространенности с БЛРС и устойчивостью к цефалоспорином у  
нозокомиальных штаммов энтеробактерий в РФ  
(нечувствительные штаммы (I+R), % согласно критериям EUCAST v 4.0 (2014))



Обновленные данные НИИАХ  
Sukhorukova M. et al. 20th ECCMID, P716

# $\beta$ -лактамазы расширенного спектра – маркер полирезистентности

---

Бактерии вырабатывающие  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра часто имеют гены резистентности к антибиотикам других классов (аминогликозидам, фторхинолонам, ко-тримоксазолу), это подтверждается данными о высокой частоте ассоциированной антибиотикорезистентности у энтеробактерий, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра.

# β-лактамазы расширенного спектра циркулируют во внебольничных условиях

---

За последние годы произошло увеличение до 40% пациентов-носителей БЛРС изолятов, в анамнезе, не имеющих контакта со стационарами.

# Резистентность к карбапенемам

---

Если, до недавнего времени, при инфекции, вызванной БЛРС-продуцирующими микроорганизмами, гарантированно преодолеть барьер резистентности помогали карбапенемы, то за последние годы увеличилось количество тревожных сообщений о появлении микроорганизмов, устойчивых к карбапенемам.

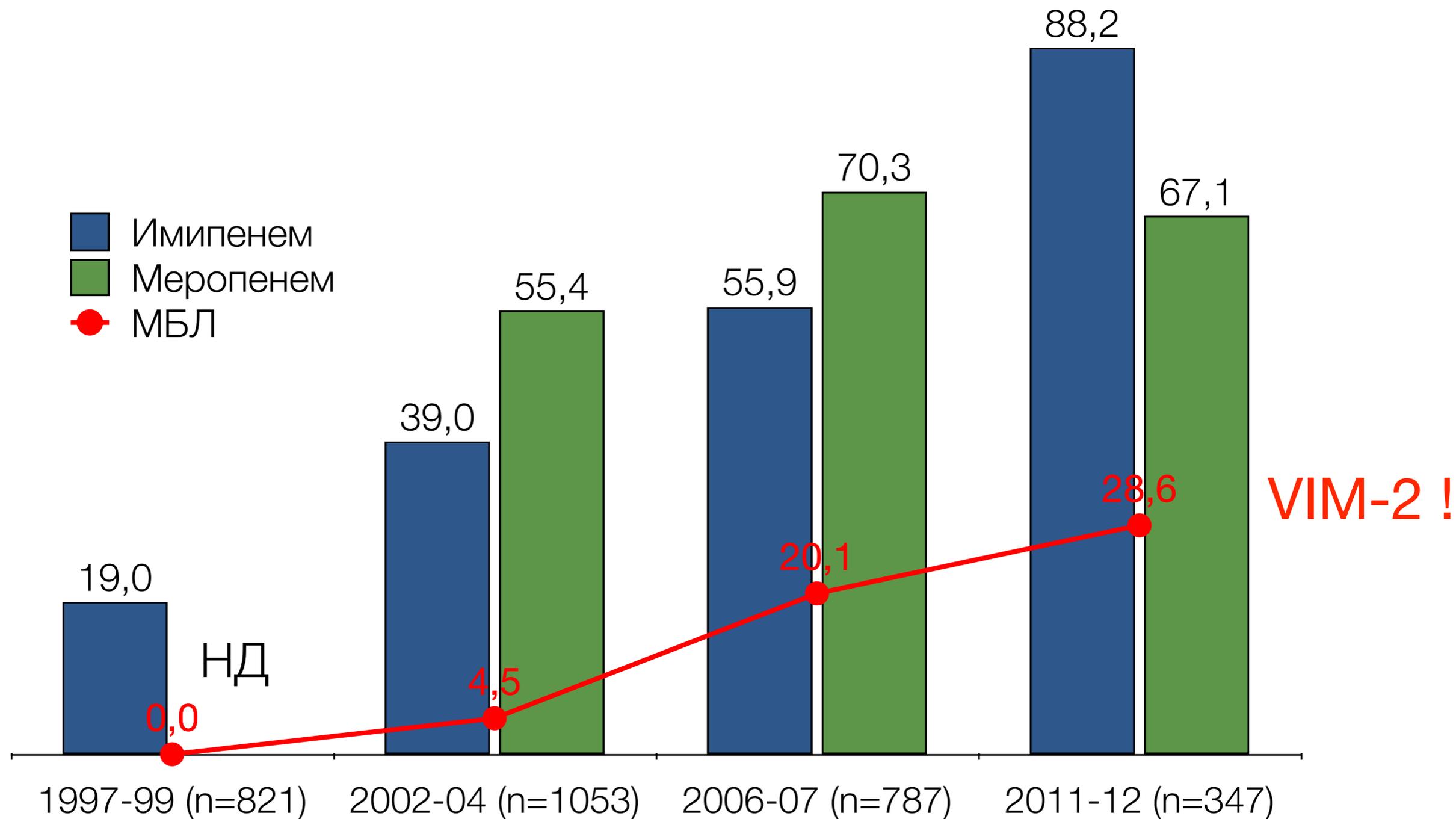
## Наиболее распространенные вторичные плазмидно-кодируемые $\beta$ -лактамазы

Формирование вторичной (приобретенной) резистентности к  $\beta$ -лактамам антибиотикам за счёт приобретения дополнительных  $\beta$ -лактамаз характерно практически для всех видов бактериальных возбудителей.

Среди наиболее важных вторичных плазмидно-кодируемых  $\beta$ -лактамаз у представителей семейства *Enterobacteriaceae* и грамотригативных неферментирующих бактерий можно отметить следующие:

- Бета-лактамазы расширенного спектра класса А энтеробактерий, обладают множественной лекарственной устойчивостью, в том числе к не-бета-лактамам препаратам. Сложность при рутинном выявлении и связанный с этим риск клинической неэффективности;
- Плазмидные цефалоспорины (AmpC) энтеробактерий, представляют серьезную опасность в связи с широким спектром резистентности возбудителей, включая цефалоспорины III поколения и комбинации  $\beta$ -лактамов с ингибиторами;
- Металло- $\beta$ -лактамазы (МБЛ) класса В, гидролизуют практически все  $\beta$ -лактамы, включая карбапенемы.

Динамика устойчивости к карбапенемам и продукции МБЛ у  
нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa* в РФ  
(нечувствительные штаммы (I+R), % согласно критериям EUCAST v 4.0 (2014))



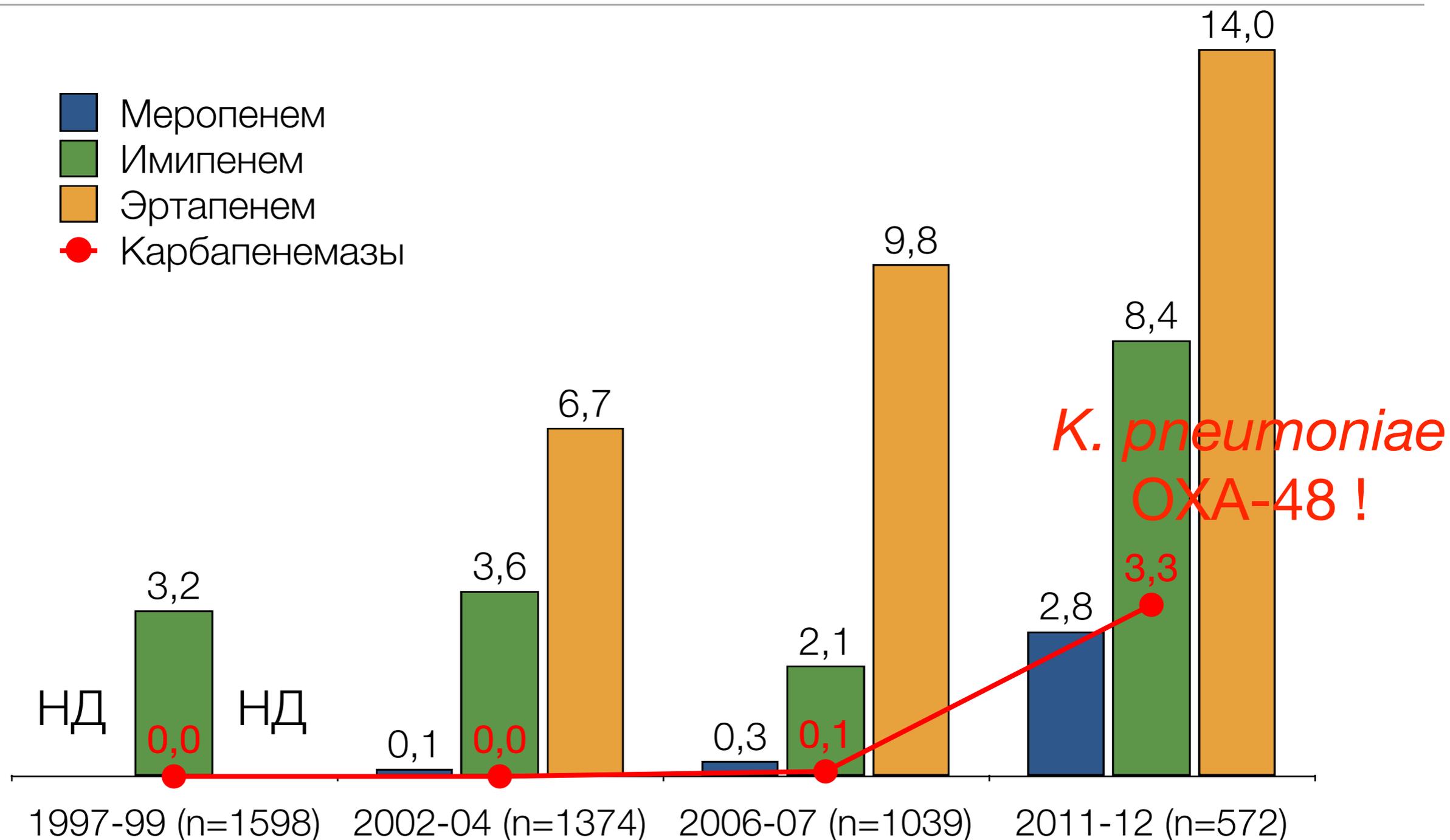
Edelstein M. et al. Lancet Infect Dis. 2013 13(10):867-76  
Skleenova E. et al. ICAAC 2013 C2-1092

## Наиболее распространенные вторичные плазмидно-кодируемые $\beta$ -лактамазы

---

- Карбапенемазы класса А энтеробактерий (особенно ферменты КРС-типа), вызывают резистентность к карбапенемам у энтеробактерий, в частности у *Klebsiella spp.*;
- Карбапенемазы класса D, выявление таких штаммов с помощью фенотипических и молекулярных тестов является важным, так как продукция этих ферментов обычно приводит к значительному повышению уровня резистентности к имипенему и меропенему и, как следствие, ведет к отсутствию терапевтического эффекта.

Динамика устойчивости к карбапенемам и продукции карбапенемаз у  
нозокомиальных штаммов энтеробактерий в РФ  
(нечувствительные штаммы (I+R), % согласно критериям EUCAST v 4.0 (2014))



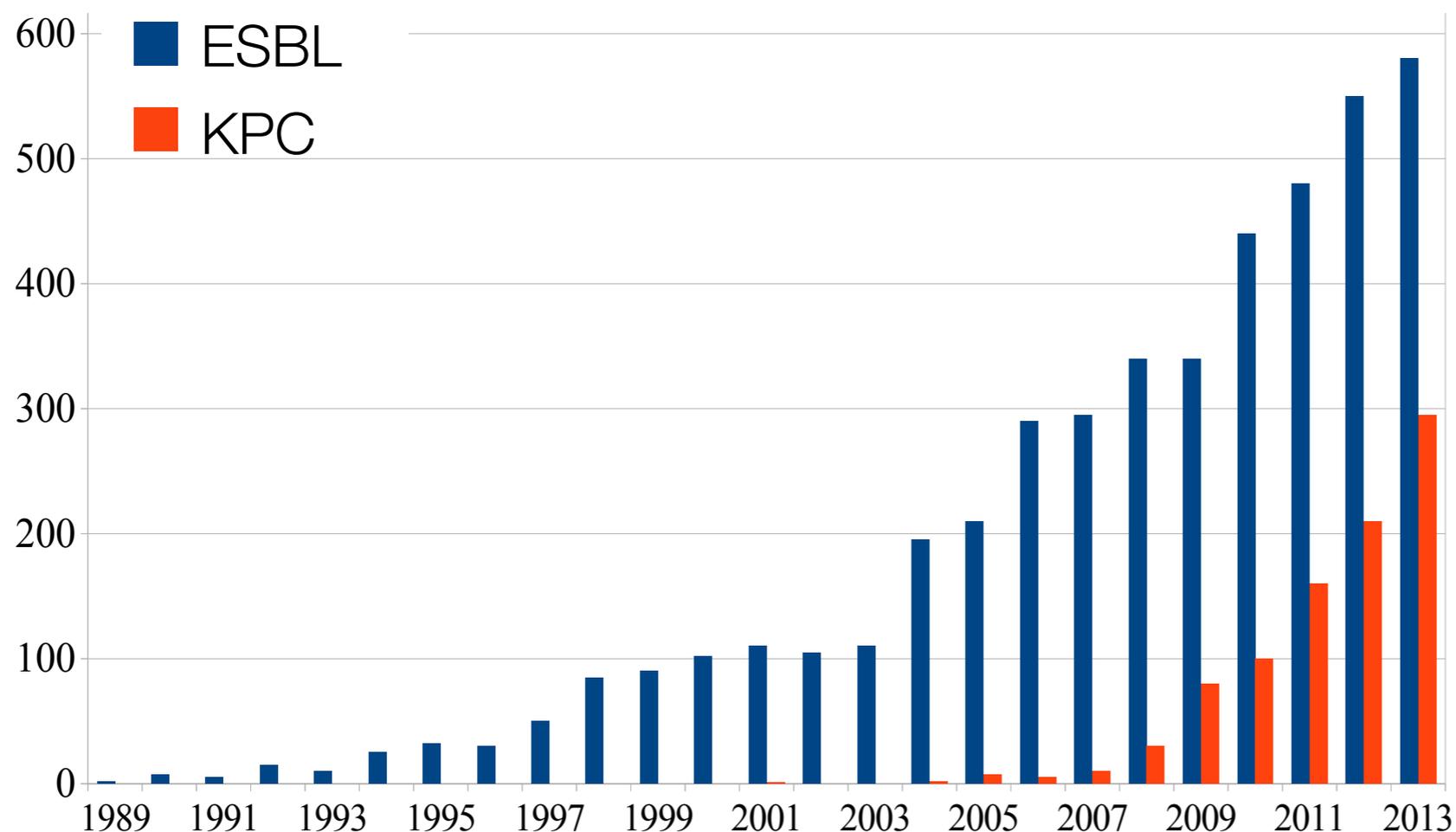


## Как обнаружить изоляты, продуцирующие OXA-48?

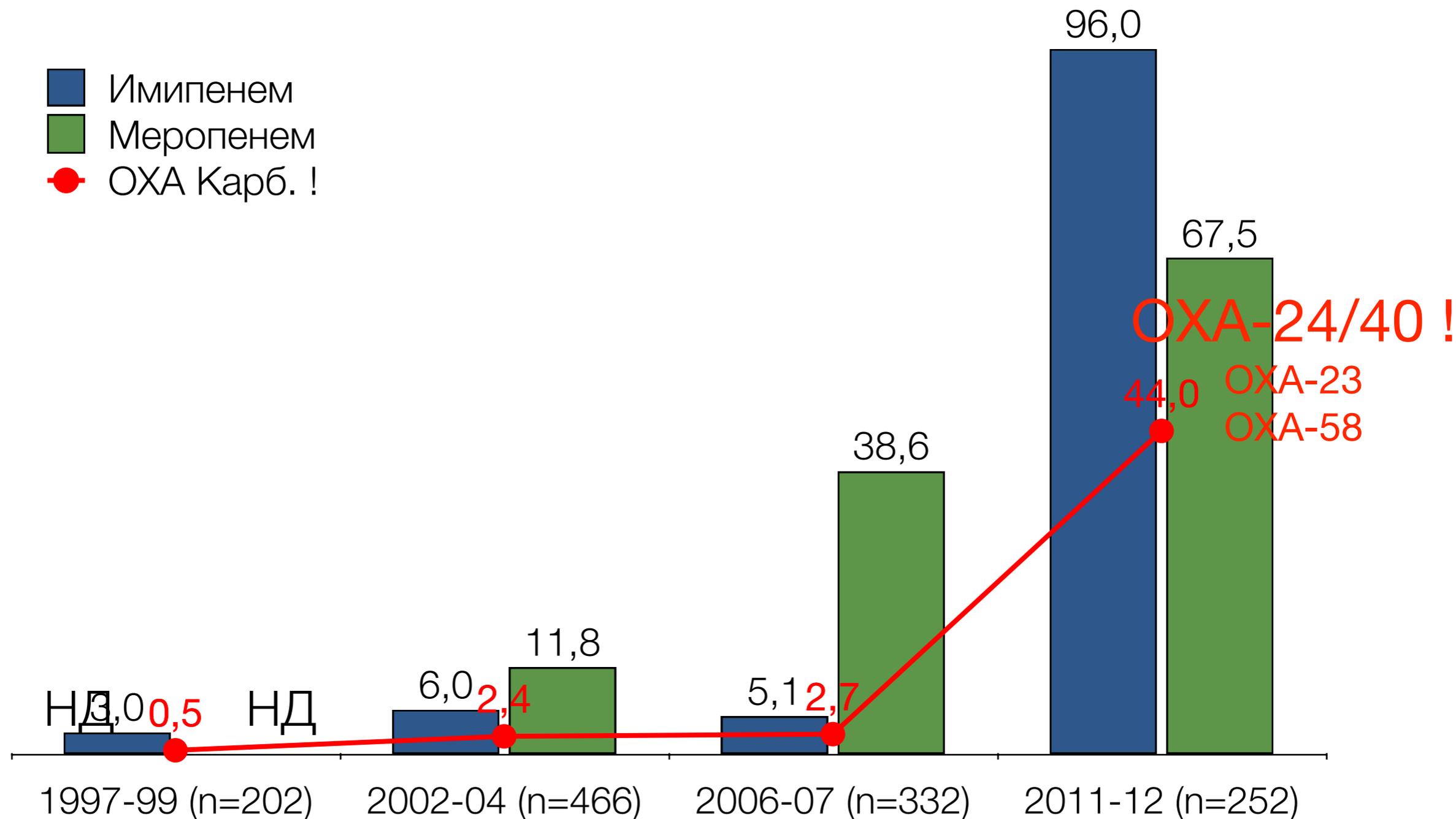
- Использование селективной среды CHROMagar KPC (изоляты, продуцирующие OXA-48 могут не расти на ESBL-селективных средах);
- Скрининг с имипенемом, в качестве индикатора карбапенемаз, позволяет обнаружить изоляты продуцирующие OXA-48.

## Распространенность карбапенемаз среди энтеробактерий

- Возрастает распространенность генов карбапенемаз среди изолятов, продуцирующих БЛРС, от больных;
- Общая распространенность генов карбапенемаз значительно выше среди *K. pneumoniae*, чем среди *E. coli*;
- Своевременное выявление и, тем самым, сдерживание БЛРС-продуцентов, является ключевым и в сдерживании карбапенем-резистентных изолятов.



Динамика устойчивости к карбапенемам и продукции карбапенемаз у  
нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в РФ  
(нечувствительные штаммы (I+R), % согласно критериям EUCAST v 4.0 (2014))



# Проблема антибиотикорезистентности грамнегативных бактерий обусловлена:

---

- Приобретенными карбапенемами;
- Частотой распространения;
- Полирезистентностью бактерий, связанной с образованием этими бактериями  $\beta$ -лактамаз.

**Продукция карбапенемаз является наиболее важным, но не единственным механизмом резистентности к карбапенемам у грамнегативных бактерий!**

# Проблема приобретенных карбапенемаз

---

- Продукция карбапенемаз – самый эффективный механизм резистентности к карбапенемам;
- Данный механизм антибиотикорезистентности имеет особое клиническое и эпидемиологическое значение;
- Возможности терапии инфекций, вызванных карбапенем-резистентными возбудителями, критически ограничены;
- Высока опасность широкого распространения карбапенем-резистентных возбудителей.

- Вызывают опасение штаммы чувствительные к карбапенемам, но уже являющиеся носителями карбопенемаз, что приводит к неэффективной терапии карбопенемами.
- Несвоевременная диагностика ведет к назначению несвоевременной и неадекватной терапии тяжелых инфекций, увеличивает вероятность летального исхода. Поэтому очень важно на ранних стадиях заражения выявить тип антибиотикорезистентности, чтобы подобрать адекватную схему лечения и использовать наиболее эффективные антибиотики. В случае тяжелых инфекций это нужно сделать в кратчайшие сроки.
- Многообразиие  $\beta$ -лактамаз, их широкое распространение среди грамотрицательных возбудителей и, одновременно, ведущая роль в формировании устойчивости к  $\beta$ -лактамамным антибиотикам, диктует необходимость всестороннего изучения и внедрения в широкую практику надежных и максимально стандартизированных методов их обнаружения.
- Изучение разнообразия, свойств и эпидемиологии  $\beta$ -лактамаз является важной задачей микробиологических лабораторий, исследующих механизмы устойчивости к  $\beta$ -лактамам. Успех в решении этой задачи в значительной степени определяется возможностью комплексного использования современных фенотипических и молекулярно-генетических методов исследования, что в свою очередь будет способствовать успеху в лечении.

# Выявление продукции $\beta$ -лактамаз расширенного спектра у энтеробактерий с помощью селективных сред у больных гемобластозами, 2014

---

По данным Коробовой А.Г. и Клясовой Г.А.  
ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ, Москва

Период исследования: Апрель – Декабрь 2013 г.

Исследовано 1600 образцов со слизистой ротоглотки и прямой кишки.

# Значение энтеробактерий с продукцией БЛРС

Энтеробактерии – причина сепсиса в 33% случаев  
у больных опухолями крови.

50-52% штаммов продуцируют БЛРС (Клясова Г.А. и соавт., 2012).

Основной путь инфицирования при нейтропении – транслокация со  
слизистой оболочки ЖКТ в кровотоки.

## Активность антибиотиков:

- устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином и монобактамам,
- полирезистентность к другим классам антибиотиков (фторхинолоны, аминогликозиды, ко-тримоксазол),
- активны только карбапенемы и тигециклин.

## Цель исследования

Изучить выявление продукции БЛРС у энтеробактерий с помощью хромогенной селективной среды и сравнить со стандартными методами детекции БЛРС (метод «двойных дисков»).

## Методы детекции БЛРС

	Метод	Время, ч
Стандартные методы	<ul style="list-style-type: none"><li>• Метод «двойных дисков»</li><li>• Метод комбинированных дисков</li><li>• Метод серийных разведений в бульоне</li></ul>	48 – 72
Селективные хромогенные среды для детекции БЛРС	<ul style="list-style-type: none"><li>• CHROMagar ESBL (CHROMagar, Франция) и др.</li></ul>	18 – 24

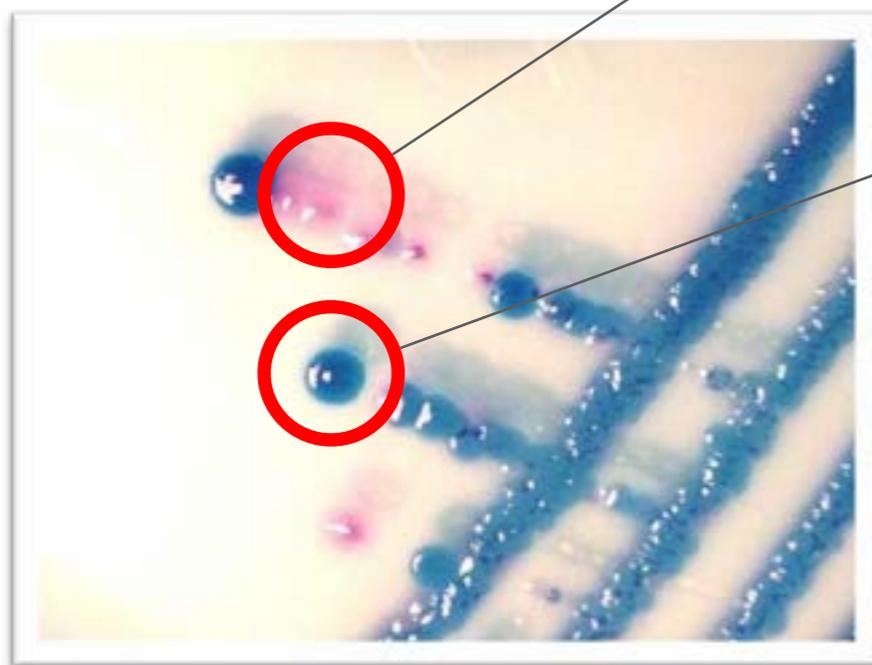
# Методы исследования



# Предварительная идентификация



*E. coli*



*Klebsiella spp.,  
Citrobacter spp.,  
Enterobacter spp.*

DRG International Inc./DRG Techsystems  
Suite 2, Building 1, 34, Novocheryomushkinskaya, Moscow, Russia, 117218  
Tel./Fax: 7 (499) 277 07 20  
zakaz@drgtech.ru/office@drgtech.ru  
[www.drgtech.ru](http://www.drgtech.ru)

# Результаты исследования

---

Выделено 1243 штамма энтеробактерий.

Из них: 409 (33%) - рост на селективной хромогенной среде.

## Спектр энтеробактерий, выявленных на селективной среде (n=409)

<i>E. coli</i>	226 (55 %)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	105 (26 %)
<i>Enterobacter spp.</i>	35 (8,5 %)
<i>Citrobacter spp.</i>	21 (5 %)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	15 (3,7 %)
<i>Proteus mirabilis</i>	4 (1%)
<i>Proteus vulgaris</i>	2 (0.5 %)
<i>Morganella morganii</i>	1 (0.3 %)

# Сравнение методов

	Селективная среда	Метод «двойных дисков»
Детекция	409	384 (94 %)
Несовпадение	-	25 (6 %)

Совпадение результатов выделения  
энтеробактерий с продукцией БЛРС на  
селективной среде и методом «двойных дисков»

	CHROMagar ESBL	Метод «двойных дисков»
<i>E. coli</i>	226	222 (98 %)
<i>K. pneumoniae</i>	105	105 (100 %)
<i>Enterobacter spp.</i>	35	23 (66 %)
<i>Citrobacter spp.</i>	21	18 (86 %)
<i>K. oxytoca</i>	15	12 (80 %)
<i>Proteus mirabilis</i>	4	4 (100 %)
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0
<i>Morganella morganii</i>	1	0
<i>Всего</i>	409	384 (94)

## Несоответствие результатов выделения энтеробактерий, продуцирующих $\beta$ -лактамазы на селективной среде и методом «двойных дисков»

Гиперпродукция ampC $\beta$ -лактамаз	16 / 409 (4 %)
Чувствительные к цефалоспорином III-IV поколения	9 / 409 (2 %)

Несоответствие: 25/409 (6%)

## Энтеробактерии с гиперпродукцией ampC β-лактамаз

	Выделено на селективной среде	ampC
<i>Enterobacter spp.</i>	35	12 (34 %)
<i>Citrobacter spp.</i>	21	3 (14 %)
<i>E. coli</i>	226	1 (0,5 %)
<i>Morganella morganii</i>	1	1

Несоответствие: 16/409 (4%)

## Энтеробактерии, чувствительные к цефалоспорином III-IV поколения

	Выделено на селективной среде	ampC
<i>K. oxytoca</i>	15	2 (13 %)
<i>Citrobacter spp.</i>	21	1 (5 %)
<i>E. coli</i>	226	3 (1 %)
<i>Proteus vulgaris</i>	2	2

Несоответствие: 9/409 (2%)

# Значение селективной среды CHROMagar ESBL для выявления энтеробактерий, продуцирующих $\beta$ -лактамазы

---

Чувствительность - 98%.

Специфичность - 97%.

# Выводы по результатам исследования

- Высокая чувствительность и специфичность хромогенной селективной среды для детекции БЛРС (совпадение результатов в 94% случаев).
- Несоответствия результатов в 6 % случаев (гиперпродукция ampC у 4 % – чаще Enterobacter spp. и Citrobacter spp; чувствительность к цефалоспорином III-IV поколения – 2 % энтеробактерий).
- Сокращение времени до получения положительного результата до 18 – 24 часов при использовании хромогенной селективной среды.

DRG International Inc./DRG Techsystems  
Suite 2, Building 1, 34, Novocheryomushkinskaya, Moscow, Russia, 117218  
Tel./Fax: 7 (499) 277 07 20  
zakaz@drgtech.ru/office@drgtech.ru  
[www.drgtech.ru](http://www.drgtech.ru)

# Состояние антибиотикорезистентности в г. Ростове-на-Дону, 2014 г.

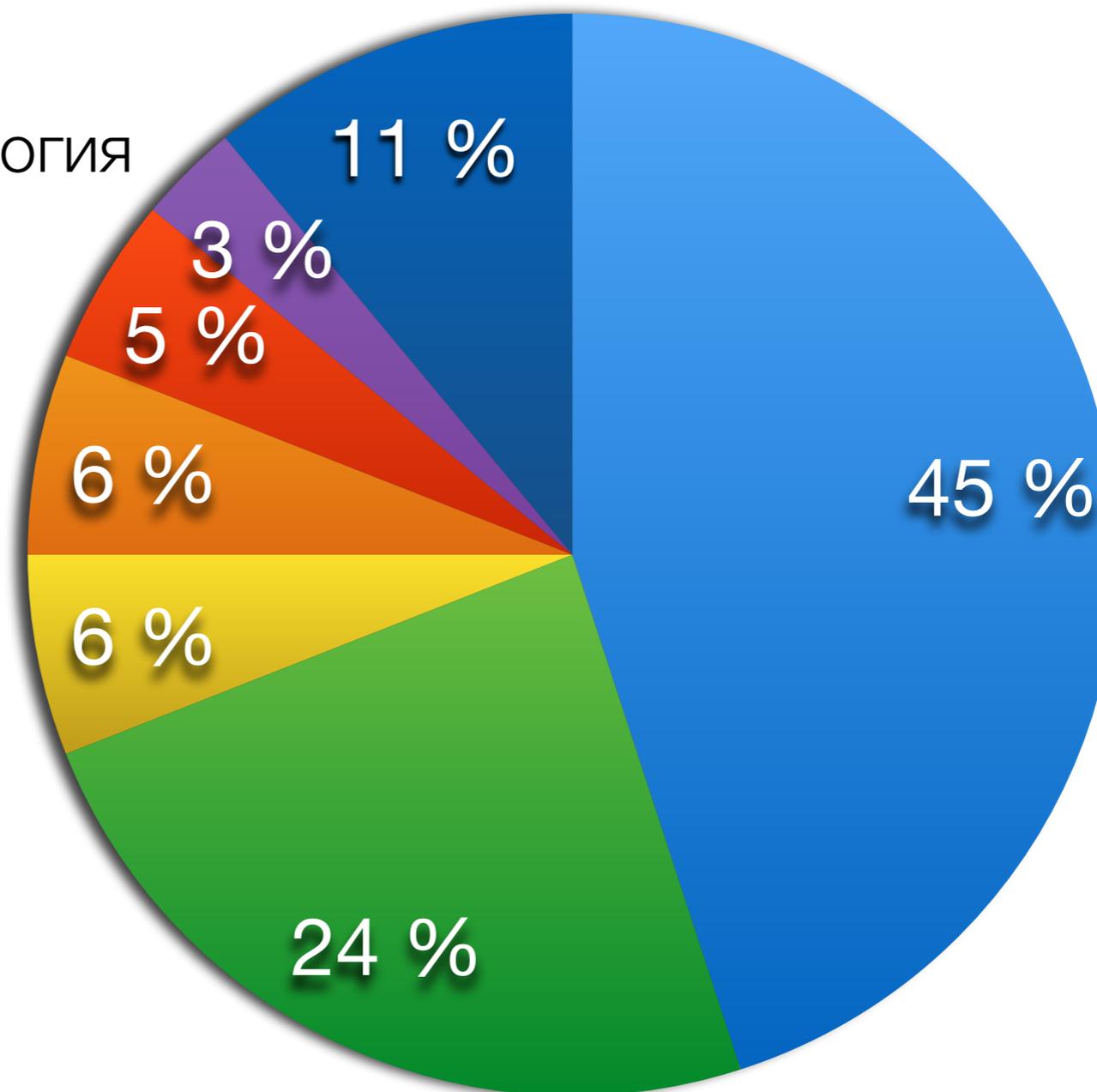
---

По данным Куцеваловой О.Ю.

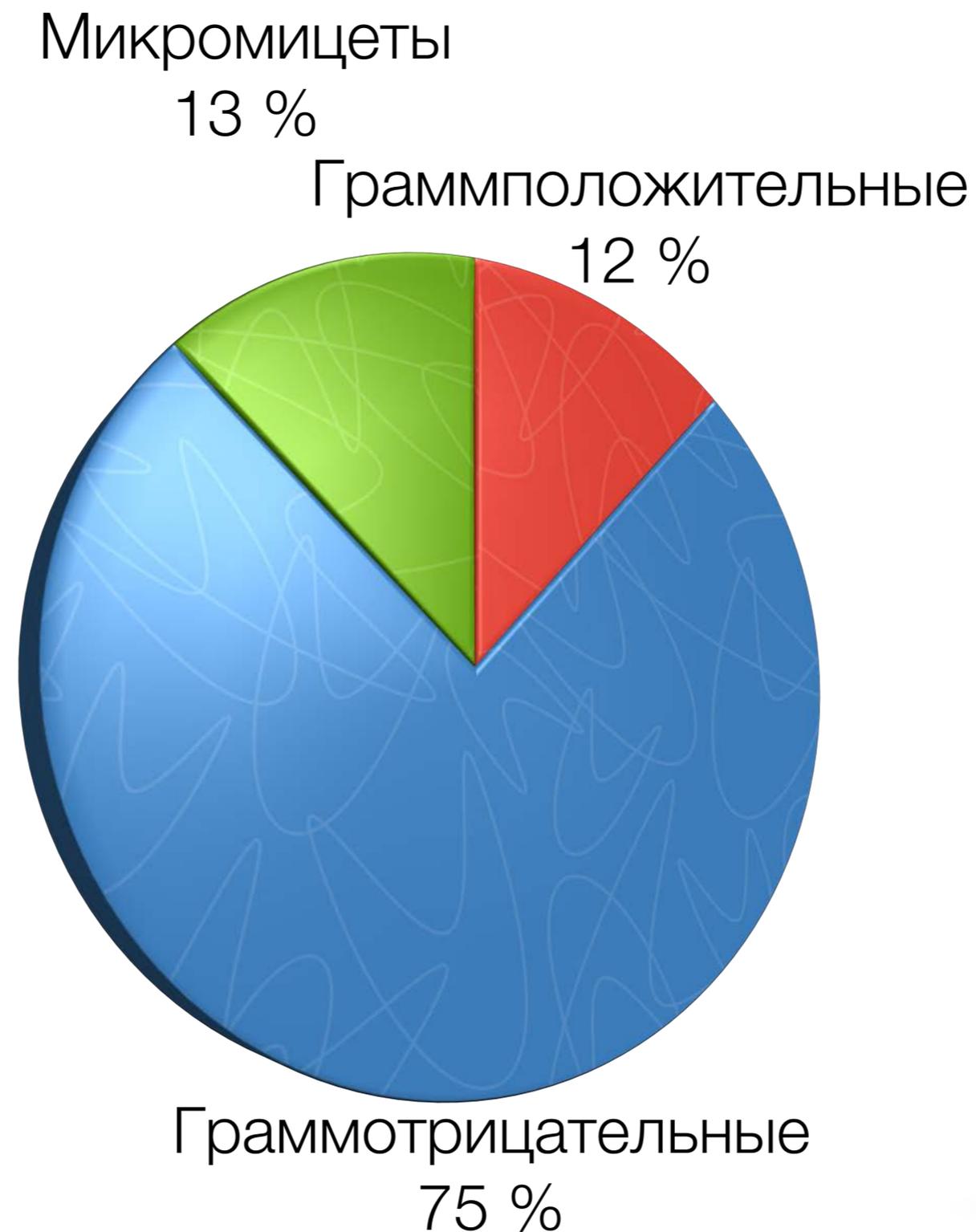
Ростовская клиническая больница ФГБУЗ ЮОМЦ ФМБА России

## Структура по отделениям

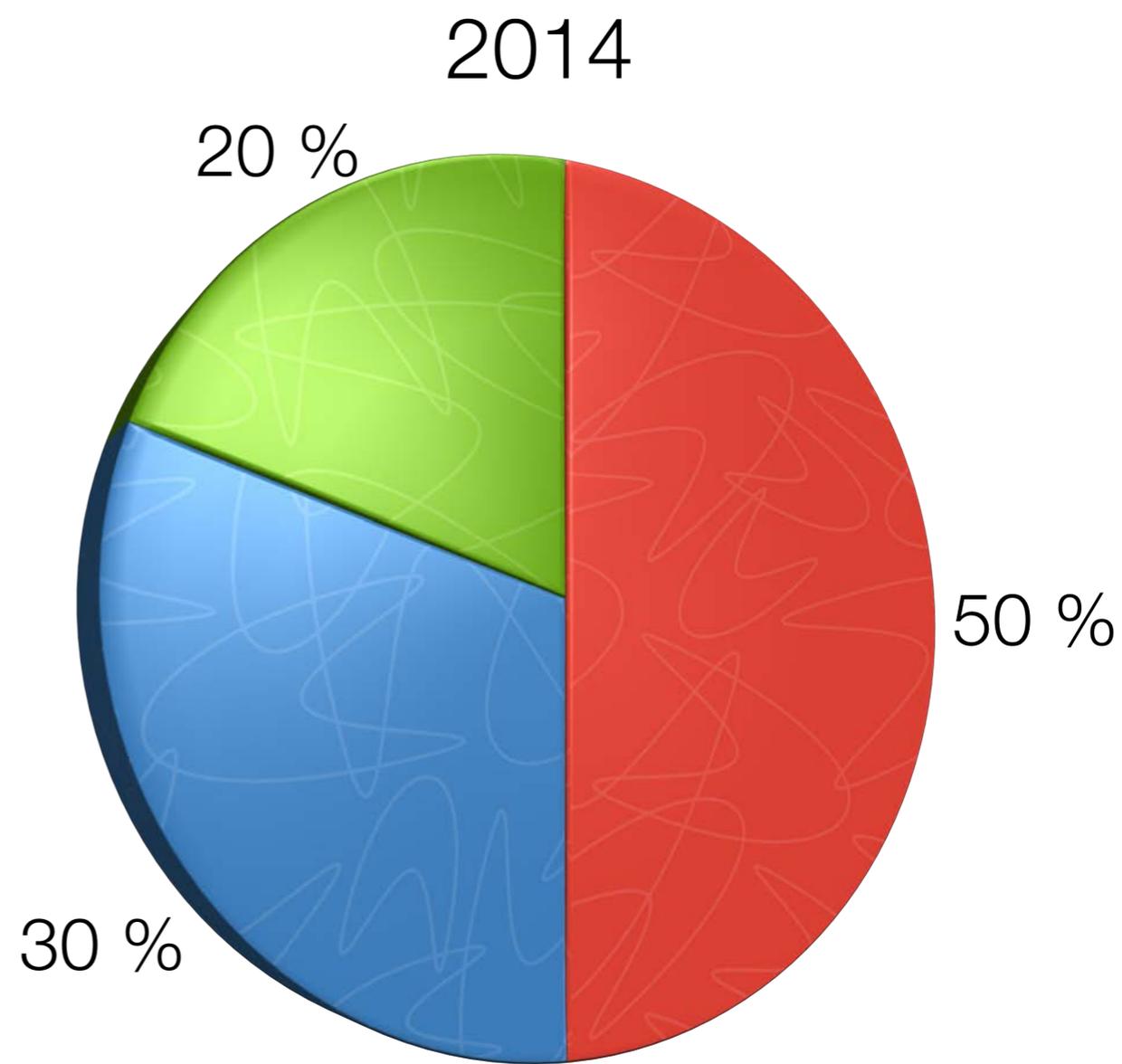
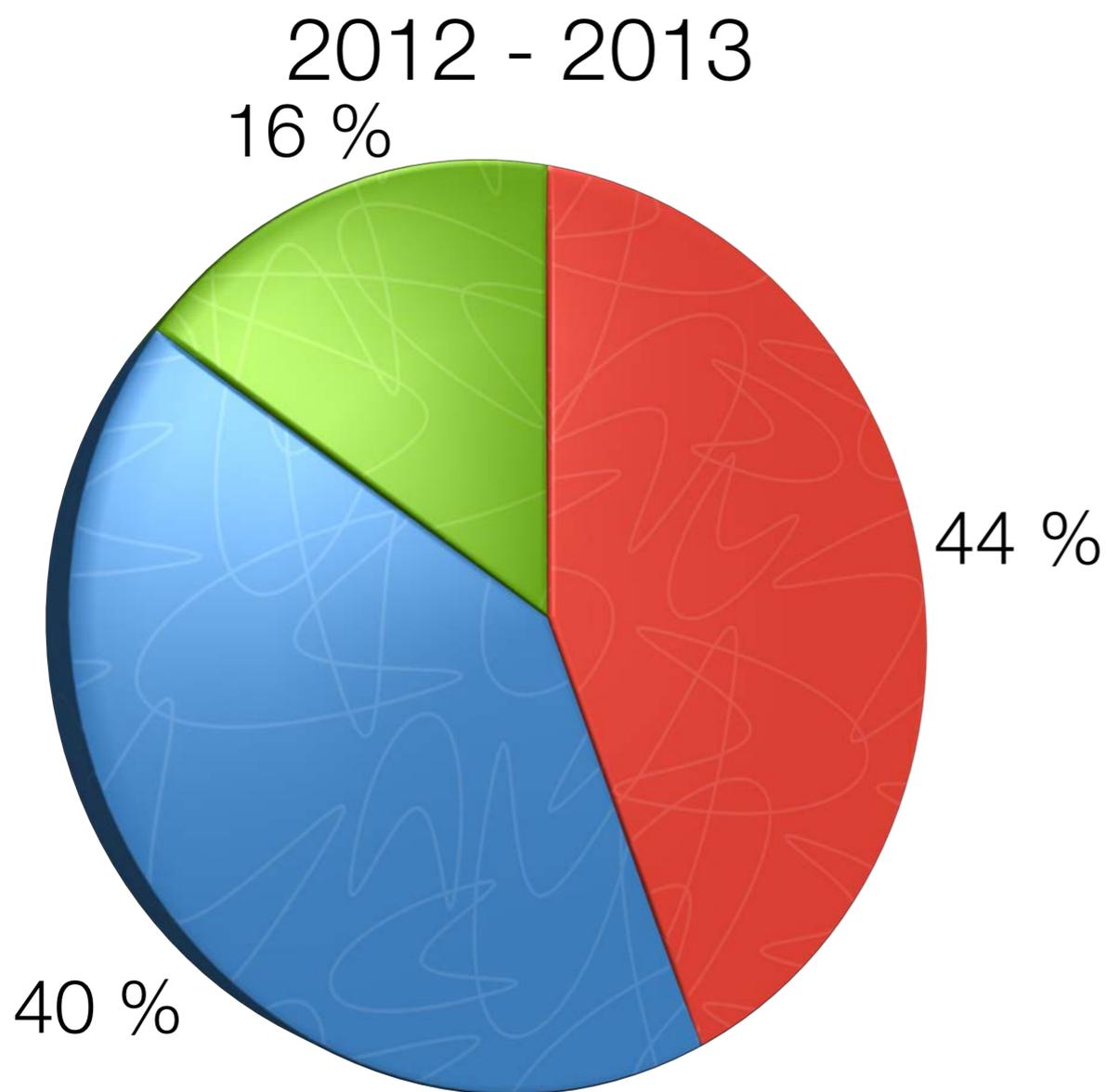
- Реанимация
- Хирургия
- Акушерство и гинекология
- Гемодиализ
- Терапия
- Урология
- Прочие



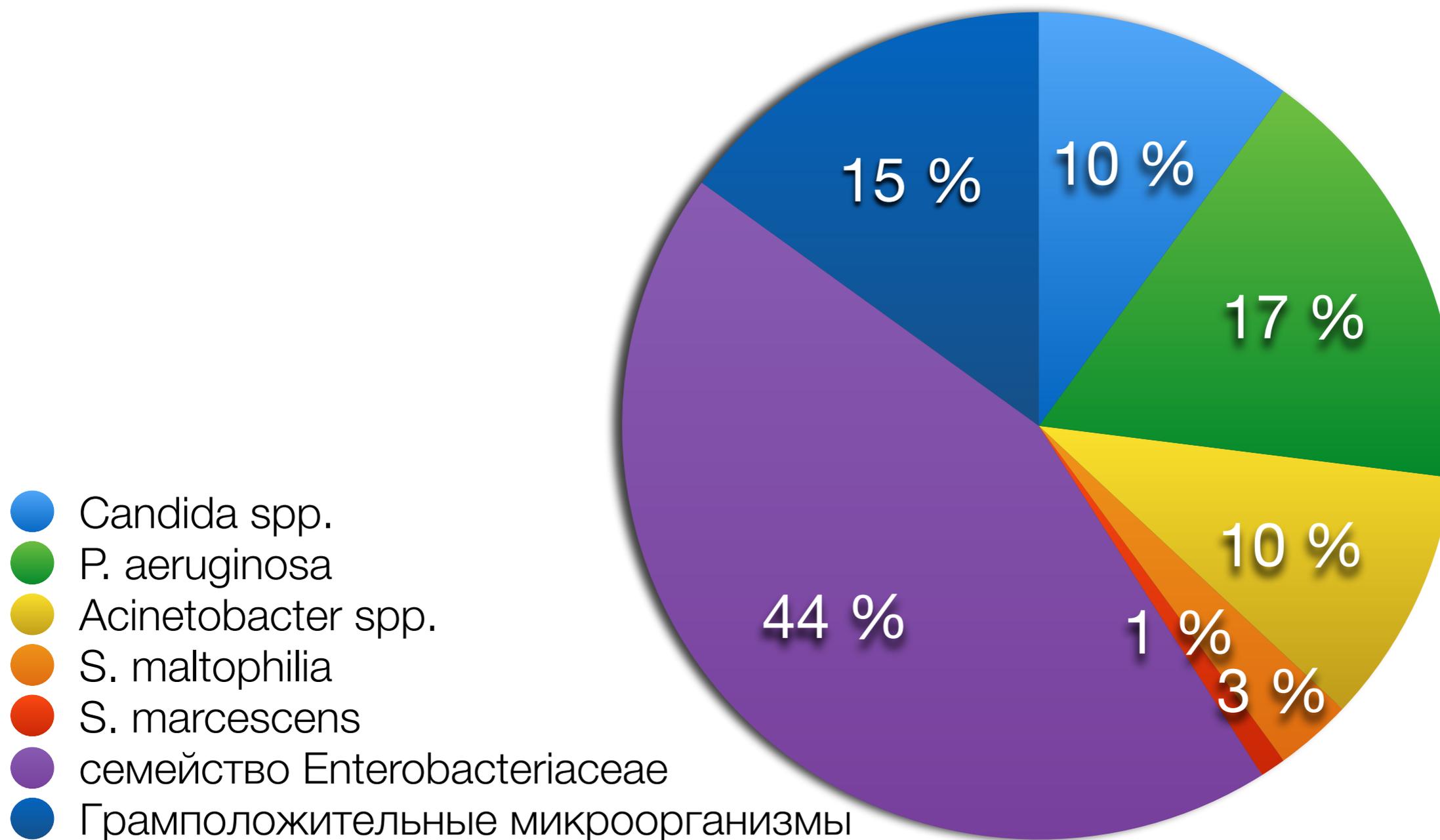
# Этиологическая структура возбудителей



# Этиологическая структура возбудителей сепсиса

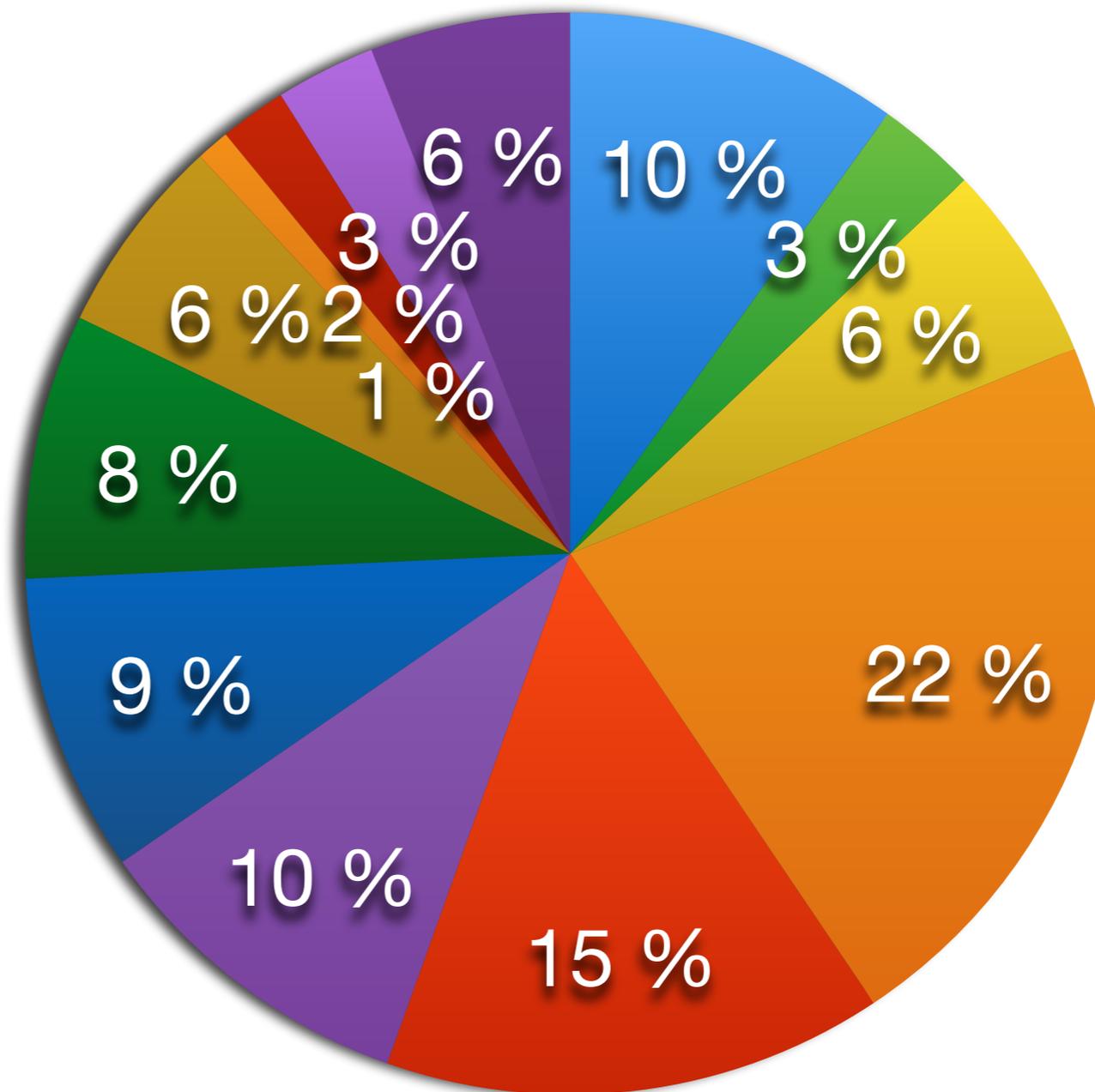


## Основные возбудители инфекций, выделенные из различного клинического материала



## Этиологическая структура возбудителей сепсиса (n=91) 2014 г.

- Candida albicans
- Candida glabrata
- Candida spp.
- Staphylococcus aureus
- Enterococcus faecalis
- Enterococcus faecium
- Klebsiella pneumoniae
- Pseudomonas aeruginosa
- Escherichia coli
- Enterobacter cloacae
- Enterobacter amnigenus
- Providencia rettgeri
- Acinetobacter baumannii



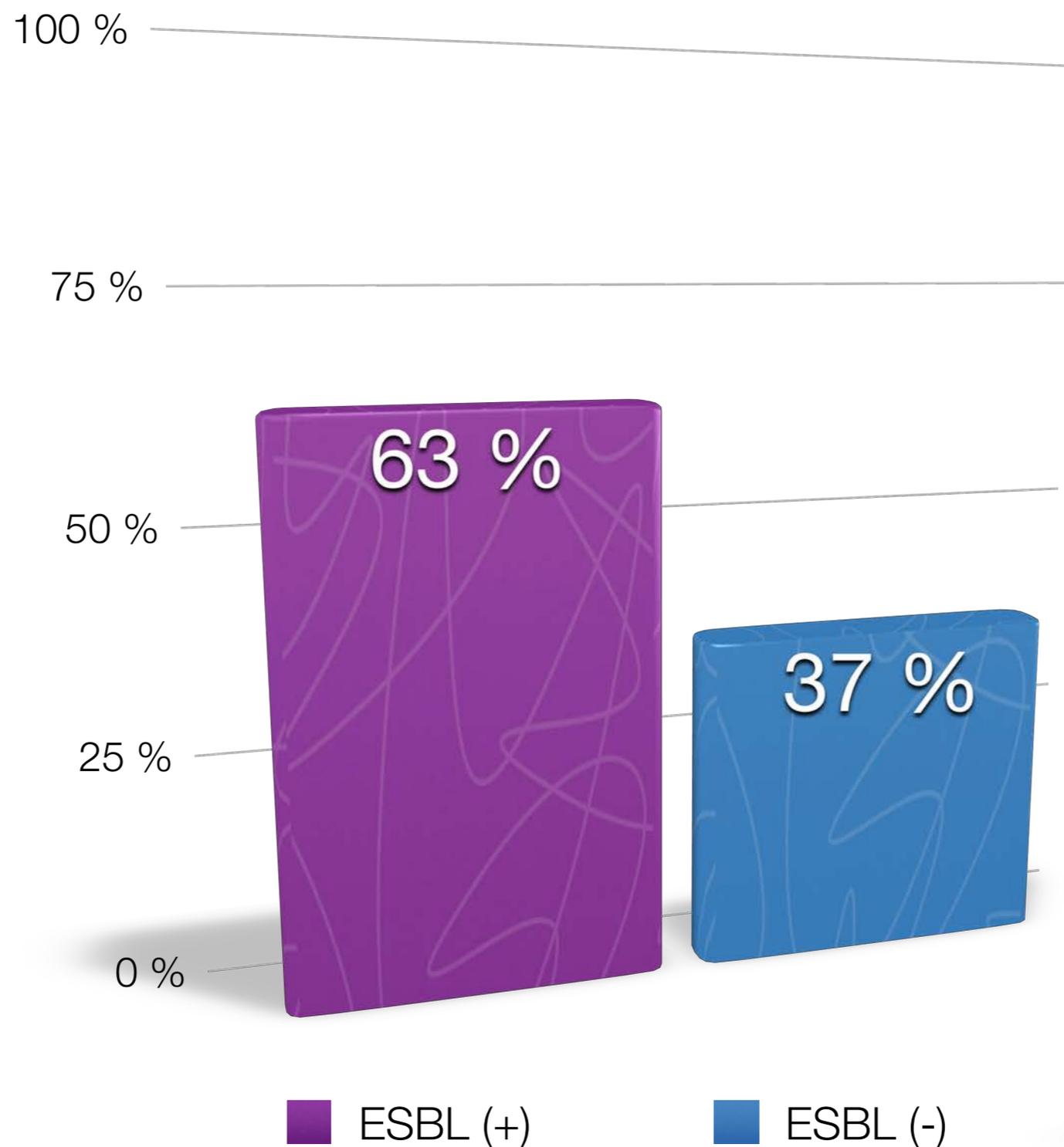
Частота  
антибиотикорезистентности (%)  
*Staphylococcus aureus*

	S. aureus оксациллин (+) (76%)	S. aureus оксациллин (-) (24%)
Оксациллин	0	100
Эритромицин	19	60
Клиндамицин	13	80
Гентамицин	19	100
Ципрофлоксацин	31	60
Котримоксазол	25	60
Линезолид, ванкомицин	0	0

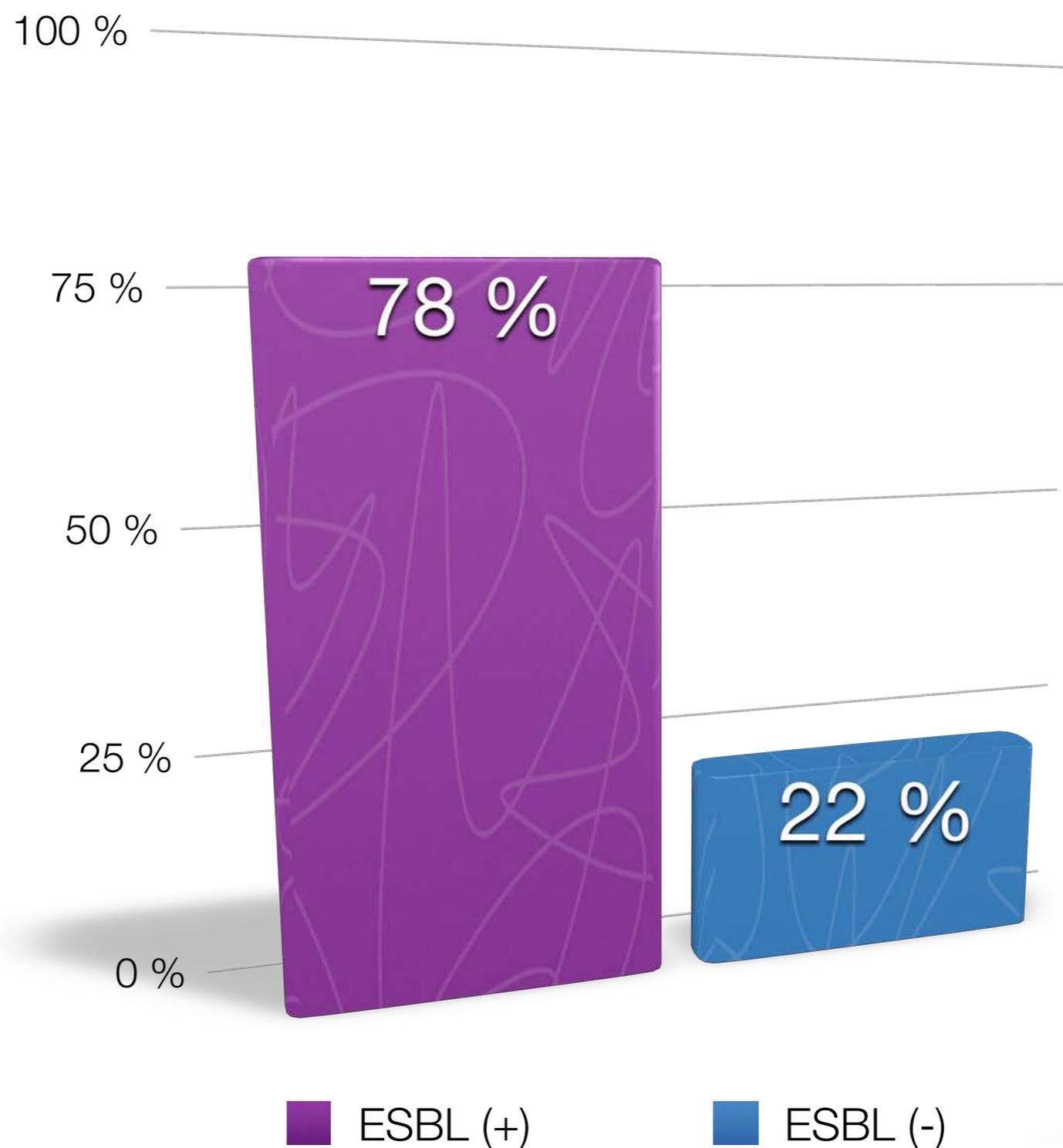
Частота встречаемости — 5%

Ампициллин (пенициллин)	35
Гентамицин	65
Ципрофлоксацин	78
Хлорамфеникол	48
Тетрациклин	57
Ванкомицин	1 штамм (4%)
Линезолид	0

## Частота встречаемости у энтеробактерий устойчивости за счет продукции ESBL (%)



# Частота встречаемости у устойчивости *K. pneumoniae* за счет продукции ESBL (%)



# Динамика продукции карбапенемаз у *K. pneumoniae* в Ростове-на-Дону

---

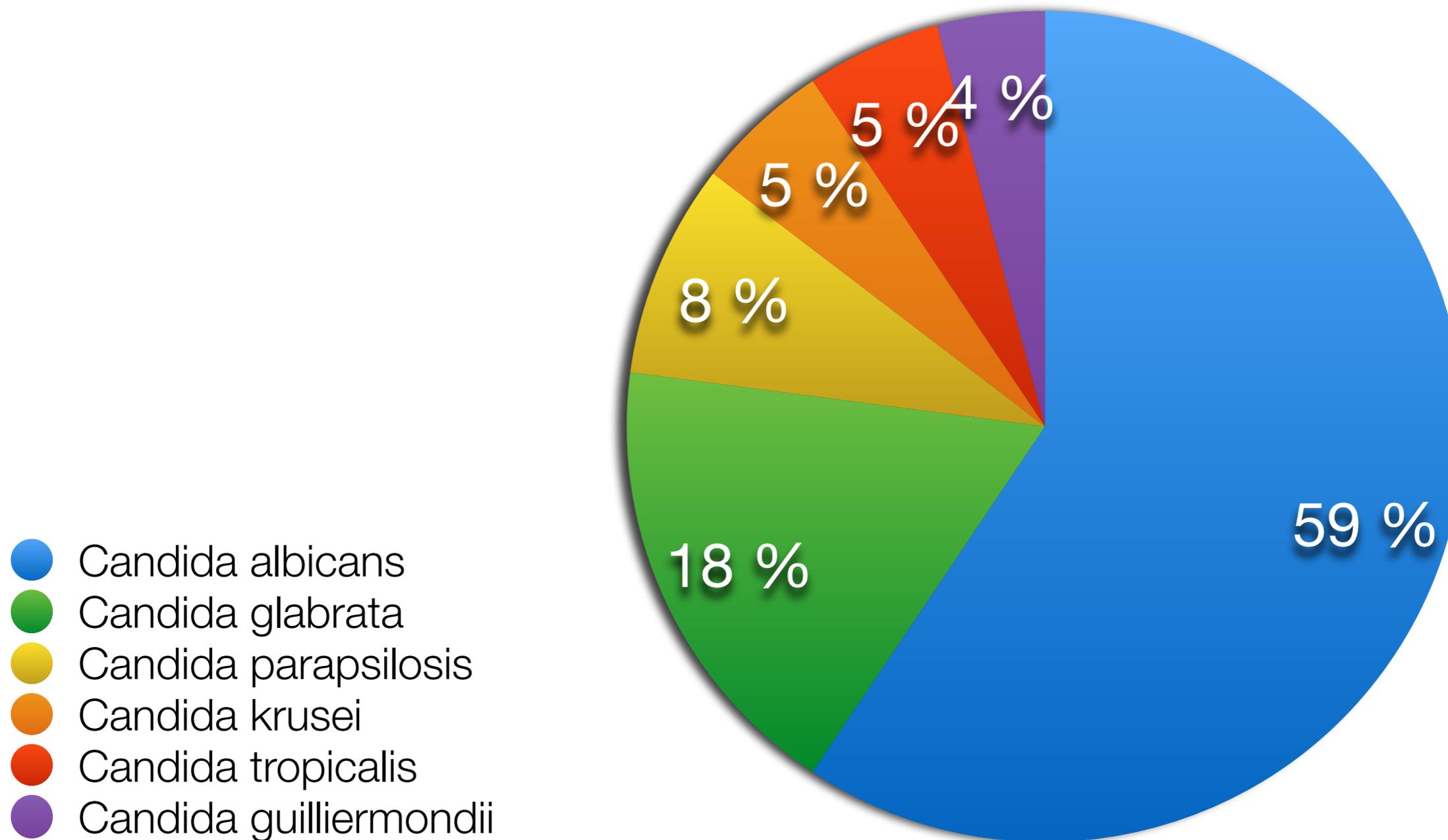
2012 г. – единичные штаммы из одного ЛПУ.

2014 г. – 6 ЛПУ.

Частота  
антибиотикорезистентности (%)  
*P. aeruginosa* (n=84) в ОРИТ

Амикацин	62
Гентамицин	75
Имипенем	86
Меропенем	86
Цефтазидим	48
Цефепим	76
Ципрофлоксацин	77
Пиперациллин / Тазобактам	81
Азтреонам	76

## Увеличение non-albicans видов среди возбудителей кандидоза



## Частота распределения S / I / R (%) среди возбудителей кандидоза

Вид	Флуконазол	Каспофунгин	Вориконазол
<i>C. albicans</i>	92 / 3 / 5	100 / 0 / 0	90 / 6 / 4
<i>C. parapsilosis</i>	82 / 4 / 14	98 / 0 / 2	88 / 11 / 1
<i>C. tropicalis</i>	95 / 5 / 0	100 / 0 / 0	100 / 0 / 0
<i>C. glabrata</i>	92 / 3 / 5	95 / 5 / 0	нет интерпретации
<i>C. krusei</i>	нет интерпретации	83 / 4 / 13	100 / 0 / 0
<i>C. guilliermondii</i>	100 / 0 / 0	56 / 0 / 44	100 / 0 / 0

## Заключение

---

Приведенные сведения далеко не полностью отражают состояние резистентности к антимикробным препаратам в стационарах Ростова-на-Дону, так как данные собраны из отдельных стационаров и, соответственно, возможны значительные различия частоты устойчивости как между ЛПУ так и между отдельными стационарами.

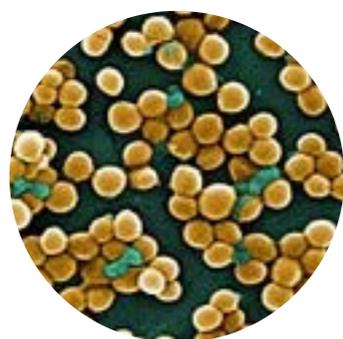
# Метициллинорезистентность или, фактически, полирезистентность у *Staphylococcus aureus* (MRSA)

# Staphylococcus aureus. Более века с нами...

## MRSA: Methicillin (Oxacillin) Resistant Staphylococcus Aureus

MRSA – устойчивы ко всем  $\beta$ -лактамам и обладают ассоциированной устойчивостью к аминогликозидам, линкозаминам, макролидам, тетрациклинам.

Механизм устойчивости: модификация мишени действия всех  $\beta$ -лактамных антибиотиков – пенициллинсвязывающего белка



Открытие *S. aureus*

Открытие пенициллина

Успешное лечение инфекции *S. aureus* пенициллином

Обнаружен *S. aureus* устойчивый к пенициллину, что привело к созданию метициллина

MRSA

Ванкомицин

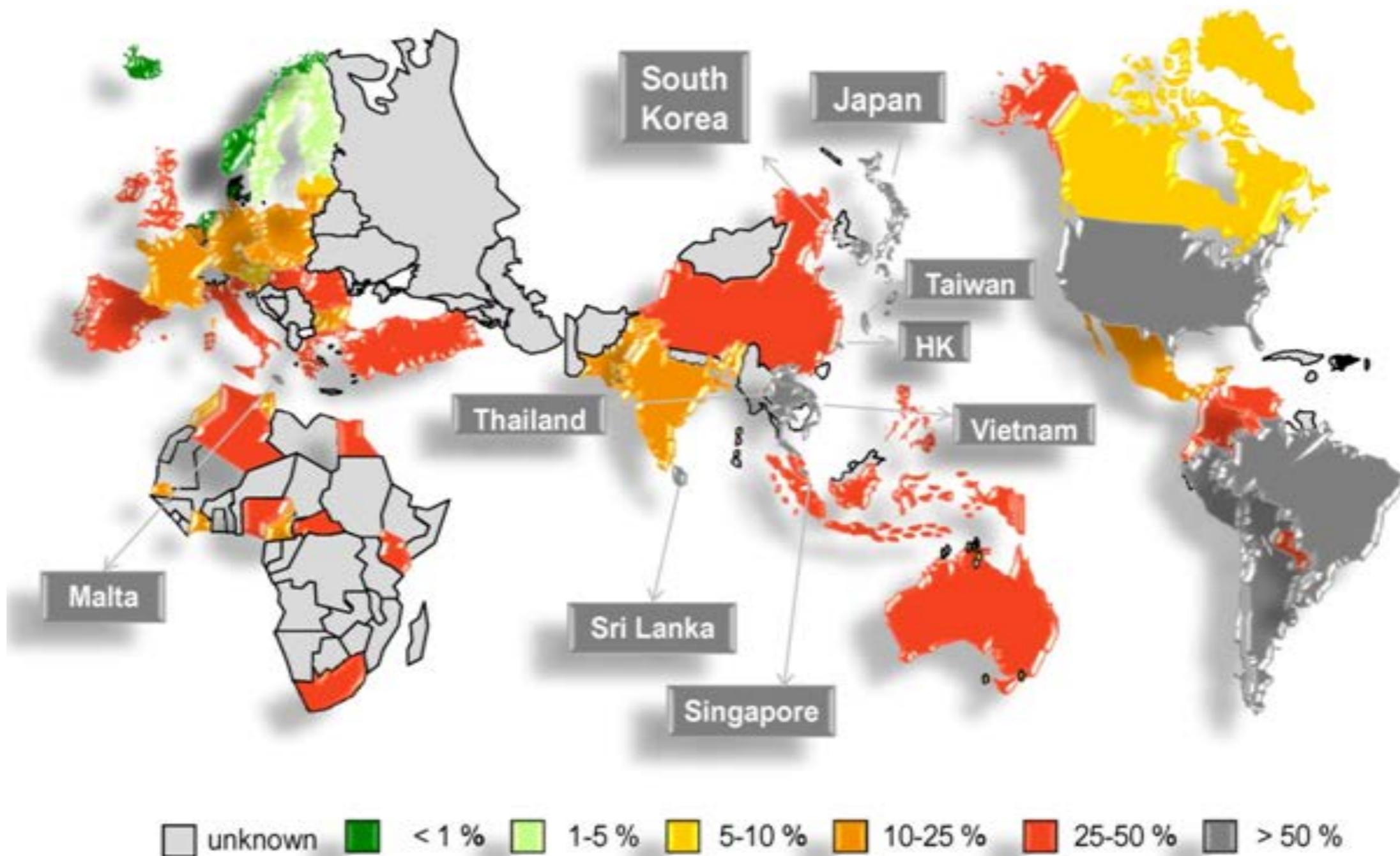
Ванкомицин-резистентный MRSA



# *Staphylococcus aureus* В ОРИТ России, n=998

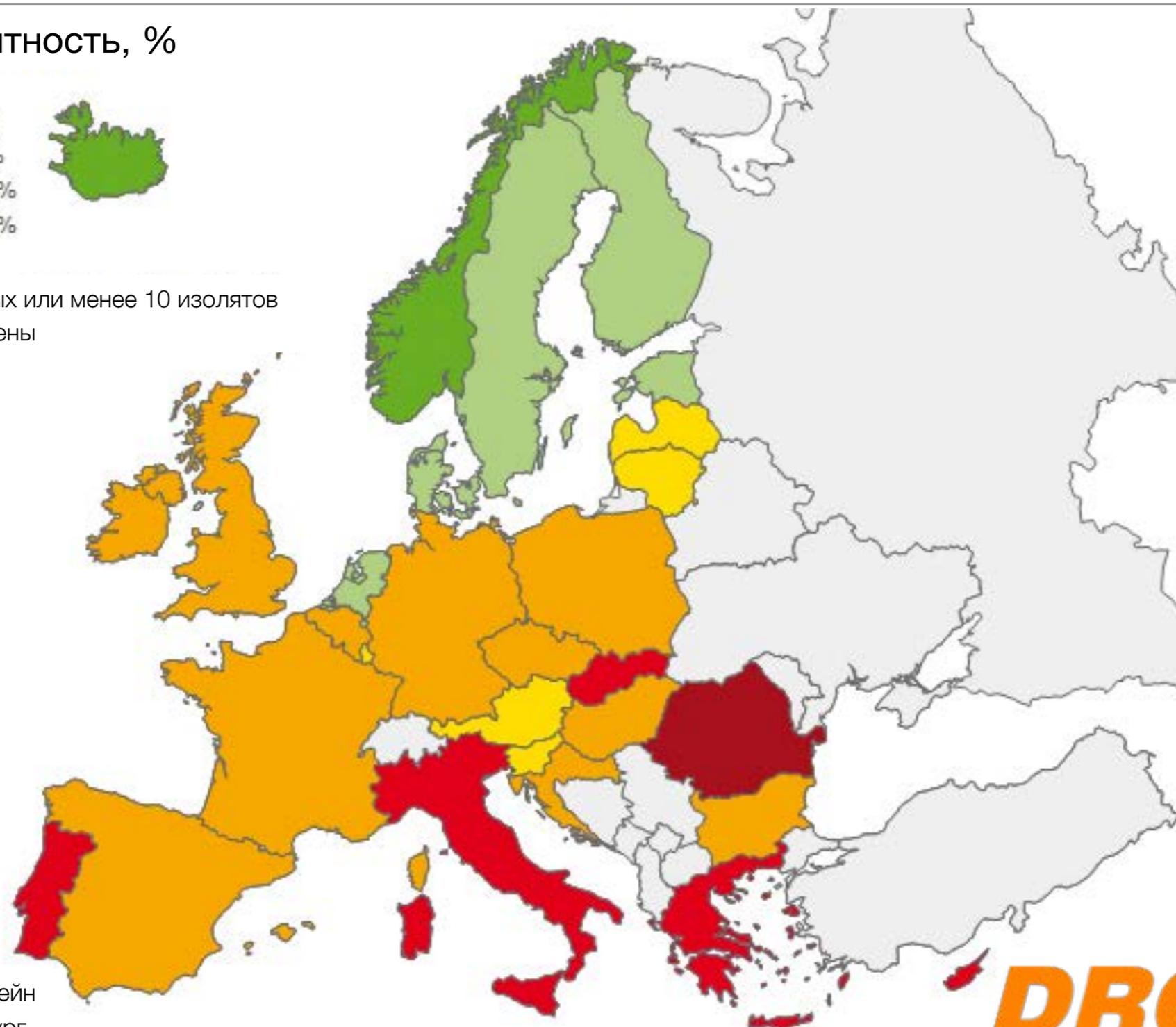
Хлорамфеникол	53,5
Эритромицин	47,2
Ципрофлоксацин	45,1
Гентамицин	45,5
Клиндамицин	40,0
Оксациллин	49,9
Тетрациклин	42,3
Левифлоксацин	34,3
Ко-тримоксазол	3,0
Фузидин	0,4
Линезолид	0
Ванкомицин	0

# MRSA в мире



# MRSA в Европе

## Резистентность, %



- Лихтенштейн
- Люксембург
- Мальта

## Распространение MRSA в России при нозокомиальных инфекциях

	Диапазон, %	В среднем, %
1995 – 1996 (по Сидоренко С.В.)	0 – 40	9,5
2000 – 2001 (по Дехнич А.В.)	0 – 89,5	33,5
2004, Москва (по Сидоренко и соавт.)	226	64,9 %

В настоящее время в ОРИТ России – 41%  
При выделении из крови – 63%

# Актуальность проблемы MRSA на Урале

---

По данным Борониной Л.Г. и соавт., 2011

ГУЗ «Областная детская клиническая больница №1», Екатеринбург

Период исследования: Март – Сентябрь 2011 г.

Цель исследования – оценить уровень распространения метициллинорезистентных штаммов *S. aureus* нозокомиального и внебольничного происхождения на Урале.

## Что и как исследовали?

---

С марта по сентябрь 2011 года клинический материал от пациентов, как отделений стационара, так и амбулаторных больных (детей и взрослых) ОДКБ №1, Екатеринбург с различными диагнозами (мезотимпанит, острый средний отит, артрит, атопический дерматит, хронический тонзиллит, муковисцидоз, рецидивирующий обструктивный бронхит, энтероколит, синдром раздраженного кишечника, неспецифический язвенный колит, гемофилия и др.) и беременных исследовался на наличие *S. aureus*.

Идентификация *S. aureus* осуществлялась с помощью классических бактериологических методов или с использованием тест-систем для полуавтоматического - ATB-Expression (BioMerieux, Франция) и автоматического – MicroScan WalkAway 96 (Siemens, Германия) - анализаторов.

Для выделения и дифференциации MRSA использовалась хромогенная среда CHROMagar MRSA (CHROMagar, Франция).

# Что и как исследовали?

Всего на метициллинорезистентность исследовано **352 штамма** *S. aureus* (144 из зева и лакун миндалин, 43 из носа и носоглотки, 27 из раневого содержимого, 16 из цервикального канала, по 7 штаммов выделено из уха и трахеи, 3 из желчи, по 2 из мокроты и отделяемого поврежденной кожи, по 1 из пунктата плечевого сустава, мочи, пупочной ранки, 98 из фекалий). **Доля MRSA составила 5,4%**. При этом **26,3% таких штаммов выделены от амбулаторных больных и 73,7% от пациентов, лежащих в стационаре. Из MRSA у 84,2% штаммов при постановке чувствительности к другим классам антибиотиков множественной резистентности не выявлено.** В этих случаях метициллинорезистентность обусловлена, вероятно, гиперпродукцией пенициллиназ или мутацией обычных пенициллиносвязывающих белков. Только у **15,8% штаммов *S. aureus* выявлена классическая метициллинорезистентность, обусловленная продукцией дополнительного ПСБ, кодируемого хромосомным геном mecA.** Этот штамм «истинного» MRSA, выделенный трехкратно из аспирата трахеи от ребенка с диагнозом «гемофилия», резистентен к амоскициллину/клавуланату, эритромицину, аминогликозидам, фторхинолонам, рифампицину и чувствителен к хлорамфениколу, клиндамицину, линезолиду, тетрациклину, триметоприму/сульфаметоксазолу, ванкомицину.

## Выводы

---

Доля «истинных» MRSA у пациентов с доказанной инфекцией - 0,9%, а метициллинорезистентность, обусловленная другими механизмами, – 4,5%. В данный момент проблема MRSA не является существенной для Урала, но требует постоянного мониторинга.

# Резистентность *Enterococcus faecium* к ванкомицину.

# Распространение ванкомицин-резистентных энтерококков

---

Северная Америка, Европа - 27,5%,

Россия – 3,8%,

Первый штамм в России – 2002 г,

К настоящему времени в России выделено более 250 штаммов.

DRG International Inc./DRG Techsystems  
Suite 2, Building 1, 34, Novocheryomushkinskaya, Moscow, Russia, 117218  
Tel./Fax: 7 (499) 277 07 20  
zakaz@drgtech.ru/office@drgtech.ru  
[www.drgtech.ru](http://www.drgtech.ru)



# Спасибо за внимание!

---

Скачать презентацию вы можете на нашем сайте: [drgtech.ru/presentations/](http://drgtech.ru/presentations/)

DRG International Inc./DRG Techsystems  
Suite 2, Building 1, 34, Novocheryomushkinskaya, Moscow, Russia, 117218  
Tel./Fax: 7 (499) 277 07 20  
zakaz@drgtech.ru/office@drgtech.ru  
[www.drgtech.ru](http://www.drgtech.ru)

Присоединяйтесь к нам в социальных сетях,  
подписывайтесь на нашу ленту новостей:



DRG International Inc./DRG Techsystems  
Suite 2, Building 1, 34, Novocheryomushkinskaya, Moscow, Russia, 117218  
Tel./Fax: 7 (499) 277 07 20  
zakaz@drgtech.ru/office@drgtech.ru  
[www.drgtech.ru](http://www.drgtech.ru)

ЗАО «ДРГ Техсистемс»

117218, г. Москва,

Новочеремушкинская, д. 34, корпус 1, офис 2

Телефоны: 7 (499) 277 07 20,

7 (499) 724 25 81,

7 (499) 724 26 36,

7 (499) 724 26 74,

7 (499) 724 27 31,

7 (499) 724 29 98,

Факс: 7 (499) 724 29 49

e-mail: [zakaz@drgtech.ru](mailto:zakaz@drgtech.ru)/[office@drgtech.ru](mailto:office@drgtech.ru)

