

Карбапенемазы энтеробактерий: проблемы детекции и лечения

Сергей Сидоренко

Детский научно-клинический центр инфекционных болезней
Кафедра медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова
Санкт-Петербург

Тенденции в лечении наиболее тяжелых госпитальных инфекций

- При лечении тяжелых госпитальных инфекций, вызванных Грам(-) бактериями практически полностью утратили свое значение
 - Цефалоспорины
 - Защищенные пенициллины и цефалоспорины
 - Фторхинолоны
 - Гентамицин
 - Место базовых препаратов при лечении тяжелых инфекций заняли карбапенемы

Классификация угроз

CDC, 2013 Microorganisms with a Threat Level of Urgent

- *Clostridium difficile*
- Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae
- Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*.

ВОЗ, 2017. Критически высокий уровень приоритетности разработки новых антибиотиков

- *Acinetobacter baumannii*, устойчивые к карбапенемам
- *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивые к карбапенемам
- Enterobacteriaceae, устойчивые к карбапенемам, и вырабатывающие БЛРС

Механизмы устойчивости к карбапенемам

Гены локализованы преимущественно на хромосомах, ограниченное внутри- и межвидовое распространение

- Нарушение экспрессии и/или структуры пориновых каналов
- Активное выведение
- Гиперэкспрессия хромосомных бета-лактамаз

Гены локализованы на подвижных генетических элементах: быстрое внутри- и межвидовое распространение

- Ферментативная инактивация – карбапенемазы

Молекулярная классификация бета-лактамаз (Ambler, R. P., 1980)

Классы А, С и D – сериновые бета-лактамазы

- В активном центре фермента аминокислота серин
- Карбапенемазная активность выявляется у классов А и D

Класс В – металло-бета-лактамазы

- В активном центре фермента – атом цинка
- Металло-ферменты широко распространены среди эукариот

Основные различия по:

- Механизму гидролитической активности
- Чувствительности к ингибиторам

Основные карбапенемазы

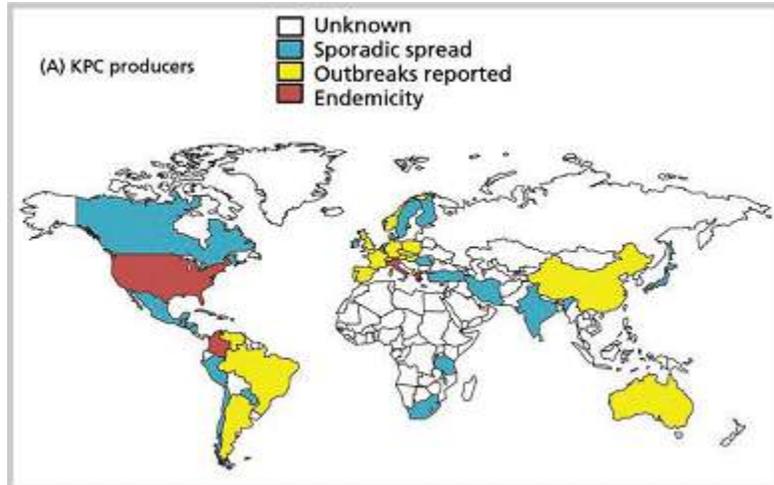
Название	Класс	Выделение/ публикация	Страна	Первичный хозяин
КРС-тип	A	1996 2001. AAC. Yigit, H., et al.	США	<i>Chromobacterium</i> sp.
ОХА-48-тип	D	2001 2004. AAC. Poirel, L., et al.	Турция	<i>Shewanella xiamenensis</i>
IMP-тип	B	1988 1994. AAC Osano, E., et al.	Япония	Не известен
VIM-тип	B	1997 1999. AACV. Lauretti, L., et al.	Италия	Не известен
NDM-тип	B	2008 2009. AAC. Yong, D., et al.	Индия/Швеция	Не известен

Спектр гидролитической активности основных бета-лактамаз и спектр активности ингибиторов

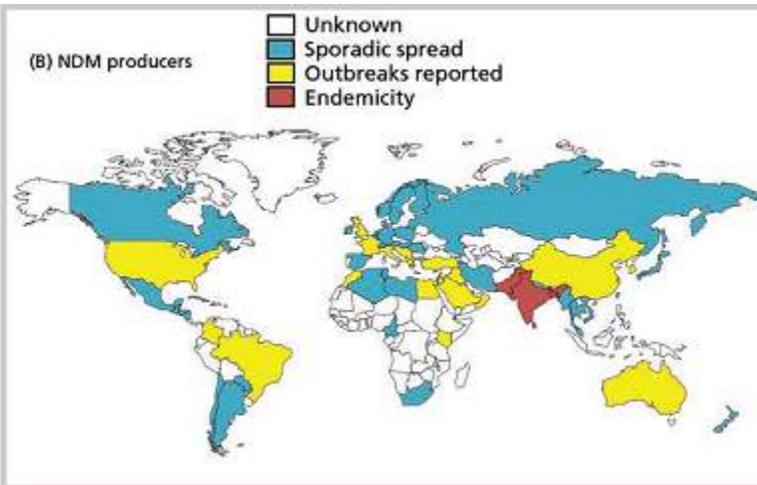
Класс	Энзимы	Чувствительность к гидролизу					Активность ингибиторов				
		Аминопепт. н.	Цеф I	Цеф II	Цеф III - IV	Азтреон ам	Карбапенемы	Клав	Сульб	Тазо	Авибак
C	AmpC	++	++	++	++/-	++	-	-	-	-	+
A	TEM, SHV, широкого спектра	++	+/-	-	-	-	-	+	+	+	+
	TEM, SHV, CTX, расширенного спектра	++	++	++	++	++	-	+/-	+/-	+/-	+
	KPC	++	++	-	++	+	++	+/-	+/-	+/-	+
D	OXA-48-типы	++	++	+/-	+/-	-	+	-	-	-	+/-
	OXA-типы Acinetobacter spp.	++	++	+/-	+/-	-	++	-	-	-	+/-
B	IMP	++	++	++	++	-	++	-	-	-	-
	VIM	++	++	++	++	-	++	-	-	-	-
	NDM	++	++	++	++	-	++	-	-	-	-

Глобальное распространение карбапенемаз

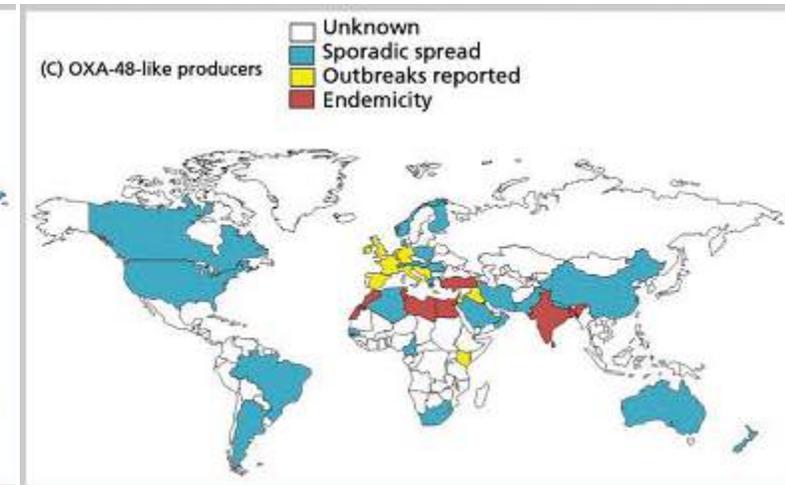
KPC



NDM



OXA-48



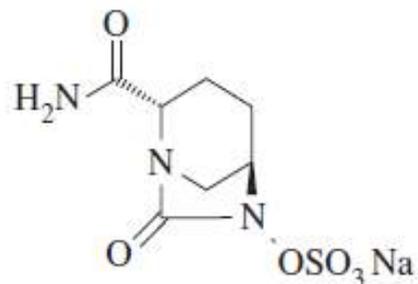
Карбапенемазы среди *K. pneumoniae* в Санкт-Петербурге в 2016-17гг

Год	Карбапенемазы	
	Тип	%
2016	NDM	5.9
	OXA-48	1.4
	NDM+OXA-48	1.9
	Всего	9.2
2017	NDM	13.5
	OXA-48	4.7
	NDM+OXA-48	1.3
	Всего	19.5

Предложения по изменению критериев чувствительности к карбапенемам

Микроорг.	Дорипенем		Эртапенем		Имипенем		Меропенем	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
PK/PD	1/1	2/2	0.5/0.5	1/0.5	2/2	8/4	2/2	8/8
Enterobacterialis	1/1	4/2	0.5/0.5	1/0.5	2/2	8/4	2/2	8/8
Proteus, Providencia, Morganella	-	-	-	-	-/4	-/4	-	-
Acinetobacter	1/1	2/2	-	-	2/2	8/4	2/2	8/8
Pseudomonas	1/1	2/2	-	-	2/4	8/4	2/2	8/8
Анаэробы	1/1	1/2	1/0.5	1/0.5	4/2	8/4	2/2	8/8
H. infl. Менингит	-	-	-	-	-	-	0.25/0.25	1/0.25
S. pn. Менингит	-	-	-	-	-	-	0.25/0.25	1/0.25

Новые возможности лечения Не-бета-лактамыные обратимые ингибиторы – дiazобициклооктаны



Авибактам – NXL104

Спектр ингибирующей активности авибактама

- Бета-лактамазы класса С
- Бета-лактамазы класса А
- Бета-лактамазы класса D (вариабельная активность)
- **Не активен в отношении бета-лактамаз класса В (NDM-тип)**

Цефтазидим/авибактам

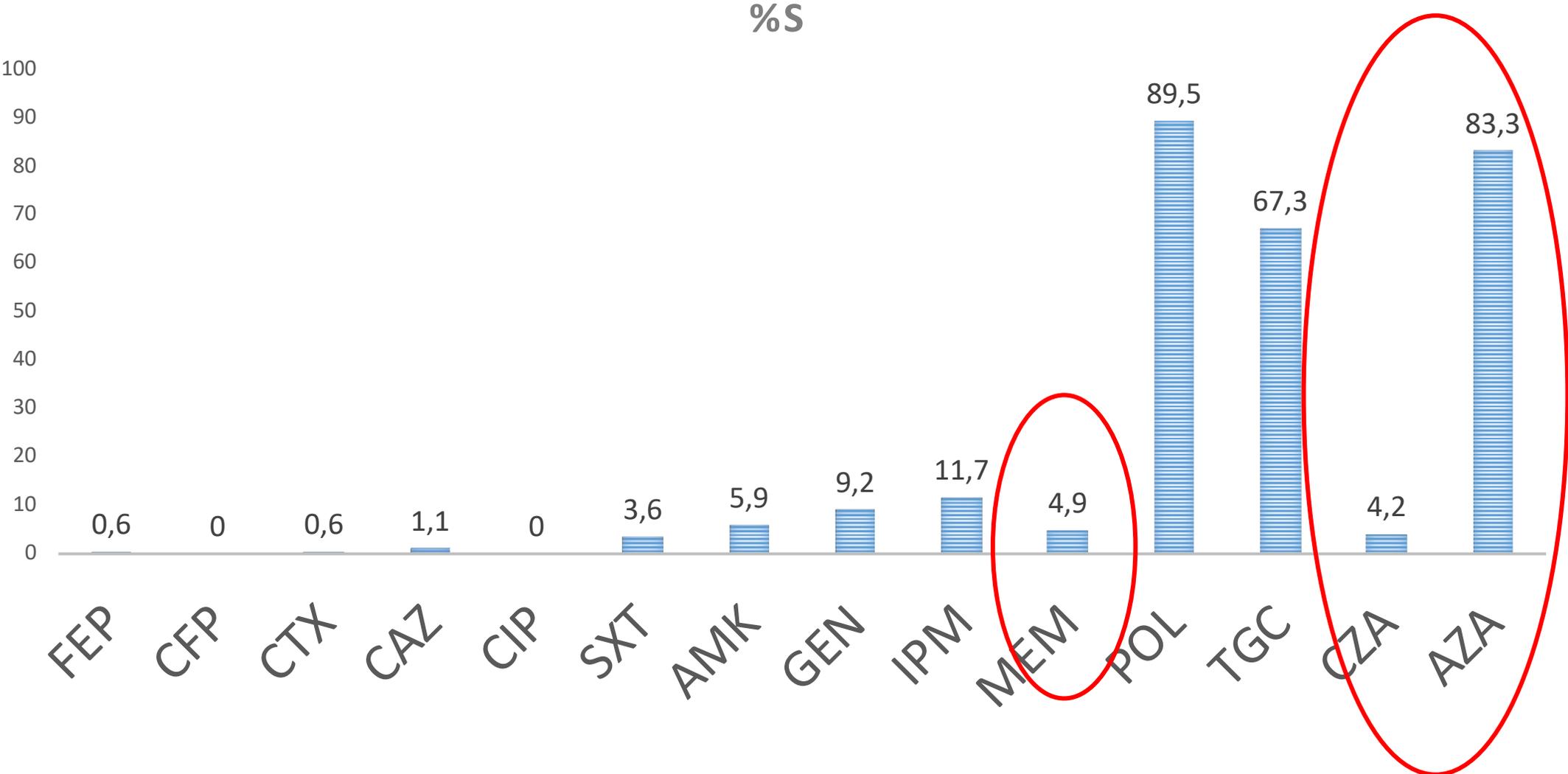
- Разрешен FDA в 2015 на основании двух контролируемых рандомизированных испытаний,
 - **Все возбудители были чувствительны к карбапенемам,**
 - **Подтверждена гипотеза равной эффективности с карбапенемами**
- Разрешен в РФ в мае 2017
 - Осложненные интраабдоминальные инфекции
 - Осложненные инфекции мочевыводящих путей, включая пиелонефрит
 - Госпитальная пневмония, включая пневмонию ассоциированную с искусственной вентиляцией легких
 - Инфекции, вызванные аэробными грамотрицательными микроорганизмами у пациентов с ограниченным выбором антибактериальной терапии

Цефтазидим/авибактам + азтреонам

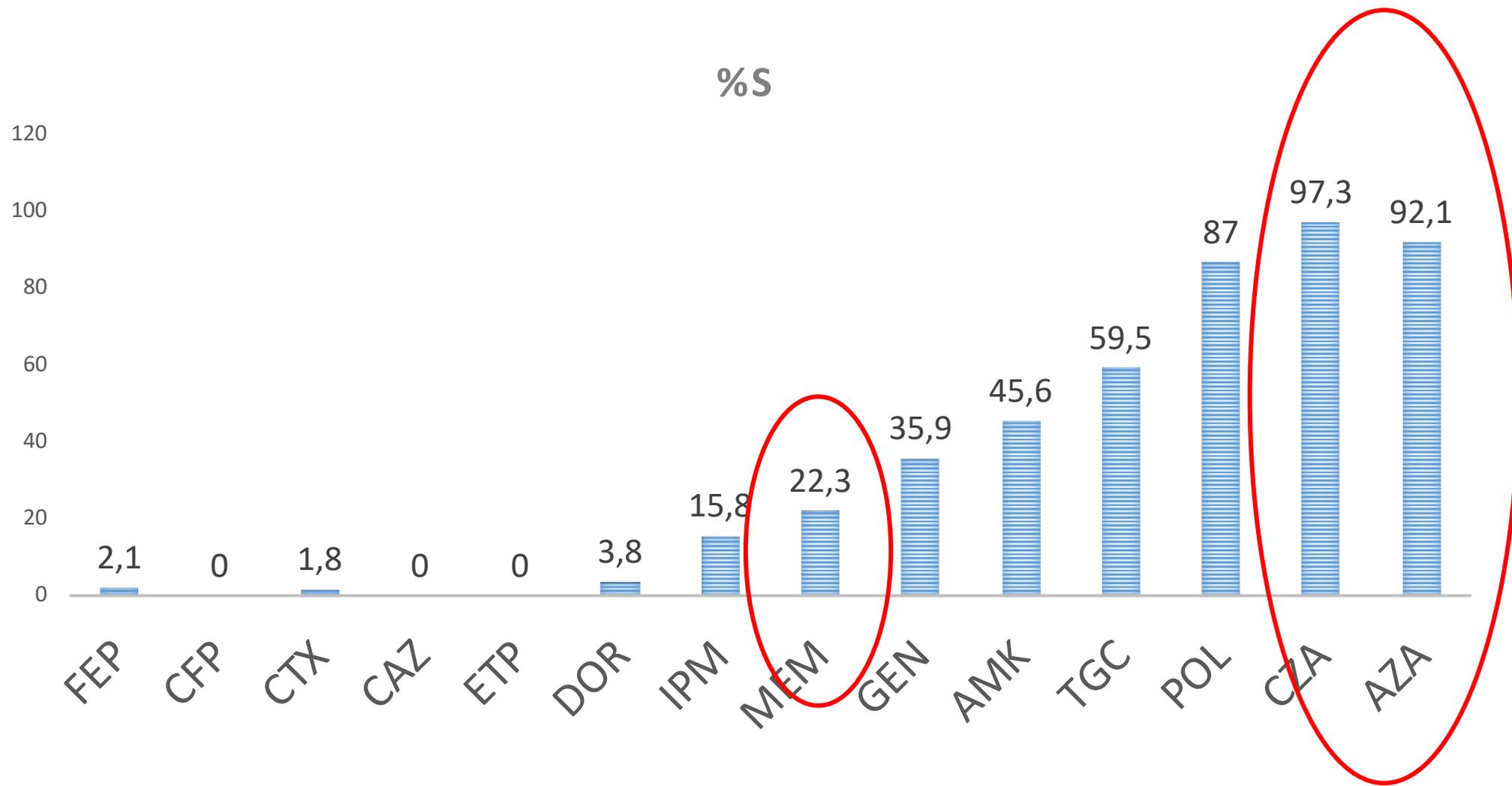
Обоснование

- Металло-бета-лактамазы (МБЛ) не разрушают азтреонам
- Продуценты МБЛ обычно несут гены 2 – 6 других бета-лактамаз, в том числе БЛРС, разрушающих азтреонам
- Для того, чтобы азтреонам проявил активность в отношении продуцента МБЛ, его надо защитить от БЛРС
 - Цефтазидим/авибактам

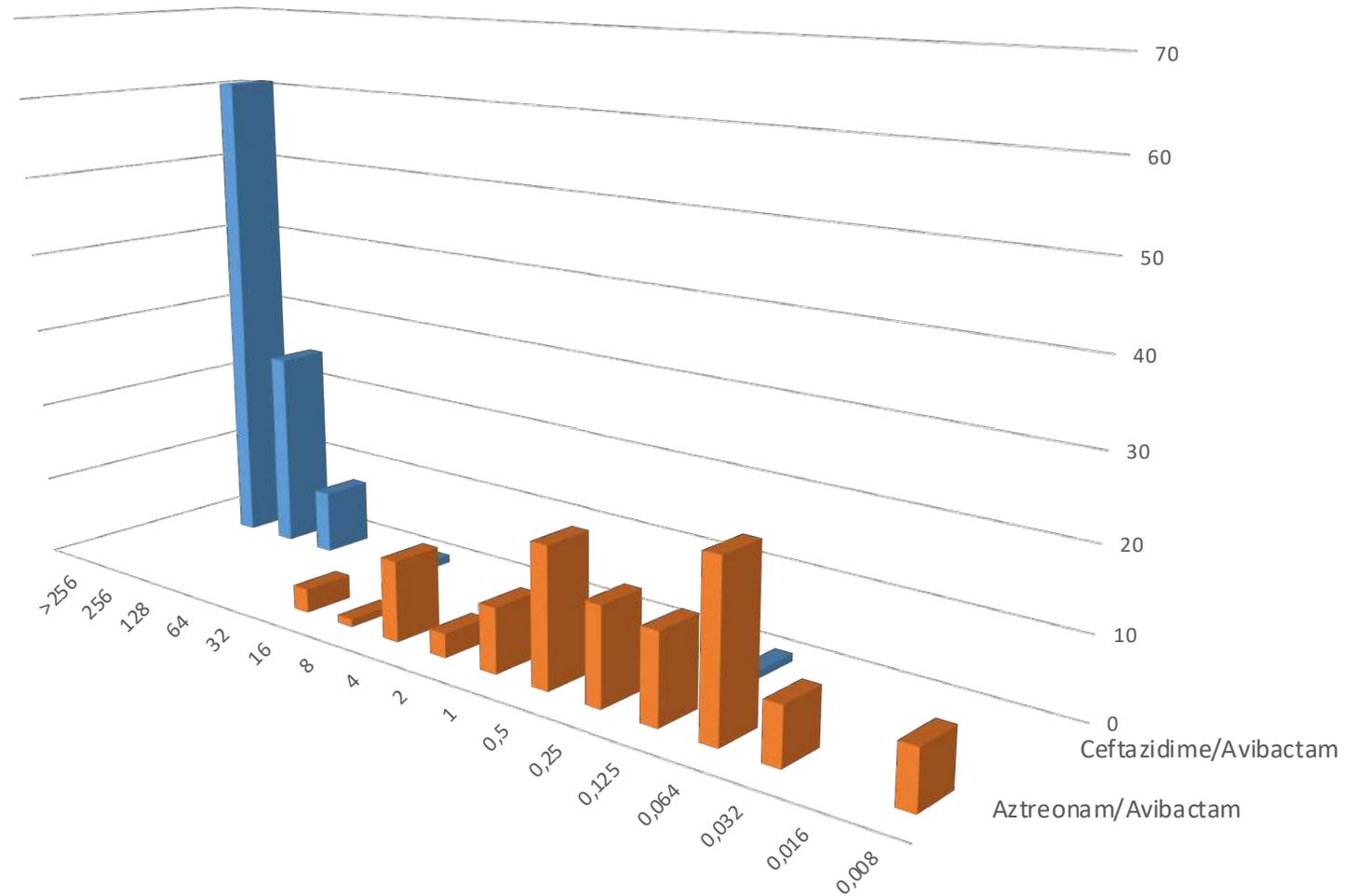
Антибиотикочувствительность (% чувствительных изолятов) продуцентов NDM (n = 185)



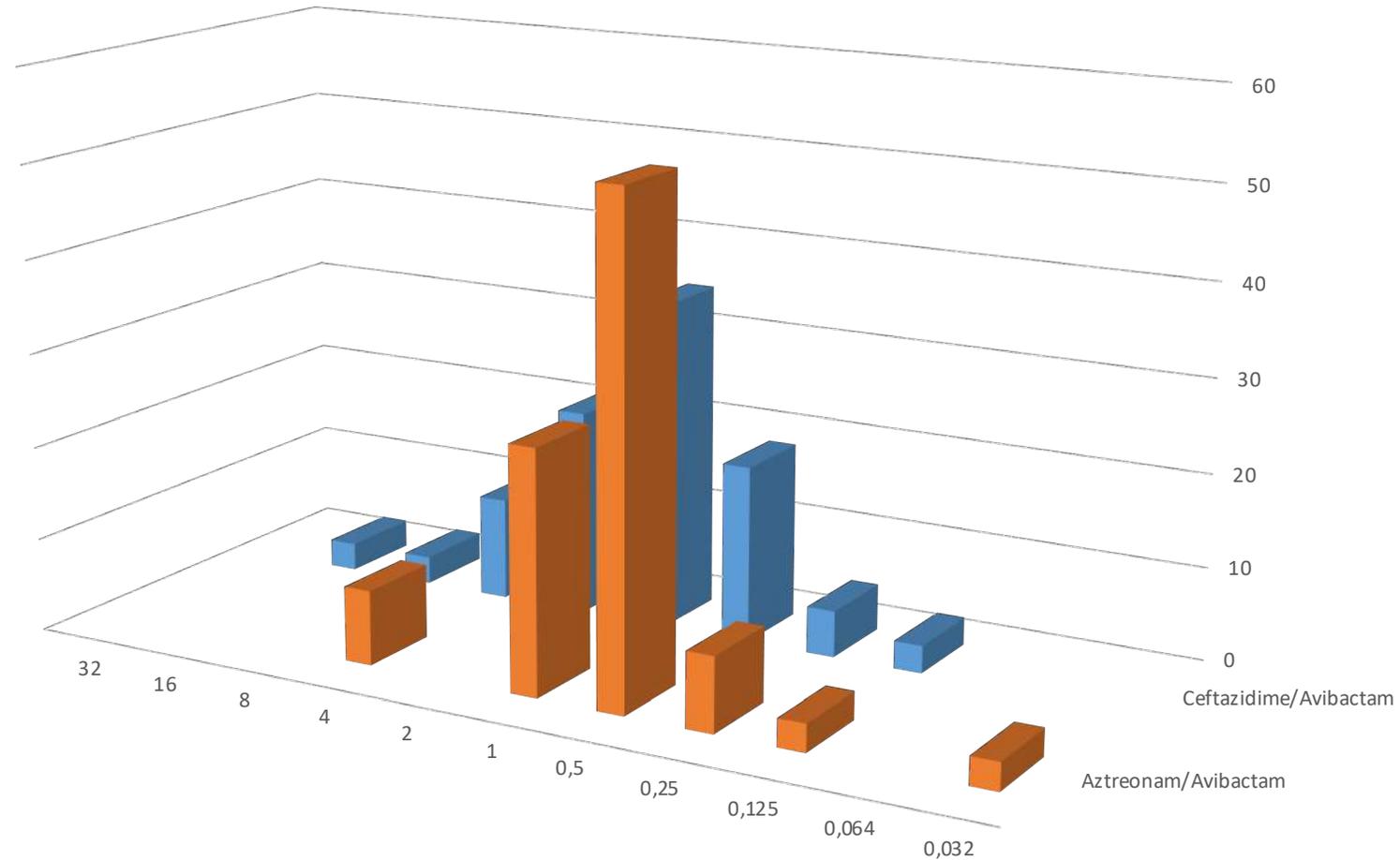
Антибиотикочувствительность (% чувствительных изолятов) продуцентов ОХА-48 (n = 120)



Распределение МПК CAZ/AVI и AZT/AVI в отношении продуцентов NDM



Распределение МПК CAZ/AVI и AZT/AVI в отношении продуцентов OXA-48



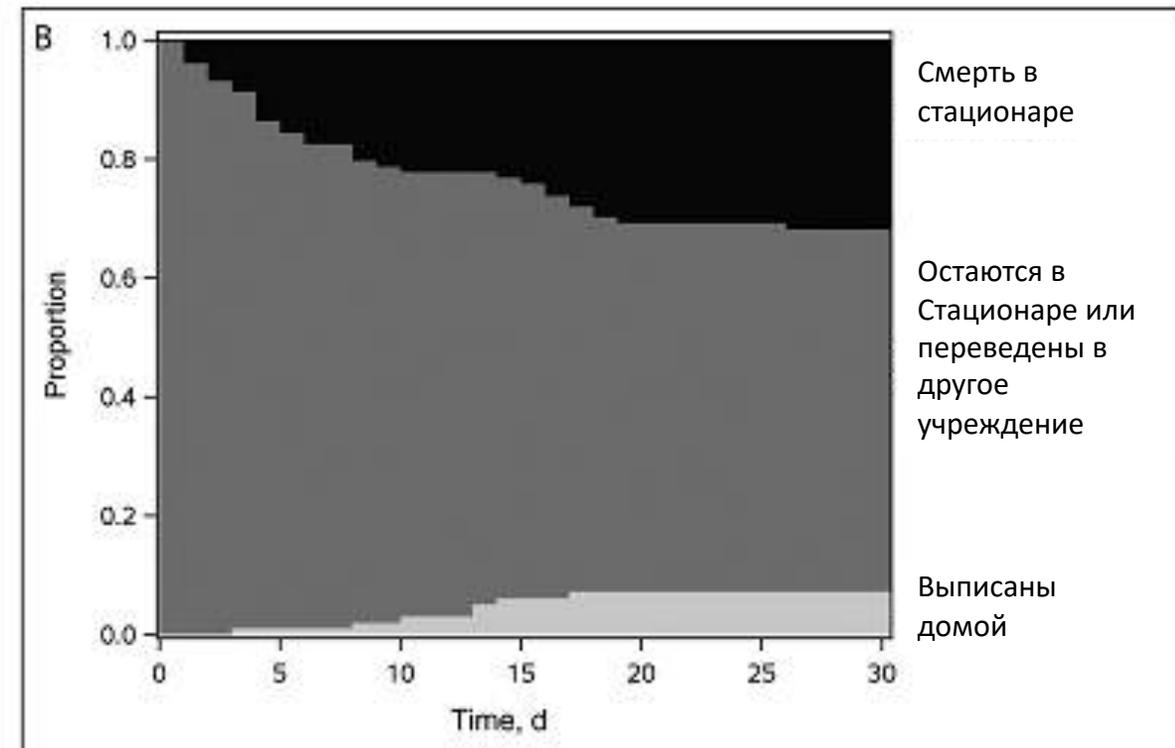
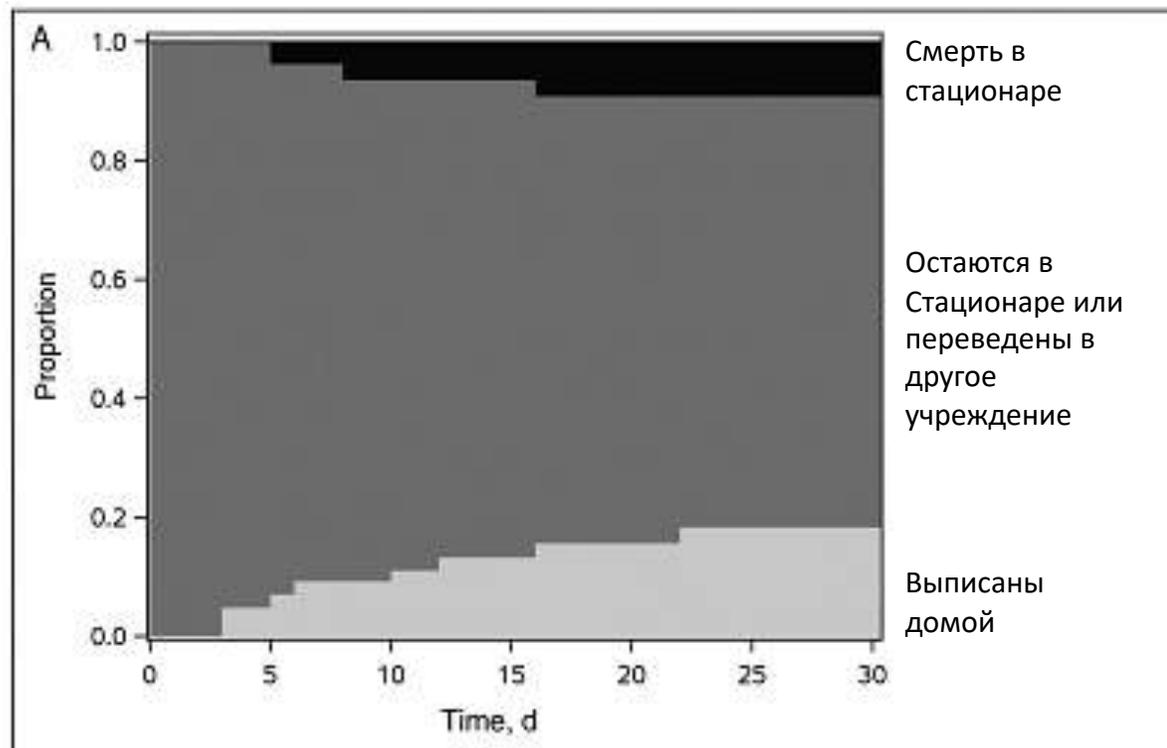
Монотерапия карбапенемами

MIC of carbapenem ($\mu\text{g/ml}$)	No. of patients	No. of successes	No. of failures	% Failure
≤ 1	17	12	5	29.4
2	12	9	3	25.0
4	7	5	2	28.6
8	6	4	2	33.3
Subtotal	42	30	12	28.6 ^b
> 8	8	2	6	75.0 ^b
Total	50	32	18	36

Распространенность режимов терапии Enterobacteriaceae устойчивых к карбапенемам

		МВП	Респ	ИА	КМТ	ЦНС	ИКр
Моно (50%)	Pol	35.1	31.6	17.5	21.2	12.3	29.8
	Tig	8.8	15.8	35.1	35.1	5.3	14
	Amg	70.2	10.5	14	12.3	5.3	24.6
	Fos	33.3	1.8	1.8	0	5.3	5.3
	Caz/Avi	35.1	28.1	29.8	28.1	8.8	29.8
Два (92.1%)	Pol+Tig	10	41	58.1	38.1	8.6	32.4
	Pol+Carb	50.5	60	49.5	33.3	49.5	63.9
	Tig+Carb	5.7	22.9	38.1	24.8	8.6	20
	Tig+Amg	8.6	11.4	30.5	24.8	2.9	17.1
	Amg+Fos	32.4	7.6	7.6	7.6	6.7	17.1
Три (63.2%)	Pol+Tig+Carb	16.7	54.2	50	30.6	29.2	55.6
	Pol+Tig+Amg	12.5	23.6	23.6	8.3	8.3	29.2
	Pol+Tig+Fos	5.6	19.4	11.1	8.3	11.1	18.1
	Pol+Amg+Fos	23.6	9.7	5.6	2.8	5.6	20.8
	Carb+Carb+Pol	11.1	15.3	9.7	6.9	16.7	18.1

Проспективное обсервационное исследование колистин VS цефтазидим/авибактам в отношении карбапенем-устойчивых инфекций



These findings require confirmation in a randomized controlled trial

Цефтазидим/авибактам в лечении инфекций, вызванных продуцентами OXA-48

Показатель	Монотерапия (n=44)	Комб. терапия (N=11)	P
14-дневная летальность, n (%)	7 (15)	1 (9)	0.42
30-дневная летальность, n (%)	10 (22)	3 (27)	0.69
90-дневный рецидив, n (%)	4 (9)	2 (18)	0.35
Клиническое выздоровление, n (%)	37 (80)	7 (64)	0.44
Микробиологическое выздоровление, n (%)	31(67)	6 (54)	0.58

Терапия перед назначением CAZ/AVI

- Карбапенемы, n (%)
- Хинолоны, n (%)
- Цефалоспорины, n (%)
- Колистин, n (%)

51 (89)

35 (61)

22 (38)

27 (47)

29 (51)

Компоненты комб. терапии

- Колистин вв 5
- Колистин инг. 2
- Тигециклин 2
- Амикацин 1
- Имипенем 1

Географические особенности распространения карбапенемаз в России

Регионы с преобладанием карбапенемаз типа OXA-48

- Москва, Центр и Юг Европейской части
 - Вероятна высокая эффективность цефтазидима/авибактама

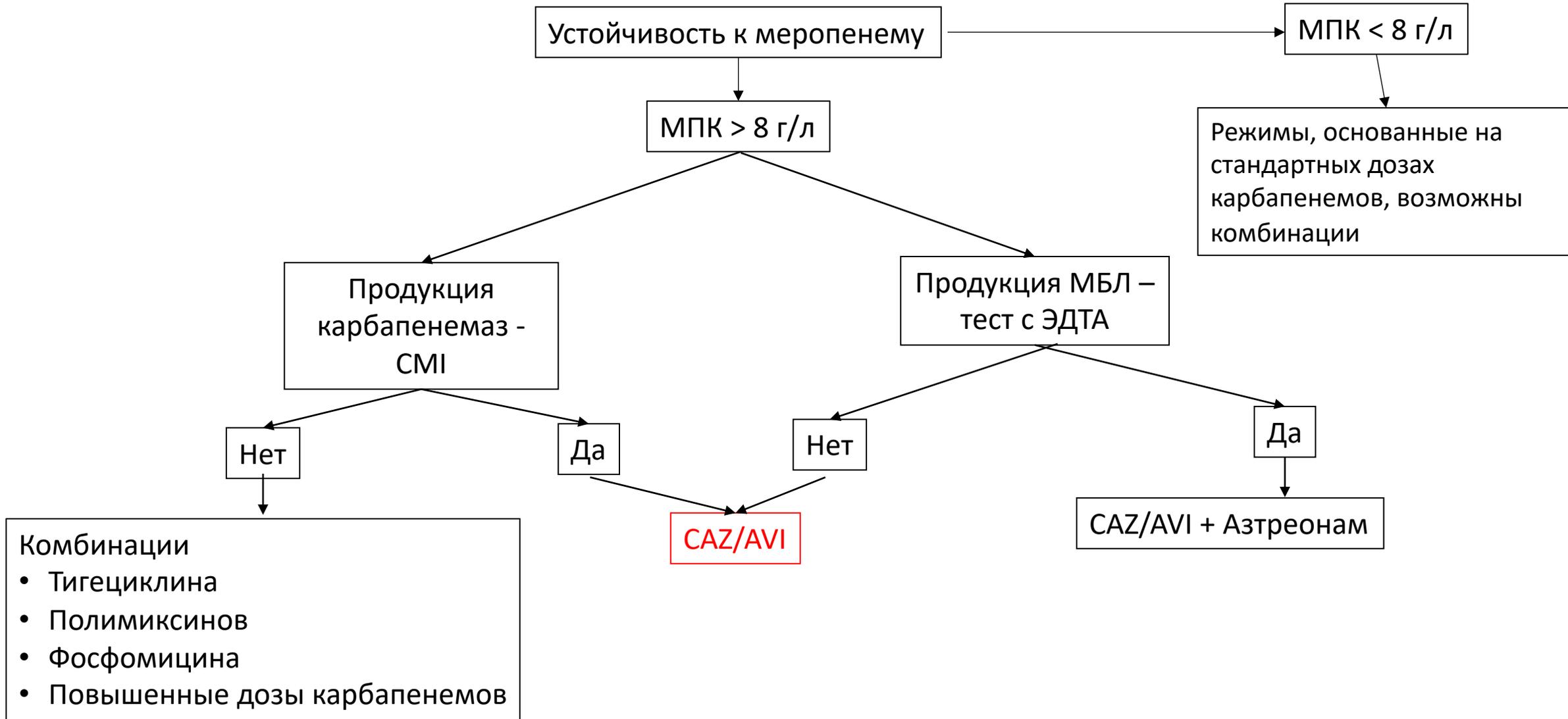
Регионы с преобладанием карбапенемаз типа NDM

- Санкт-Петербург, Северо-Запад Европейской части
 - Вероятны неудачи лечения при использовании цефтазидима/авибактама
 - Необходимо добавление азтреонама

Данных о распространении карбапенемаз недостаточно

- Сибирь, Дальний Восток

Алгоритм диагностики и лечения инфекций, вызванных Enterobacteriaceae устойчивыми к карбапенемам



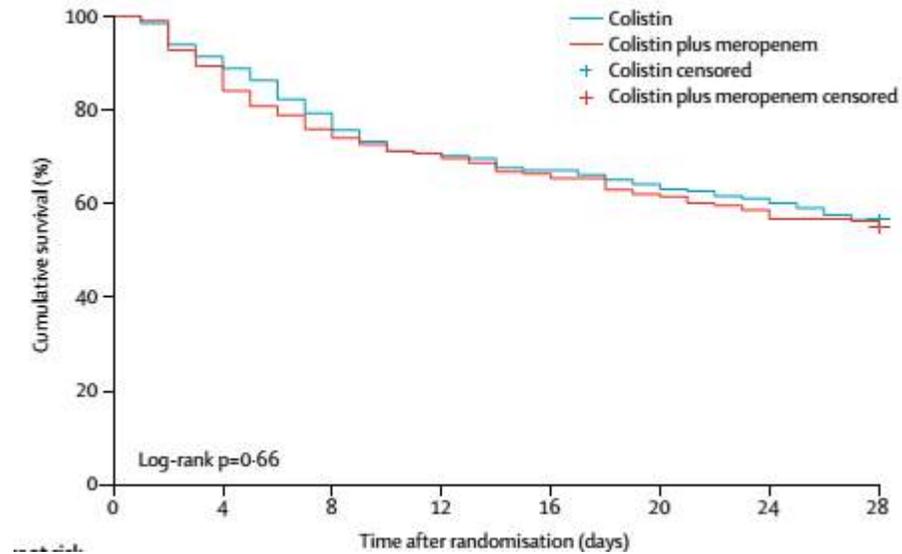
Распространенность режимов терапии *P. aeruginosa* устойчивых к карбапенемам

		МВП	Респ	ИА	КМТ	ЦНС	ИКр
Моно (60%)	Pol	34.8	22.7	18.2	21.2	10.6	19.7
	Amg	48.5	6.1	9.1	7.6	1.5	1.5
	Fos	16.7	0	0	1.5	1.5	1.5
	Ceftolaz+tazo	62.1	40.9	42.4	34.8	15.2	30.3
Два (86.4%)	Pol+Carb	43.2	61.1	53.7	42.1	45.2	54.7
	Pol+Rif	6.3	15.8	9.5	10.5	12.6	13.7
	Pol+Amg	34.7	28.4	33.7	24.2	9.5	36.8
	Pol+Fos	31.6	27.4	18.9	20	15.8	23.2
	Amg+Fos	31.6	12.6	11.6	12.6	7.4	16.8
Три (43.6%)	Pol+Carb+Rif	14.6	35.4	29.2	27.1	33.3	31.3
	Pol+Carb+Amg	31.3	33.3	33.3	27.1	18.8	41.7
	Pol+Carb+Fos	35.4	25	20.8	18.8	29.2	25
	Pol+Amg+Rif	10.4	8.3	14.6	10.4	16.7	22.9
	Pol+Amg+Fos	25	18.8	12.5	10.4	14.6	20.8

Распространенность режимов терапии *A. baumannii* устойчивых к карбапенемам

		МВП	Респ	ИА	КМТ	ЦНС	ИКр
Моно (47.9%)	Pol	65.2	45.7	34.8	39.1	28.3	41.3
	Amg	63	10.9	10.9	10.9	2.2	6.5
	Tig	8.7	10.9	30.4	34.8	2.2	6.5
Два (83.3%)	Pol+Carb	43.8	52.5	50	41.3	43.8	60
	Pol+Rif	43.8	30	18.8	18.8	21.3	23.8
	Pol+Tig	22.5	46.3	48.8	41.3	10	32.5
	Pol+Fos	25	20	11.3	13.8	12.5	17.5
	Tig+Carb	4.5	17.5	23.8	17.5	8.8	16.3
Три (44.8%)	Pol+Tig+Carb	30.2	55.8	55.8	41.9	34.9	51.2
	Pol+Tig+Rif	16.3	41.9	30.2	34.9	25.6	32.6
	Pol+Tig+Amg	11.6	18.6	23.2	16.3	11.6	34.9
	Pol+Tig+Fos	14	16.3	20.9	14	16.3	16.3
	Tig+Rif+Amg	11.6	11.6	16.3	16.3	4.7	20.9

Комбинированная или монотерапия? Колистин VS колистин + меропенем



Pathogen		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	151 (76%)	161 (77%)
Enterobacteriaceae	34 (17%)	39 (19%)
Pseudomonas/other	13 (7%)	8 (4%)
Meropenem MIC distribution	n=142	n=148
>8 mg/L	137 (97%)	144 (97%)
8 mg/L	1 (2%)	2 (1%)
>2 to <8 mg/L	4 (3%)	2 (1%)

Резистентность и доказательная база эффективности

Формирование и распространение новых механизмов резистентности происходит намного быстрее чем

- Разработка новых антибиотиков
- Накопление данных об эффективности антибиотиков в контролируемых испытаниях

Необходимо внедрение новых методов оценки эффективности антибиотиков

- Моделирование фармакокинетики/фармакодинамики
 - Динамические системы In vitro
 - Эксперименты In vivo

Значение детекции карбапенемаз для терапии

Рекомендации EUCAST

- Некоторые изоляты, продуцирующие карбапенемазы, попадают по существующим критериям в категорию чувствительных, **о результатах тестирования необходимо сообщать без внесения изменений**. Наличие или отсутствие карбапенемаз само по себе не влияет на оценку чувствительности.
- Детекцию и характеристику карбапенемаз рекомендуется проводить в интересах общественного здравоохранения и инфекционного контроля. Для скрининга на продукцию карбапенемаз рекомендуется использовать точку отсечения меропенема МПК >0.125 мг/л (зона ингибиции <28 мм).

Российские клинические рекомендации

- Пограничные значения для карбапенемов в большинстве случаев позволяют выявить клинически значимые механизмы резистентности (включая продукцию различных карбапенемаз).
- Однако при использовании этих пограничных значений некоторые изоляты, продуцирующие карбапенемазы, могут быть отнесены к категориям Ч и УР. В связи с этим, а также учитывая особое значение карбапенемаз и тенденцию роста их распространенности (в основном среди нозокомиальных штаммов), выявление продукции карбапенемаз является рекомендуемым для всех изолятов с МПК меропенема $>0,125$ мг/л (зоной подавления роста <28 мм) или МПК эртапенема $>0,125$ мг/л (зоной подавления роста <25 мм).
- **В случае выявления продукции карбапенемаз отчет о результате определения чувствительности должен включать комментарий о возможной нечувствительности изолята ко всем карбапенемам**, поскольку, во-первых, рутинное определение МПК (или зон подавления роста) карбапенемов для карбапенемазопродуцирующих изолятов может быть недостаточно точным и воспроизводимым, особенно в области пограничных значений, и, во-вторых, имеющиеся в настоящее время данные не позволяют однозначно судить о том, что использование карбапенемов (по крайней мере, в виде монотерапии) является эффективным в случае инфекций, вызванных формально чувствительными штаммами-продуцентами карбапенемаз.

EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance

- Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
- Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae
- Acquired AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae
- Polymyxin resistance in Gram-negative bacilli
- Carbapenem resistance in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter*
- Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
- Glycopeptide non-susceptible *Staphylococcus aureus*
- Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*
- Penicillin non-wild-type *Streptococcus pneumoniae*

Детекция продуцентов карбапенемаз

Importance of detection of resistance mechanism	
Required for antimicrobial susceptibility categorization	No
Infection control	Yes
Public health	Yes

Скрининг

- **Фенотипическая детекция**
 - Комбинированные диски (карбапенем + ингибитор)
 - Биохимические (колориметрические) тесты
 - Метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method – CMI)
 - MALDI-TOF детекция гидролиза
 - Иммунохроматографические тесты

Скрининг

Антибиотик	Диски, мм		МПК, мкг/мл	
	Клинический критерий I/S	Скрининг	Клинический критерий I/S	Скрининг
Меропенем	≥ 22	<28	≤ 2	>0.125
Эртапенем	≥ 25	<25	≤ 0.5	>0.125

Специфичность ингибиторов

Бета- лактамаза	Синергизм при увеличении зоны вокруг диска меропенема (10мг/диск)				Темоциллин MIC >128 mg/L или диаметр <11 mm
	ЭДТА/ДПК	ФБК	ДПК+ФБК	Клокс	
МБЛ	+	-	-	-	Вариабл.
КРС	-	+	-	-	Вариабл.
МБЛ+КРС	Вариабл.	Вариабл.	+	-	Вариабл.
ОХА-48	-	-	-	-	Да
АmpС+ порин	-	+	-	+	Вариабл.
БЛРС+порин	-	-	-	-	Нет

ДПК – дипиколиновая к-та, ФБК – фенилбороновая к-та, Клокс- клоксациллин

Тест с темоциллином рекомендуется только в случае отсутствия других признаков синергизма, для дифференцировки ОХА-48 и комбинации БЛРС с утратой поринов

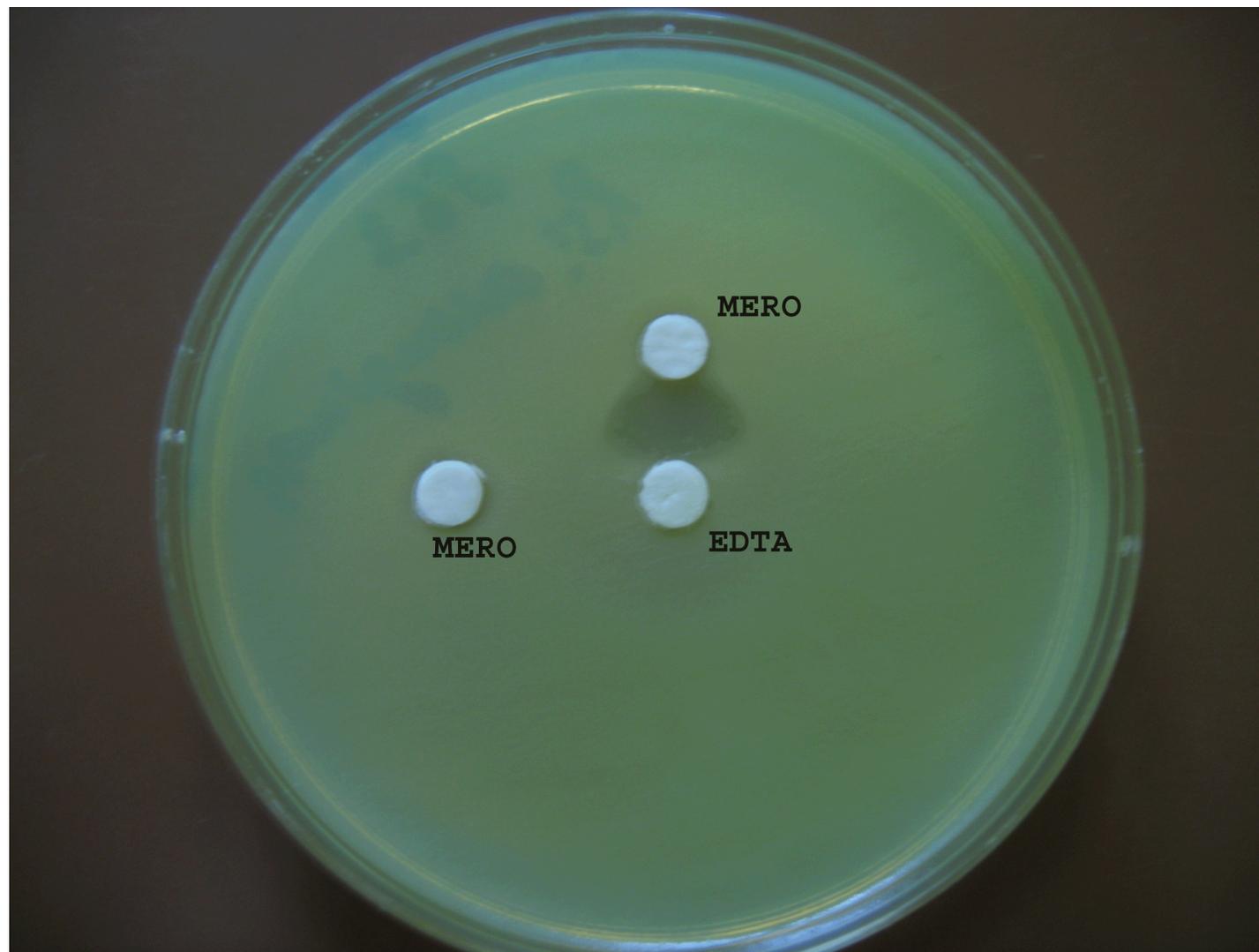
Тест с ЭДТА



	ДДМ, мм	
	MEM	MEM+ЭДТ А
ND	11	31
M		

Приготовление раствора ЭДТА (0.25 M). Приготовить навеску 9,31 г вещества, суспендировать в 80 мл дистиллированной воды и добавляя по каплям концентрированный раствор NaOH довести до pH 8,0. После полного растворения ЭДТА объем жидкости довести до 100 мл дистиллированной водой. Полученный раствор ЭДТА можно хранить в холодильнике при температуре 2-8°C не менее месяца.

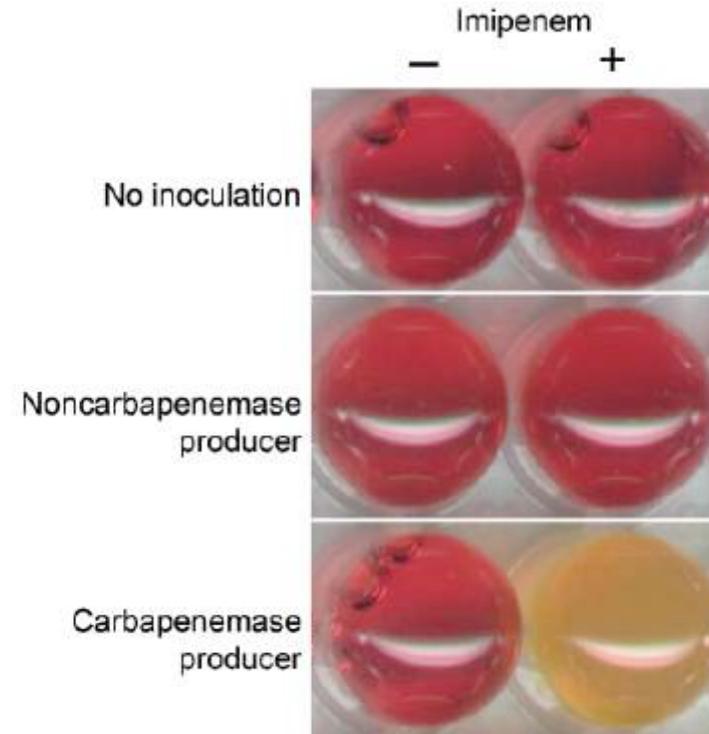
Тест с ЭДТА



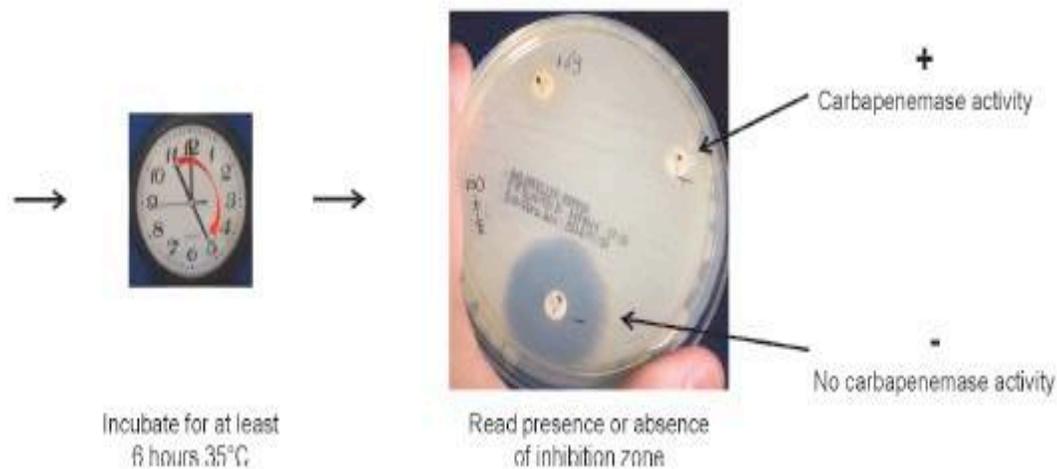
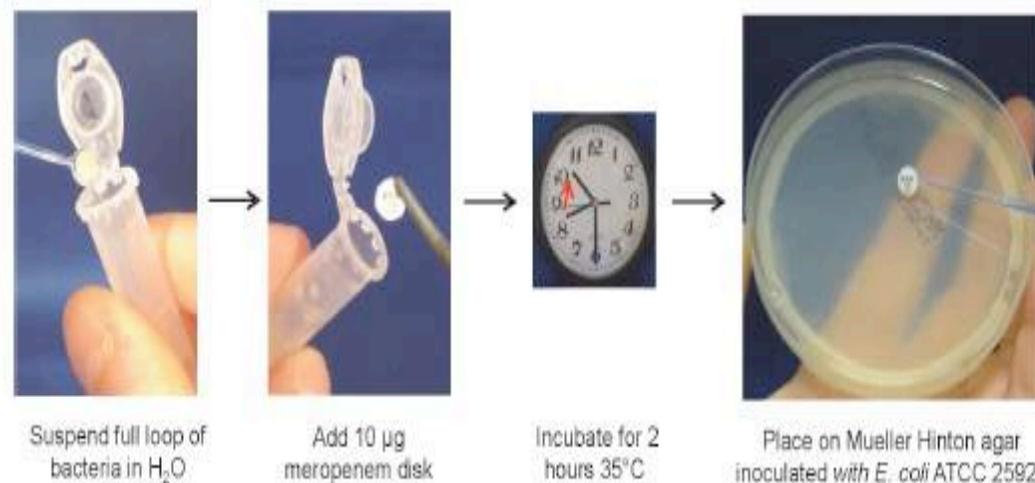
CarbaNP тест

Предложен Nordmann P и Poirel L (NP) в 2012

- Основан на изменении pH при гидролизе карбапенемного антибиотика
- Детекция с феноловым красным
- Доступен коммерческий вариант
- Есть вариант с бромтимоловым синим (CarbaNP Blue)



Метод инактивации карбапенемов - The Carbapenem Inactivation Method (CIM)



Модификации CIM теста

CLSI

- mCIM – инкубация в триптиказо-соевом бульоне. Для Enterobacteriaceae и P. aeruginosa
- eCIM – инкубация с ЭДТА, только для Enterobacteriaceae в комбинации с mCIM, позволяет выявлять МБЛ

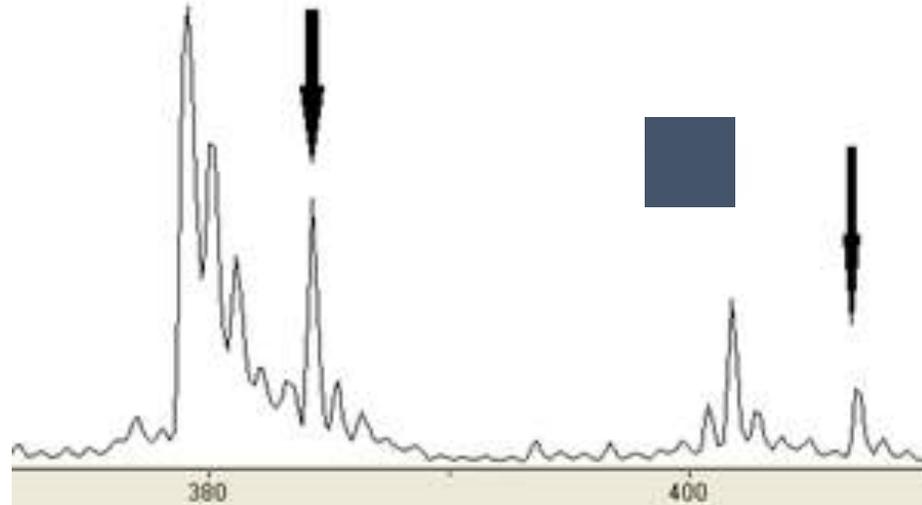
Uechi K. et al. JCM. 2017

- CIMTris – инкубация в Tris-буфере улучшает экстракцию карбапенемаз

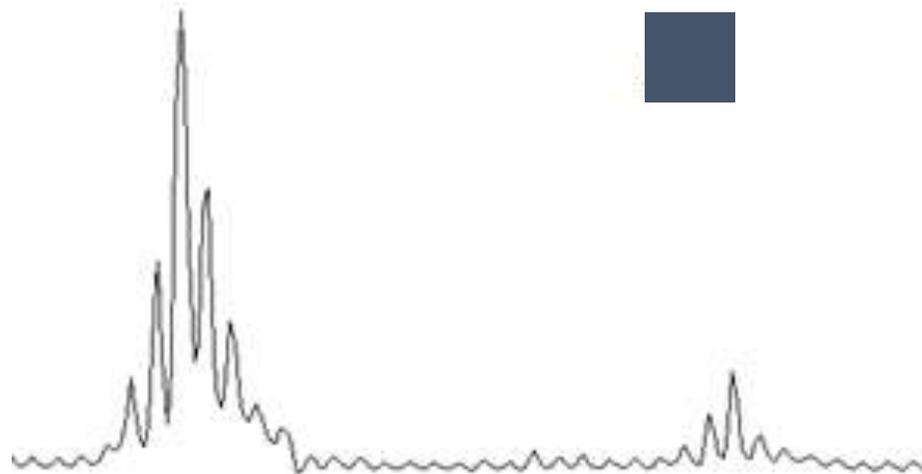
Caméléna F. et al. JCM, 2018

- CIMplus – инкубация с ЭДТА и ФБК, позволяет дифференцировать карбапенемазы, предложен для Enterobacteriaceae

Детекция гидролиза меропенема



**Пики меропенема до
инкубации с культурой**

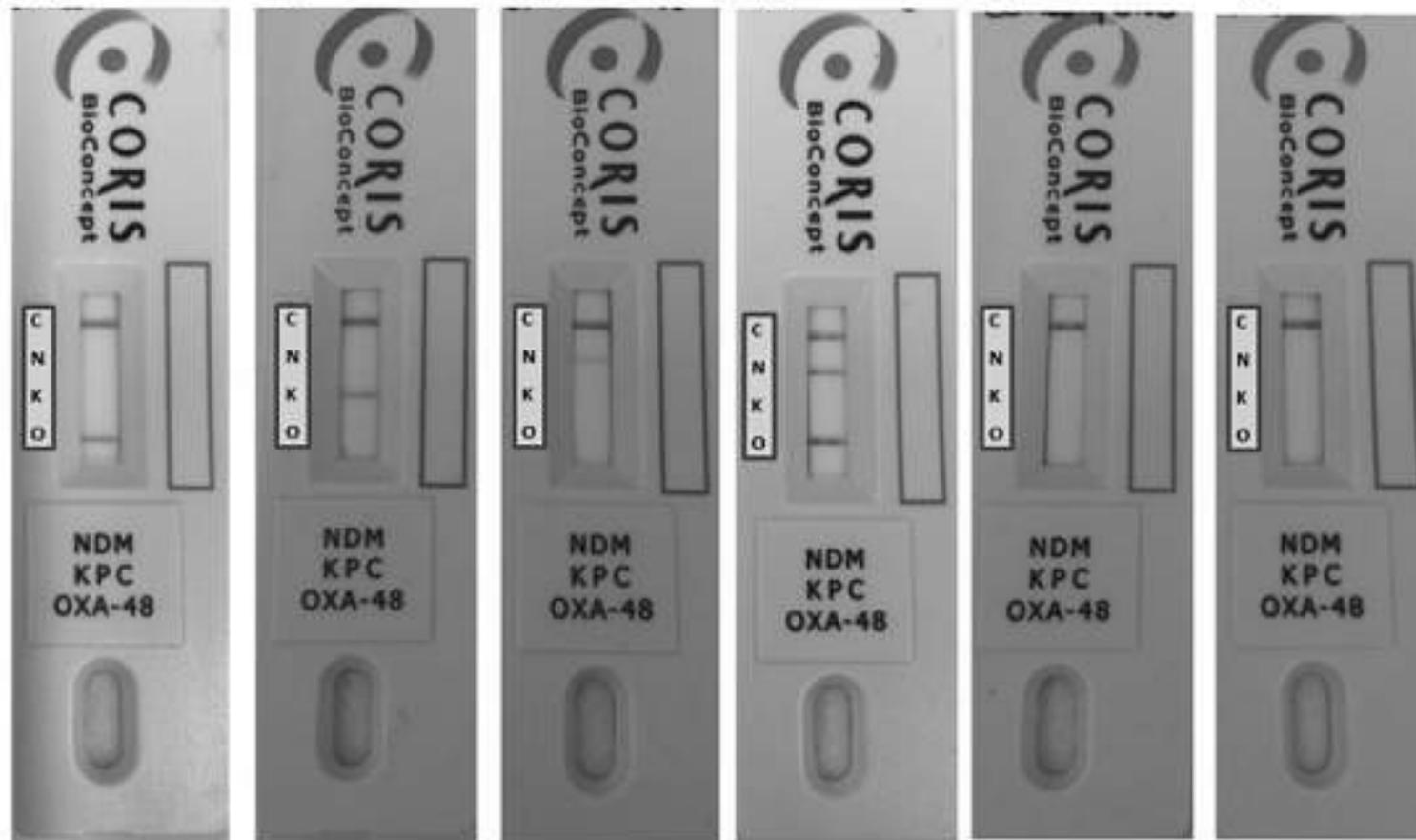


**Исчезновение пики
меропенема после
инкубации с культурой**

Собственные данные

Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases

Youri Glupczynski^{1*}, Agnès Jousset²⁻⁴, Stéphanie Evrard¹, Rémy A. Bonnin²⁻⁴, Te-Din Huang¹, Laurent Dortet²⁻⁴, Pierre Bogaerts¹ and Thierry Naas²⁻⁴



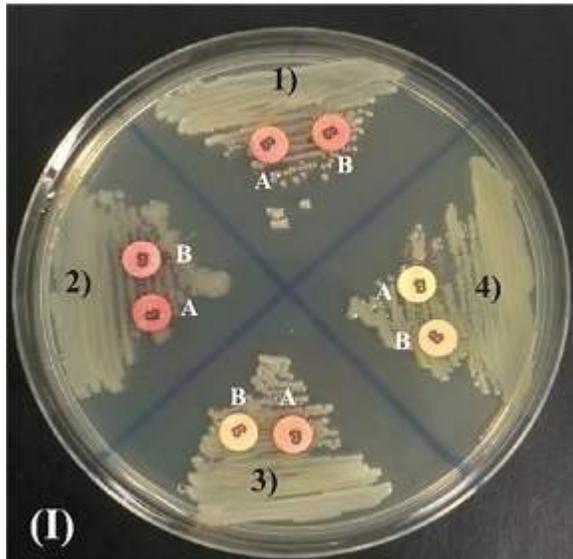
A nitrocefin disc supplemented with ertapenem for rapid screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

Yothin Teethaisong^a, Glyn Hobbs^b, Ismini Nakouti^b, Katie Evans^b, Griangsak Eumkeb^{a,*}

KPC-2-producing
K. pneumoniae

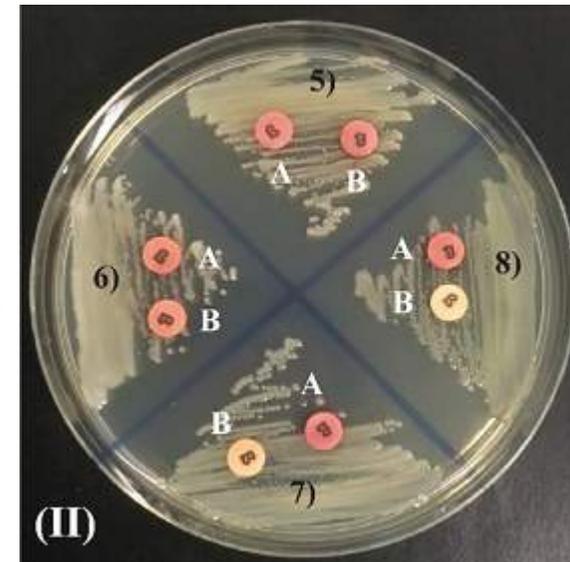
IMP-1-producing
Klebsiella ozaenae

NDM-1-producing
E. coli



E. coli
ATCC 25922

OXA-48-producing
K. pneumoniae



TEM-214+SHV-12
+ACT-32-
E. aerogenes

SHV-27 + TEM-53-producing
K. pneumoniae

ACT-32-producing
E. cloacae

A – диск с нитроцефином B – диск с нитроцефином + 20 мкг эртапенема

Фенотипическая детекция карбапенемаз класса А (КРС) -
Modified Hodge Test (МНТ)
Рекомендован CLSI

