

Μηχανισμοί Αντοχής των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Ευαγγελία Λεμπέση

Διευθύντρια ΕΣΥ

Μικροβιολογικό Εργαστήριο

Ν. Παίδων Αθηνών "Π. & Α. Κυριακού"

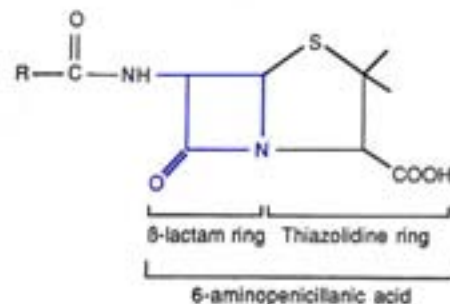


Πρόγραμμα Μετεκπαιδευτικών Μαθημάτων
Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2009-2011

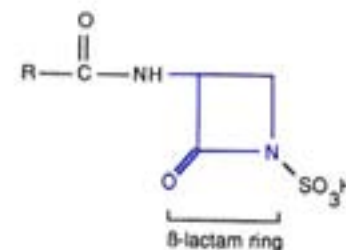
β-λακταμικά αντιβιοτικά.....60 χρόνια ιστορία?

- Πενικιλίνες
- Κεφαλοσπορίνες
- Αναστολείς των β-λακταμασών
- Μονοβακτάμες (αζτρεονάμη)
- Καρβακεφές (λορακαρμπέφη)
- Καρβαπενές (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη)

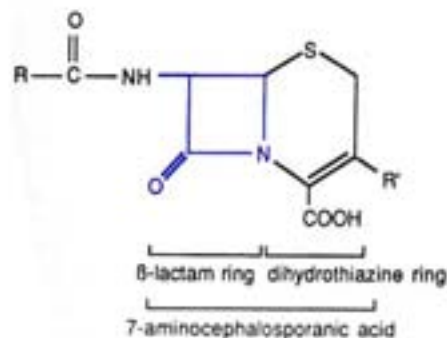
a) Penicillins



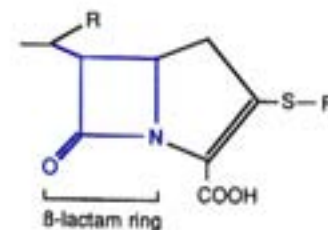
c) Monobactams



b) Cephalosporins



d) Carbapenems

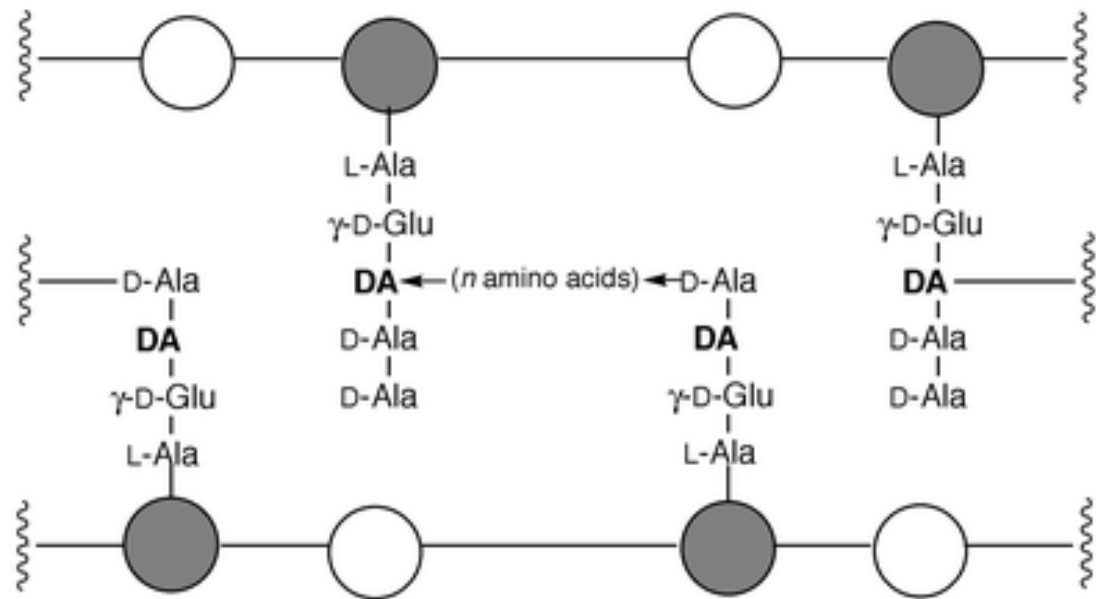


Κοινό χαρακτηριστικό ο δακτύλιος της β-λακτάμης και Στόχος δράσης οι Πενικιλινοδεσμευτικές Πρωτεΐνες -PBPs

PBPs - Σύνθεση πεπτιδογλυκάνης

PBPs:
Penicillin
Binding
Proteins

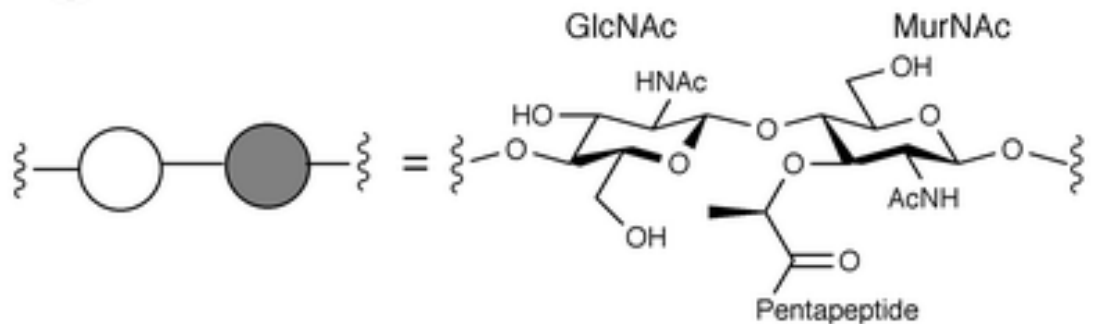
Οι PBPs ως
τρανσπεπτιδάσες
καταλύουν την
τρανσπεπτιδίωση
της
πεπτιδογλυκάνης



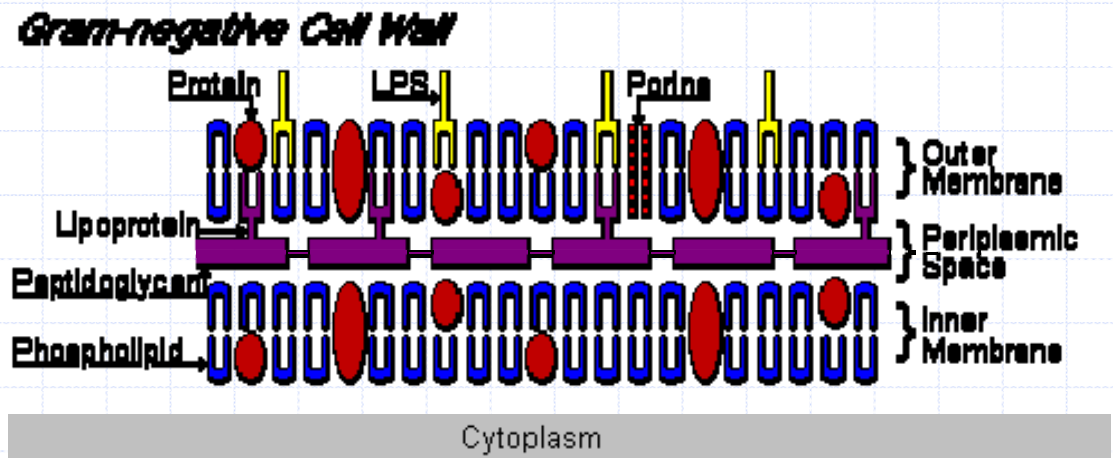
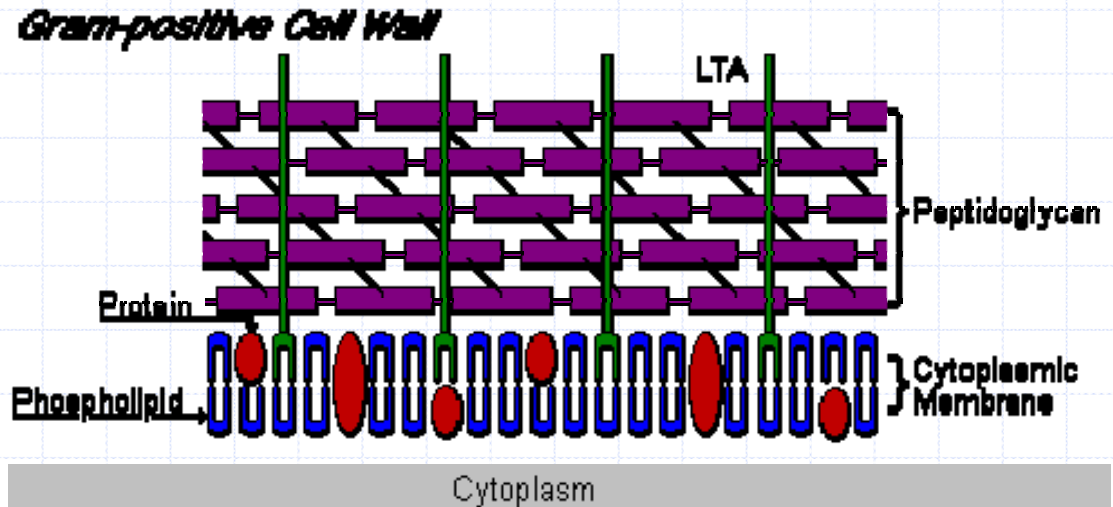
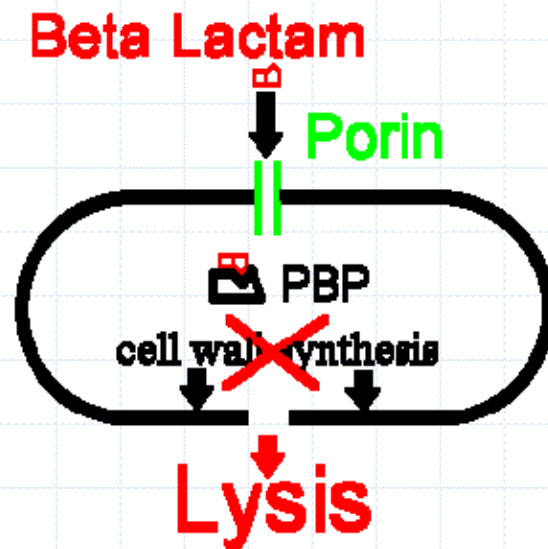
DA = diamino acid

● = *N*-acetylmuramic acid (MurNAc)

○ = *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)



β-λακταμικά – μηχανισμός δράσης



PBPs: Penicillin Binding Proteins
Καταλύουν την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης

Αντοχή των μικροβίων στα αντιβιοτικά

◆ Φυσική ή ενδογενής (intrinsic)

- Εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων και καθορίζεται γενετικά

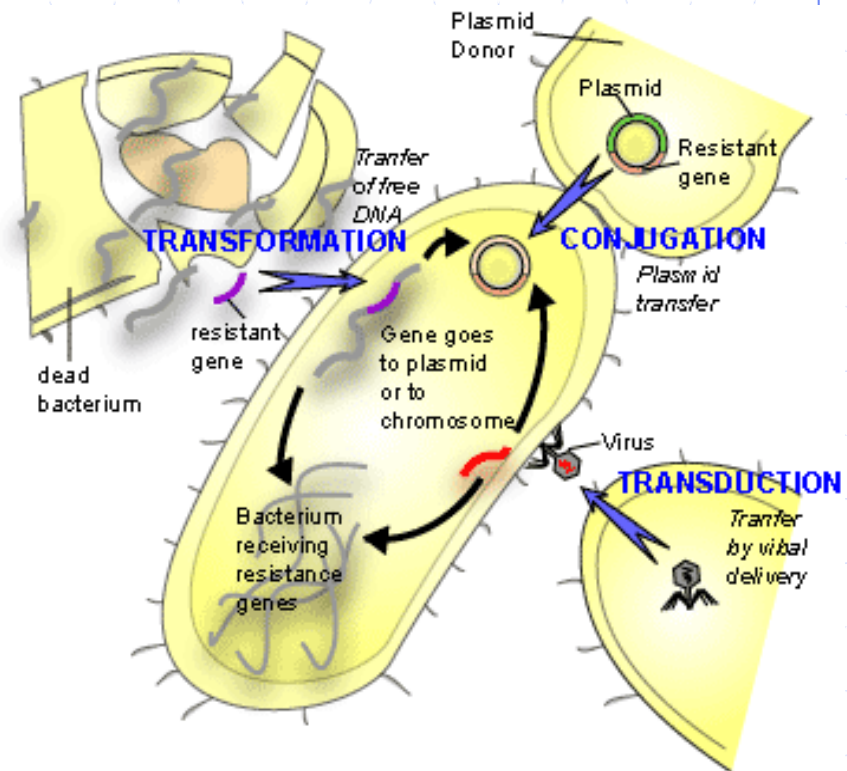
◆ Επίκτητη (acquired)

- Αναπτύσσεται σε αρχικά ευαίσθητα μικρόβια με διάφορους μηχανισμούς

Γενετικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής

Η επίκτητη αντοχή οφείλεται σε:

- ◆ αλλαγές (mutations) στη δομή του χρωμοσωματικού DNA ή / και
- ◆ απόκτηση γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια:
 - Μεταμόρφωση (transformation)
 - Σύζευξη (conjugation)
 - Μεταγωγή (transduction)



Η επίκτητη αντοχή αποτελεί το καλύτερο παράδειγμα ταχύτατης προσαρμογής των βακτηρίων στο νέο οικοσύστημα

Βιοχημικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής στα β-λακταμικά

◆ Τροποποίηση του στόχου δράσης – PBP_s

- Απαντάται συνήθως στα Gram (+) βακτήρια και συμβαίνει με:
 - ◆ Απόκτηση νέων – ξένων PBP_s
 - ◆ Ανασυνδυασμό PBP_s “μεταμόρφωση”
 - ◆ Σημειακές μεταλλαγές στις υπάρχουσες PBP_s
 - ◆ Υπερπαραγωγή PBP (σχετικά σπάνια)

◆ Παραγωγή β-λακταμασών

- Απαντάται συνήθως στα Gram (-) βακτήρια

◆ Μειωμένη διαπερατότητα – απώλεια πορινών

◆ Συστήματα αντλιών ενεργητικής αποβολής του αντιβιοτικού

Gram θετικά βακτήρια

Σταφυλόκοκκοι

Εντερόκοκκοι

Πνευμονιόκοκκοι

Σταφυλόκοκκοι

- Οι σταφυλόκοκκοι αποκτούν εύκολα αντοχή, γιατί εύκολα ενσωματώνουν στο χρωμόσωμα βακτηριοφάγους, πλασμίδια, τρανσποζόνια και αλληλουχίες εισδοχής
 - Η ανταλλαγή γενετικού υλικού γίνεται κυρίως με μεταγωγή και σύζευξη
-

Αντοχή στις β-λακτάμες – ιστορική αναδρομή

- ◆ 1941: Ανακάλυψη της πενικιλίνης
- ◆ 1942: Αντοχή στην πενικιλίνη, λόγω πενικιλινάσης
- ◆ 1959: Ανακάλυψη των πενικιλινασοάντοχων πενικιλινών (oxacillin, methicillin, cloxacillin, dicloxacillin)
- ◆ 1961: Αντοχή στη Μεθικιλίνη - **MRSA**
“Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*”
ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ
Εξαιρούνται οι νέες αντι-MRSA κεφαλοσπορίνες:
Κεφτομπιπρόλη, Κεφταρολίνη
- ◆ '70s –'80s: Τα περισσότερα MRSA είναι νοσοκομειακά
“Hospital - Acquired MRSA” **HA-MRSA**
- ◆ Τέλη '90s: **CA – MRSA** “Community - Acquired MRSA”

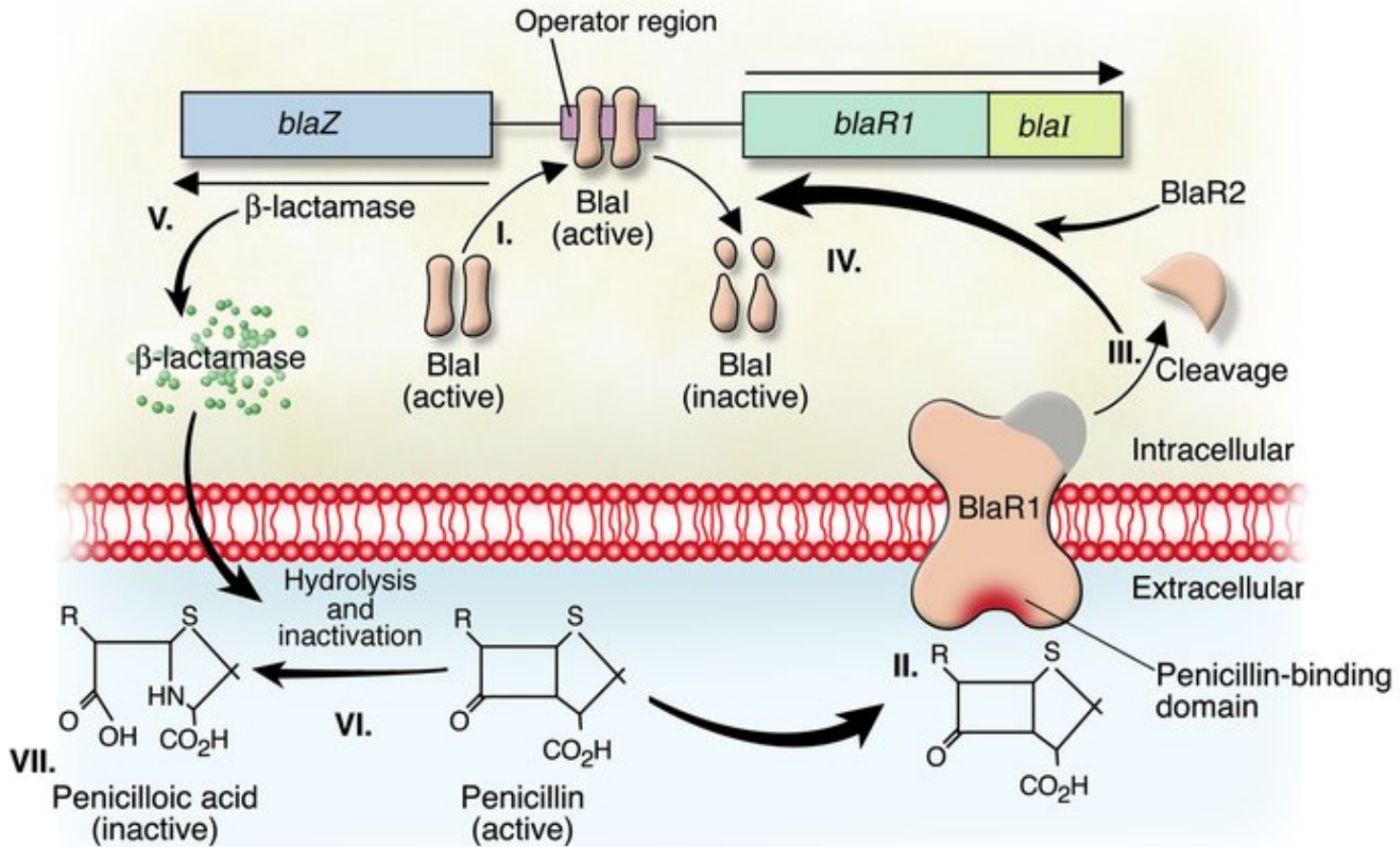
Η αντοχή στις β-λακτάμες μπορεί να οφείλεται:

- ◆ Παραγωγή β-λακταμάσης - πενικιλινάσης
 - Αντοχή στην PENICILLIN, AMPICILLIN, PIPERACILLIN
- ◆ Σύνθεση μιας νέας PBP (PBP2a) - **Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus "MRSA"**
 - Αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά και τους αναστολείς – ανιχνεύεται με τον έλεγχο της OXACILLIN, αντί της Methicillin
- ◆ Τροποποίηση των φυσιολογικώς παραγομένων PBPs 1-4 "MOD (modification) strains" (σπάνια)
 - Αντοχή στην OXACILLIN

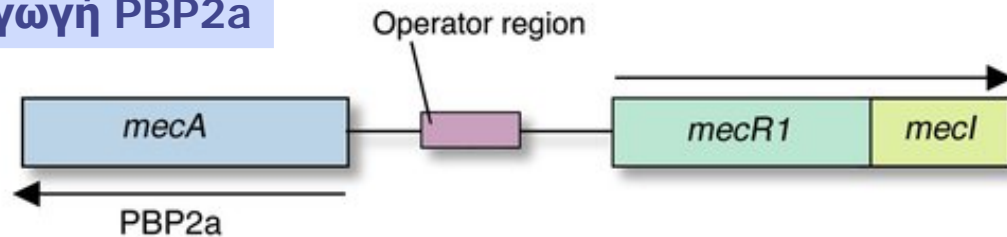
I. Αντοχή στην πενικιλίνη - Παραγωγή πενικιλινάσης

- ◆ Συμβαίνει σχεδόν σε όλα τα κλινικά στελέχη >90%
 - Η αντοχή αυτή θεωρείται επαγωγίμη
 - Η παραγωγή της πενικιλινάσης κωδικοποιείται από το γονίδιο *blaz* και τα ρυθμιστικά γονίδια *blaI* και *blaR1*.
 - Συνιστάται Έλεγχος με Νιτροσεφίνη μετά από Επαγωγή της Αντοχής σε όλα τα PENICILLIN ευαίσθητα στελέχη ($\geq 29\text{mm}$ ή $\text{MIC} \leq 0.12 \mu\text{g/ml}$)
 - Στελέχη με αυξημένη παραγωγή πενικιλινάσης, μπορεί να εμφανιστούν ως ανθεκτικά στην οξακιλλίνη

a Παραγωγή πενικιλλινάσης



b Παραγωγή PBP2a

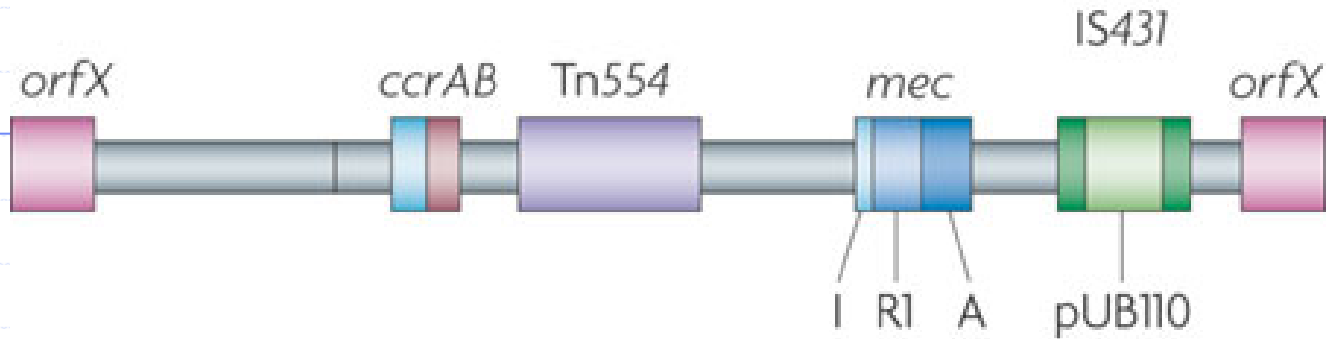


II. Αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά - MRSA

- ◆ Οφείλεται στην παραγωγή της **PBP2a**
 - Η PBP2a είναι μια νέα PBP με μειωμένη τάση σύνδεσης με όλες τις β-λακτάμες
 - Κωδικοποιείται από το *mecA* γονίδιο και τα ρυθμιστικά *mecI* και *mecR1*, τα οποία αποτελούν βασικά στοιχεία της χρωμοσωματικής σταφυλοκοκκικής κασέτας (Staphylococcal Cassette Chromosome, *SCCmec*)
 - Υπάρχουν 6 τύποι *SCCmec*: I, II, III, IV, V, VI
 - Το επίπεδο αντοχής εξαρτάται από το παραγόμενο ποσό της PBP2a - Η αντοχή είναι επαγωγίμη
 - Ετεροαντοχή ($1/10^4$ - 10^8) Οριακές οι MICs στην ΟΧΑ: 2-8μg/ml

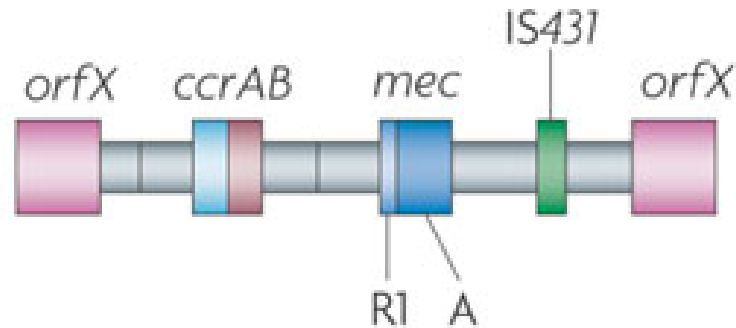
HA-MRSA

a *SCCmecII*



CA-MRSA

b *SCCmecIV*



Nature Reviews | Microbiology

Γονίδια αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά μπορούν να ενσωματωθούν στην *SCCmec* περιοχή (τύποι II, III) – πολυανθεκτικά στελέχη

Ανίχνευση των MRSA

- Οι MRSA ανιχνεύονται με:
 - ◆ Έλεγχο της CEFOXITIN ή OXACILLIN (CLSI)
 - ◆ Ανίχνευση της PBP2a (latex test)
 - ◆ Ανίχνευση του *mecA* γονιδίου (μοριακή μέθοδος)

ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΟΙ

Αντοχή στην Πενικιλίνη – ιστορική αναδρομή

- ◆ 1967: Νέα Γουινέα - Το 1^ο στέλεχος με μειωμένη ευαισθησία (IS) στην πενικιλίνη (MIC 0.5mg/l)
- ◆ 1970s: Ν. Αφρική - 1977: επιδημία με πολυανθεκτικά στελέχη
- ◆ 1980s: Ευρώπη - Παγκόσμια διασπορά!
- ◆ 1990s: ΗΠΑ και Ελλάδα
- ◆ Τελευταία έχει εμφανιστεί αντοχή και στις κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς
- ◆ Ελλάδα: Αντοχή στην PEN 1990-2000 / 10,3-38,5%

MDR – multidrug resistant

Μηχανισμός Αντοχής σε Πενικιλίνη και Κεφαλ/ρίνες

Οφείλεται σε Τροποποιημένες PBP_s, μειωμένης συγγένειας με τις β-λακτάμες, οι οποίες προκύπτουν με ανασυνδυασμό των φυσικών *pbp* γονιδίων με ξένα *pbp* γονίδια από συγγενή είδη – “μωσαϊκά” γονίδια – “μεταμόρφωση”

- ◆ PBP_s (φυσιολογικές): 1a, 1b, 2a, 2b, 2x, 3
- ◆ Αλλαγές σε μια μόνο PBP οδηγούν σε χαμηλού επιπέδου αντοχή
- ◆ Η ανάπτυξη της αντοχής συμβαίνει σταδιακά “step by step” με συνέπεια την αύξηση του επιπέδου αντοχής
- ◆ Αλλαγές σε:
 - PBP2x, PBP2b, PBP1a: Penicillin^R
 - PBP2x, PBP1a: Cephalosporin^R

Ανίχνευση της αντοχής του *S. pneumoniae* στην Penicillin

■ Με δίσκο OXA 1μg

- ◆ $\geq 20\text{mm}$: Ευαισθησία στην PEN (MIC $\leq 0.06\mu\text{g/ml}$)
- ◆ $\leq 19\text{mm}$: Ενδιάμεση ευαισθησία ή Αντοχή ή Ευαισθησία (σπάνια). Γι' αυτό συνιστάται:
Προσδιορισμός MICs για PEN, CRO ή CTX ή MEM

Στελέχη ευαίσθητα στην PEN, είναι συνήθως ευαίσθητα σε όλα τα β-λακταμικά

Η Απάντηση στο Πρόβλημα της Αντοχής

- 2000: 7-δύναμο εμβόλιο (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) με
 - ◆ Αποτελεσματικότητα >95%
 - ◆ Μείωση των διεισδυτικών λοιμώξεων
 - ◆ Μείωση της αντοχής
- 10-δύναμο εμβόλιο.....
- Σήμερα ανησυχεί η αυξημένη επίπτωση του 19A – πολυανθεκτικό στέλεχος και λοιμογόνο
- Αναμένεται το 13-δύναμο εμβόλιο (...19A)

Εντερόκοκκοι

Αντοχή των Εντεροκόκκων στα β-λακταμικά

- ◆ Οι Εντερόκοκκοι διαθέτουν την χαμηλής συγγένειας με τα β-λακταμικά PBP5, με συνέπεια:
 - Ενδογενή αντοχή σε:
 - ◆ κεφαλοσπορίνες,
 - ◆ αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες (OXA) και
 - ◆ αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες (TIC, CARB)
 - Σχετικά υψηλές MICs σε AMP και PIP, σε σχέση με τους στρεπτοκόκκους:
 - ◆ *E. faecalis* 1-8μg/ml, *E. faecium* 16-64μg/ml

Ο *Enterococcus faecium* εμφανίζει πάντα αντοχή στην IMP

Επίκτητη αντοχή

Συμβαίνει συχνά στον *E. faecium* και σπανιότατα στον *E. faecalis*.
Οφείλεται σε:

1. Υπερπαραγωγή ή τροποποίηση της PBP5 με “σημειακές μεταλλαγές”
 - Υψηλού επιπέδου αντοχή στην PEN >1000μg/ml
 - Διασταυρούμενη αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά
2. Παραγωγή β-λακταμάσης (εξαιρετικά σπάνια)
 - Αντοχή σε PEN, AMP, AMX, PIP και Ευαισθησία σε αναστολείς β-λακταμασών
 - Έλεγχος με νιτροσεφίνη απαραίτητος σε σοβαρές λοιμώξεις, ανεξάρτητα από την in vitro ευαισθησία

Ευαισθησία στην PEN σημαίνει και ευαισθησία στην AMP, ενώ
Ευαισθησία στην AMP δεν σημαίνει και ευαισθησία στην PEN

Απαιτητικά βακτήρια

Αιμόφιλος
Μηνιγγιτιδόκοκκος
Γονόκοκκος
Μοραξέλλα

Αντοχή του *Haemophilus influenzae* στα β-λακταμικά

◆ Παραγωγή β-λακταμάσης

- TEM-1 >95%, ROB-1 <1%
- Πλασμιδιακή
- Αντοχή μόνο σε αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη
- Υψηλού επιπέδου: MIC \geq 16mg/L
- Έλεγχος με νιτροσεφίνη απαραίτητος στις σοβαρές λοιμώξεις

◆ Τροποποιημένες PBP3s: PBP3a, PBP3b (σπάνια)

- BLNAR (β-Lactamase Negative Ampicillin Resistant)
- Χρωμοσωματική
- Αντοχή σε αμπικιλίνη, αναστολείς και α', β' γενιάς κεφαλοσπορίνες
- Χαμηλού επιπέδου: MIC ~4mg/L

◆ BLPACR: β-Lactamase Positive Amox/Clav Resistant

- Οφείλεται σε συνύπαρξη των δύο μηχανισμών (σπανιότατα)

Αντοχή του μηνιγγιτιδοκόκκου στα β-λακταμικά

◆ Η αντοχή στην πενικιλίνη και τις κεφαλοσπορίνες είναι εξαιρετικά σπάνια και μπορεί να οφείλεται:

1. Σύνθεση τροποποιημένων PBP2, PBP3 με ανασυνδυασμό
 - Χρωμοσωματική
 - Μειωμένη ευαισθησία σε PEN, AMP, AMOX
 - MIC 0.1-1.0μg/ml
2. Παραγωγή β-λακταμάσης (σπανιότατα)
 - Πλασμιδιακή
 - Αντοχή στην PEN, AMP, AMOX
 - MIC >256μg/ml
 - Έλεγχος με νιτροσεφίνη

Αντοχή του Γονόκοκκου στην Πενικιλίνη

Απαντάται συχνά με τους δύο παρακάτω μηχανισμούς:

◆ Παραγωγή β-λακταμάσης TEM-1 (PPNG)

- Πλασμιδιακή
- Αντοχή στην PEN, AMP, AMOX
- Υψηλού επιπέδου ($\geq 16\mu\text{g/ml}$) και ζώνη αναστολής στην PEN-10units $\leq 19\text{mm}$
- Συνιστάται η δοκιμή της νιτροσεφίνης (ταχεία – ακριβής)

◆ Σύνθεση τροποποιημένης PBP2b (*penA* γονίδιο) ή Μειωμένη διαπερατότητα (*penB* γονίδιο) (CMRNG)

- Χρωμοσωματική
- Αντοχή σε PEN, AMP, AMOX, AMC
- Συνήθως χαμηλού επιπέδου $\leq 4\text{mg/L}$

◆ Αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς δεν αναφέρεται, ενώ σπάνια παρατηρείται μειωμένη ευαισθησία

Αντοχή των ειδών *Moraxella* στην Πενικιλίνη

- ◆ Όλες οι Μοραξέλλες είναι γενικά ευαίσθητες στην πενικιλίνη και τα άλλα β-λακταμικά
- ◆ Μόνο η *M. catarrhalis* είναι ανθεκτική (>90%) στην PEN, AMP, AMOX λόγω παραγωγής β-λακταμάσης (BRO-1,-2)
- ◆ Η αντοχή είναι επαγωγίμη
- ◆ Συνιστάται η δοκιμή της νιτροσεφίνης
- ◆ Η μέθοδος διάχυσης των δίσκων, όταν το εναιώρημα δεν είναι πυκνό, μπορεί να δώσει ψευδώς ευαίσθητα στελέχη στην AMP

Gram αρνητικά βακτήρια

Εντεροβακτηριακά – μη ζυμωτικά

- ◆ Αντοχή στις κεφαλοσπορίνες
- ◆ Αντοχή στις καρβαπενέμες

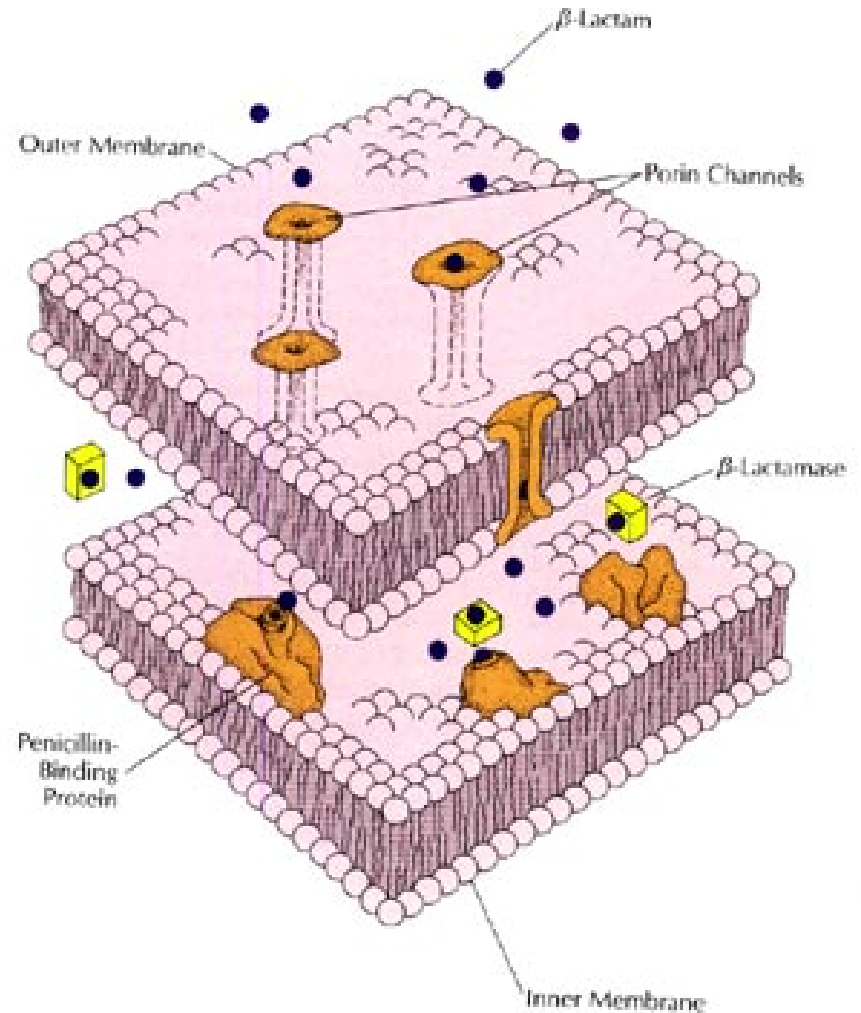
- ◆ XDR – έξτρα πολυανθεκτικά
- ◆ Παν-ανθεκτικά

Μηχανισμοί αντοχής στα β-λακταμικά

- ◆ Παραγωγή β-λακταμασών
- ◆ Μειωμένη διαπερατότητα – απώλεια πορινών
 - Παράδειγμα: Απώλεια πορίνης OprD στην *P. aeruginosa* προκαλεί αντοχή στην Ιμιπενέμη
- ◆ Συστήματα αντλιών ενεργητικής αποβολής του αντιβιοτικού
 - Παράδειγμα: Υπερέκφραση αντλίας στην *P. aeruginosa* προκαλεί αντοχή σε Μεροπενέμη και άλλες τάξεις αντιβιοτικών
- ◆ Τροποποίηση του στόχου δράσης – PBP_s (σπάνια)

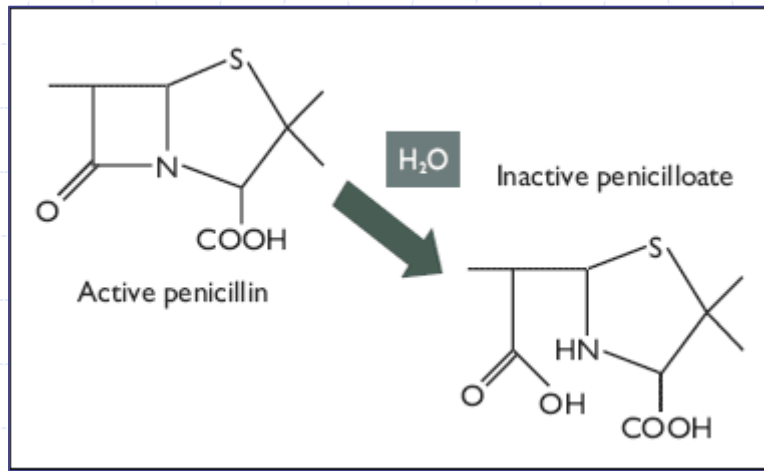
β-λακταμάσες

- ❖ Βακτηριακά ένζυμα πρωτεϊνικής φύσης
- ❖ Εκκρίνονται στο περιβάλλον του μικροβιακού κυττάρου [Gram(+) βακτήρια] ή στον περιπλασμικό χώρο [Gram(-) βακτήρια]
- ❖ Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια

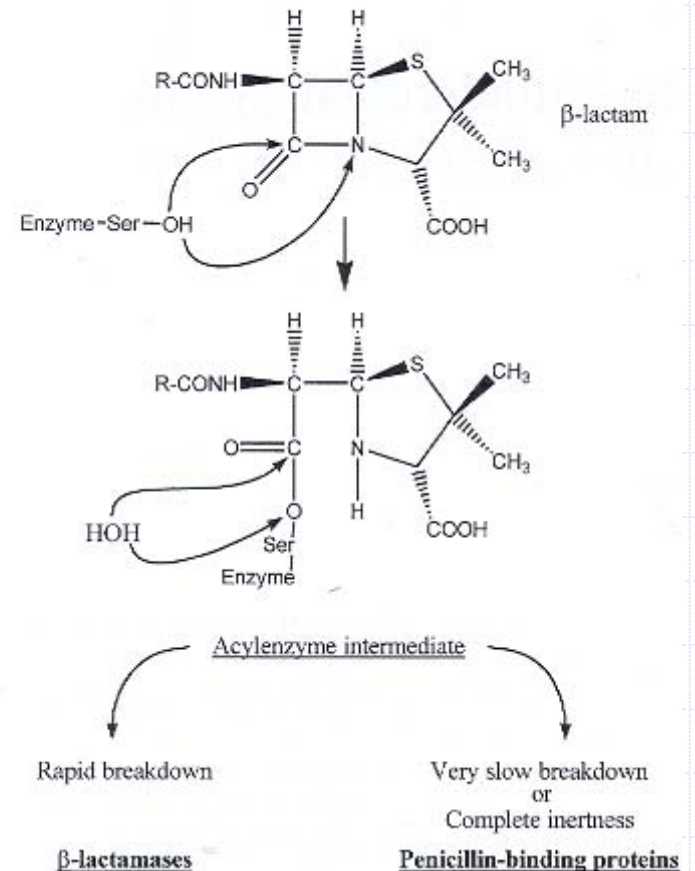


Μηχανισμός δράσης β-λακταμασών

◆ Αδρανοποιούν τις β-λακτάμες, υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό $O=C-N$ του β-λακταμικού δακτυλίου



1500 ■ ANTIMICROBIAL AGENTS AND SUSCEPTIBILITY



Διάκριση των β-λακταμασών

- ◆ Χρωμοσωματικές ή Πλασμιδιακές
- ◆ Ενδογενείς ή Επίκτητες
- ◆ Ιδιοσυστασιακές ή επαγώγιμες
- ◆ Σερινο-τρανσφεράσες (εστέρας σερίνης)
ή Μεταλλο-β-λακταμάσες (ιόν Zn^{2+})

Ταξινόμηση των β-λακταμασών

- ◆ **Λειτουργική ταξινόμηση (1995) κατά Bush-Jacoby-Medeiros**
 - σε ομάδες (groups) 1, 2, 3, 4 και
 - υποομάδες (subgroups) 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f

- ◆ **Μοριακή ταξινόμηση (1980) κατά Ambler**
 - σε τάξεις (classes) A, B, C, D

Bush <i>et al</i>	Ambler	Αναστολή Clav/EDTA	Βασικά χαρακτηριστικά
1	C	-	Κεφαλοσπορινάσες - AmpC
2a	A	Clav	Πενικιλινάσες (Σταφυλοκοκκικές/Εντεροκοκ)
2b	A	Clav	TEM-1,-2 & SHV-1
2be	A	Clav	ESBL (TEM- & SHV-)
2br	A	Clav μικρή	Inhibitor Resistant TEM (IRT)
2c	A	Clav	Καρμπενικιλινάσες PSE-
2e	A	Clav	Κεφουροξιμάσες
2f	A	Clav	Καρβαπενεμάσες
2d	D	Clav ποικίλη	Οξακιλ/άσες –ESBL- Καρβ/σες
3	B	EDTA	Μεταλλο-Καρβαπενεμάσες

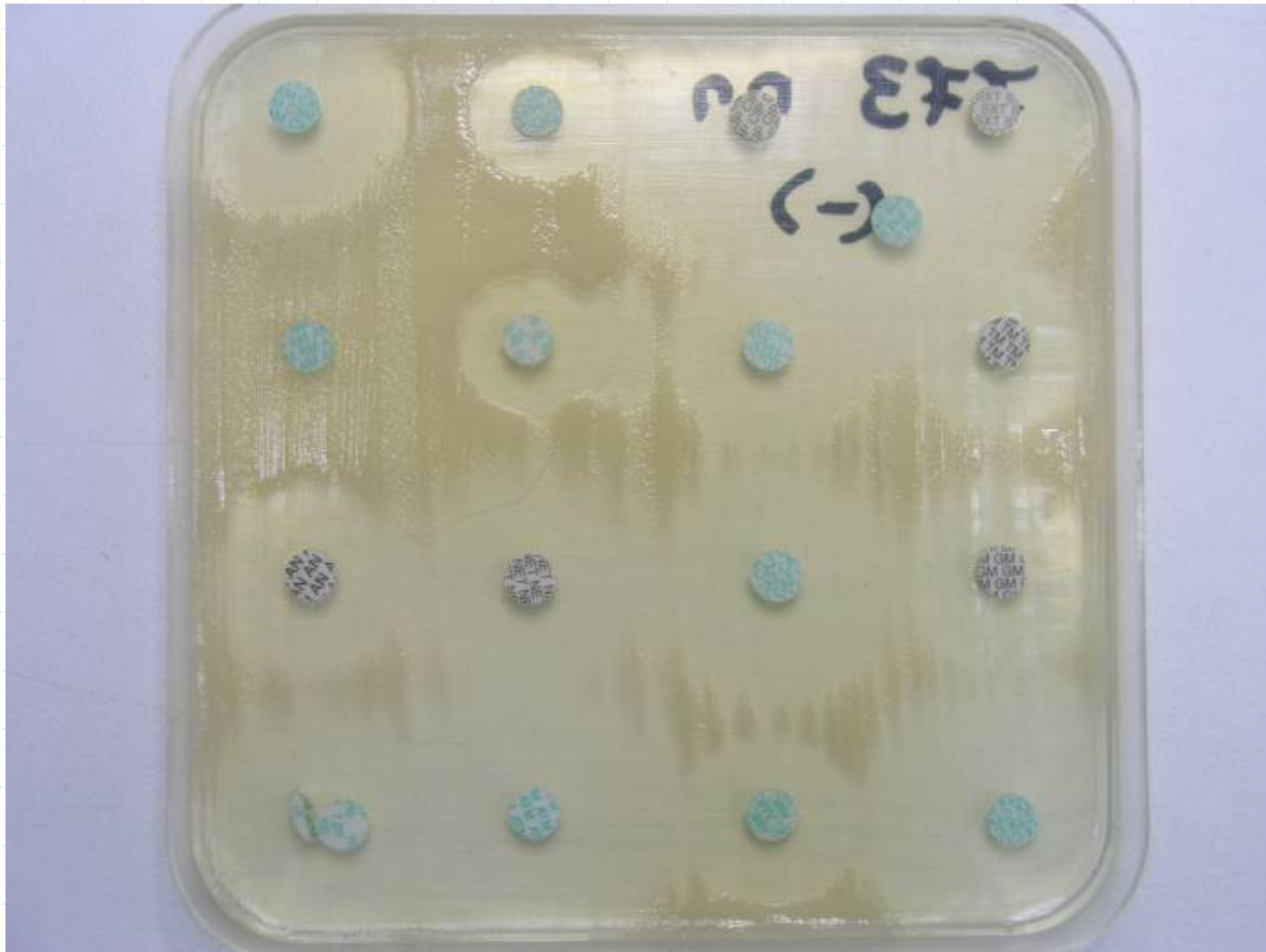
A, C, D: Σερινοτρανσφεράσες

B: Μεταλλοένζυμα (Zn)

Ευρέος φάσματος (broad spectrum) β-λακταμάσες (group 2b κατά Bush *et al*)

- ◆ Οι αρχικές TEM-1, -2 και SHV-1 και ορισμένες τύπου OXA
 - Πλασμιδιακές (*E. coli*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*)
 - Χρωμοσωματικές (SHV-1 *K. pneumoniae*)
- ◆ Η πρώτη πλασμιδιακή (TEM-1) βρέθηκε στην Ελλάδα (1965)
- ◆ Ευθύνονται για την επίκτητη αντοχή στις “broad-spectrum” πενικιλίνες
- ◆ Αναστέλλονται από τους αναστολείς

E. coli – παραγωγή TEM-1
(broad – spectrum β - lactamase)



Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum Beta-Lactamases, **ESBLs**)

- ◆ Εμφανίστηκαν το **1983** – παγκόσμια διασπορά (~400 ένζυμα)
- ◆ Προέρχονται από τις αρχικές **TEM-1, -2** (>160 ένζυμα) και **SHV-1** (100 ένζυμα)
- ◆ Συχνότερες σε *K. pneumoniae* και *E. coli*
- ◆ **1995**: Νεότερες ESBLs –τύπου **CTX-M** (>65 ένζυμα) – **Λοιμώξεις της Κοινότητας**

- ◆ Υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες
- ◆ Δεν υδρολύουν τις καρβαπενέμες (IMP, MEM, ERT)
- ◆ Αναστέλλονται από τους αναστολείς (CLAV, TAZ)
- ◆ Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται σε πλασμίδια, μαζί με άλλα γονίδια αντοχής, με συνέπεια την πολυαντοχή!
- ◆ **Θεραπεία Εκλογής: Καρβαπενέμες**

Νεότερες ESBLs –τύπου CTX-M (CTX-M-1 έως CTX-M-69)

- ◆ Προέρχονται από τις χρωμοσωματικές β-λακταμάσες τάξης A του γένους *Kluyvera*
- ◆ Μετά το 1995 διαδόθηκαν δραματικά, και στην Ελλάδα
- ◆ Συχνότερες σε στελέχη *E. coli* της κοινότητας
- ◆ Ταξινομούνται σε 5 υποομάδες (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25)
- ◆ Υδρολύουν καλύτερα την Cefotaxime (CTX) και την Cefepime (FEP), σε σχέση με την Cefotaxime (CAZ) (εξαιρούνται οι CTX-M-15, -16, -27)
- ◆ Αναστέλλονται πολύ καλά από την Tazobactam (TAZ) και μέτρια από το Clavulanic acid (CLAV)

Άλλες ESBLs (σπάνιες)

- ◆ GES-1, -3, -7, -8, -9
 - Πλασμιδιακές
 - Τα αντίστοιχα γονίδια φέρονται σε ιντεγκρόνια τάξης 1
 - Υδρολύουν καλύτερα την CAZ, σε σχέση με την CTX και την AZT
 - Δεν αναστέλλονται ικανοποιητικά από το CLAV

- ◆ PER-1, -2, -3
 - Χρωμοσωματικές ή πλασμιδιακές

- ◆ VEB-1 έως -6
 - Χρωμοσωματικές ή πλασμιδιακές
 - Τα αντίστοιχα γονίδια φέρονται σε ιντεγκρόνια τάξης 1

- ◆ TLA-1 και -2
- ◆ BES-1
- ◆ BEL-1
- ◆ SFO-1

Μέθοδοι Ανίχνευσης των ESBLs

◆ Αρχικός διαχωρισμός (screening test)

- *Μέτρηση των ζωνών αναστολής
CAZ (<23mm), CTX (<28mm), AZT (<28mm)

◆ Επιβεβαίωση (confirmatory test)

- *Δοκιμή δίσκων (combined discs)
CAZ/CAZ+CLAV, CTX/CTX+CLAV, FEP/FEP+CLAV: >4mm
- *Etest (CAZ/CAZ+CLAV=8) ή (>3 log αραιώσεις)
- Δοκιμή συνέργειας των δύο δίσκων (DDST)
CAZ, CTX, AZT και AMC

* Είναι προτυποποιημένες για *K. pneumoniae* – *E. coli* - *P. mirabilis* (CLSI)

Ανίχνευση ESBLs

Δοκιμή συνέργειας των
δύο δίσκων (DDST)



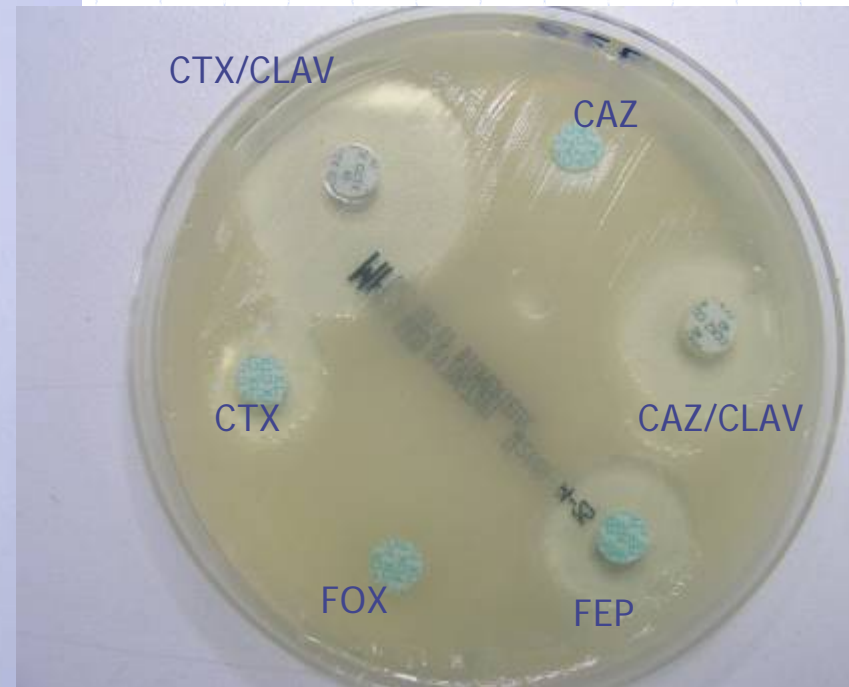
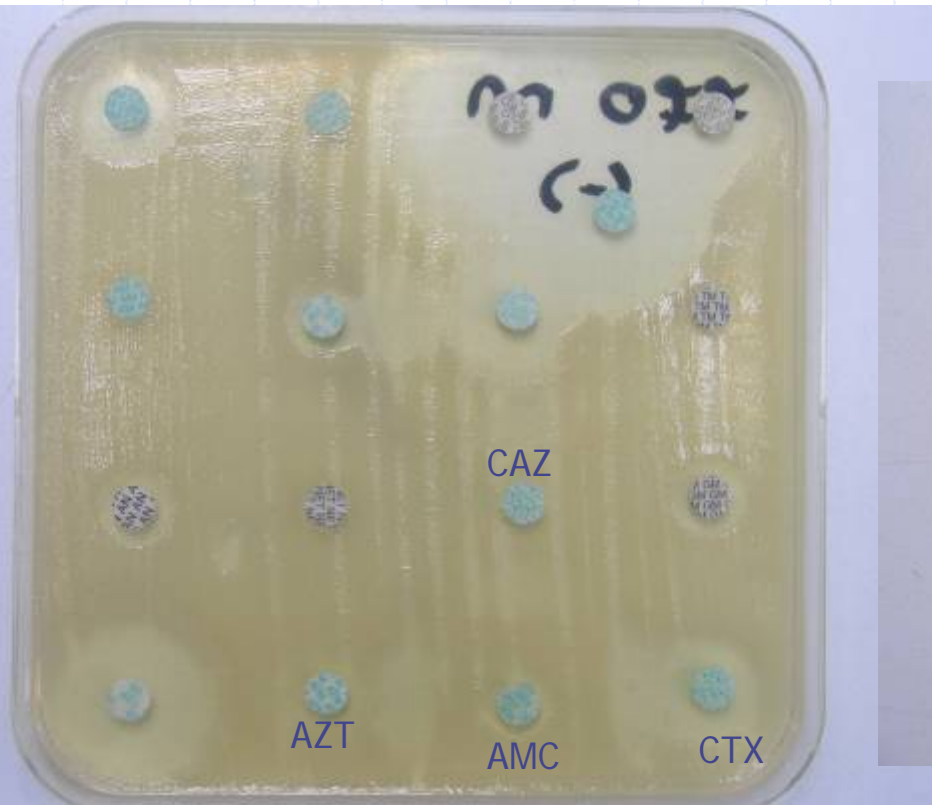
Επιβεβαιωτική δοκιμή με
δίσκους (combined discs)
ctx/ctx+clav και
caz/caz+clav (CLSI)



Ανίχνευση ESBLs σε *E. cloacae*

Δοκιμή συνέργειας των δίσκων (DDST)

Επιβεβαιωτική δοκιμή με δίσκους ctx/ctx+clav και caz/caz+clav (CLSI)

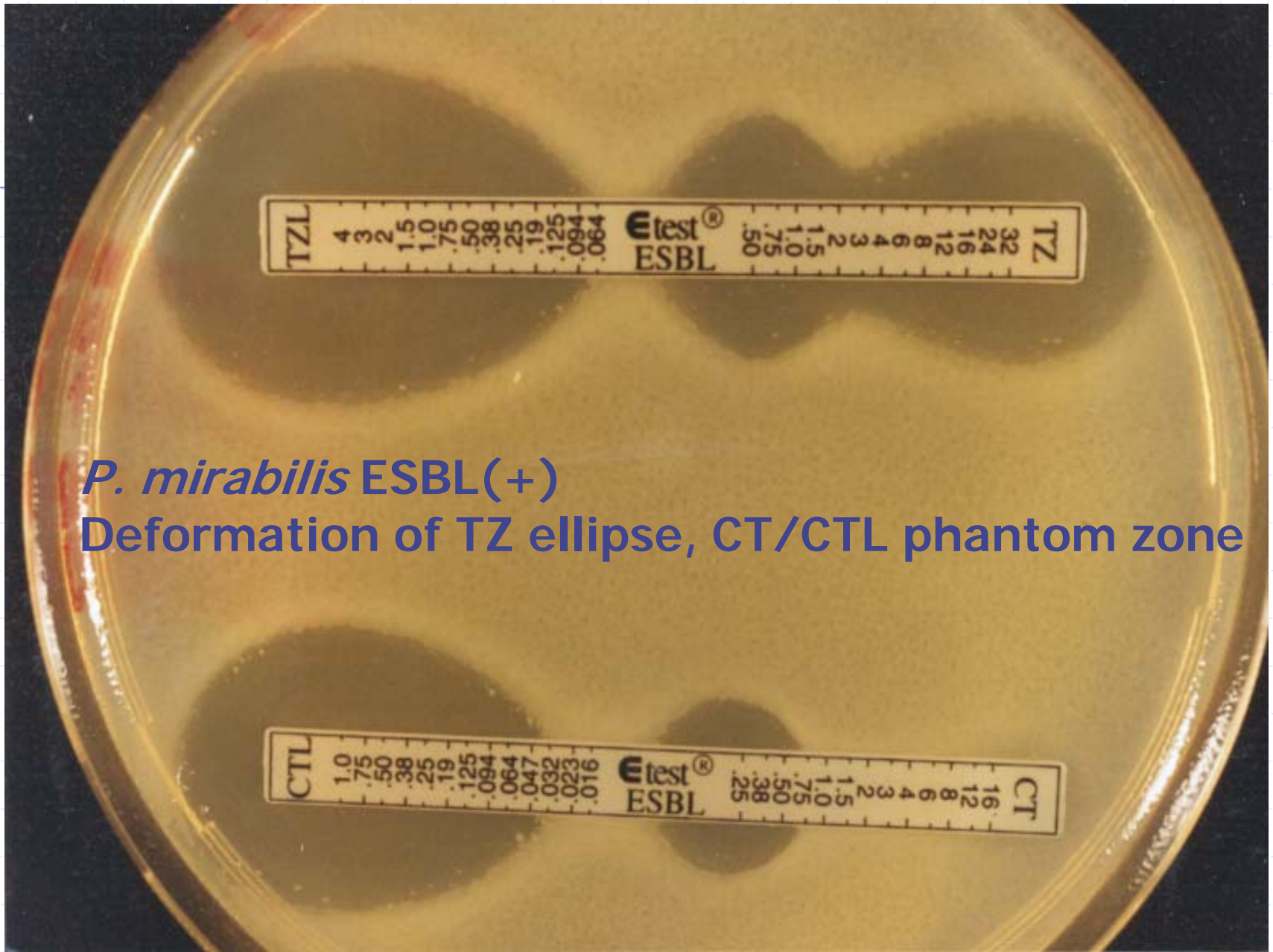




K. pneumoniae 276E

ESBL positive by TZ/TZL and negative by CT/CTL

K. pneumoniae 0426991 (South America)
TZ/TZL > 32/0.094 = > 340 = ESBL+
CT phantom zone = ESBL +



AmpC β-λακταμάσες “Κεφαλοσπορινάσες”

- ◆ Ανήκουν στην τάξη C κατά Ambler ή στην ομάδα -1 κατά Bush et al
- ◆ Έχουν καταγραφεί ως: CIT-, ENT-, FOX-, MOX-, DHA-, ACC-
- ◆ Η έκφραση τους είναι:
 - Ιδιοσυστασιακή (constitutive)
 - Επαγώγιμη (inducible) – αναστρέψιμη κατάσταση
 - Αποκατεσταλμένη (derepressed) – μόνιμη υπερπαραγωγή
 - ◆ Προβλήματα αντοχής προκαλούνται από την μόνιμη υπερπαραγωγή, η οποία είναι μη αναστρέψιμη
- ◆ Η σύνθεση και παραγωγή τους ελέγχεται από ένα σύστημα γονιδίων *ampC-ampG-ampD-ampR*

AmpC β-λακταμάσες (group-1 κατά Bush *et al*)

◆ Χρωμοσωματικές και επαγώγιμες

- *C. freundii*
- *Enterobacter* spp
- *M. morgani*
- *Providencia* spp
- *Serratia* spp
- *P. aeruginosa*
- *Acinetobacter* spp
- *Aeromonas* spp
- *Y. enterocolitica*
- *H. alvei*
-και άλλα

◆ Χρωμοσωματικές και μη επαγώγιμες

- *E. coli*
- *Shigella* spp

◆ Πλασμιδιακές

- *E. coli*
- *Klebsiella* spp
- *P. mirabilis*
- *Salmonella* spp

ΑμπC β-λακταμάσες

Φάσμα υδρόλυσης

- ◆ Υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά, πλην κεφεπίμης (!) και καρβαπενεμών
- ◆ Είναι ανθεκτικές στις κεφαμυκίνες (FOX)
- ◆ Δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς

- ◆ Όταν συνυπάρχει απώλεια πορινών προκαλείται αντοχή στις καρβαπενέμες

Φαινότυποι αντοχής σε παραγωγή β- λακταμασών AmpC

◆ Επαγώγιμες

- AMP, AMC, CEF, FOX

◆ Αποκατεσταλμένες (σε σταθερή επαγωγή)

- AMP, AMC, CEF, FOX,
CAZ, CTX, PIP, TIC,
TCC

➤ ESAC: Expanded Spectrum AmpC

AMP, AMC, CEF, FOX, CAZ, CTX,
PIP, TIC, TCC, FEP

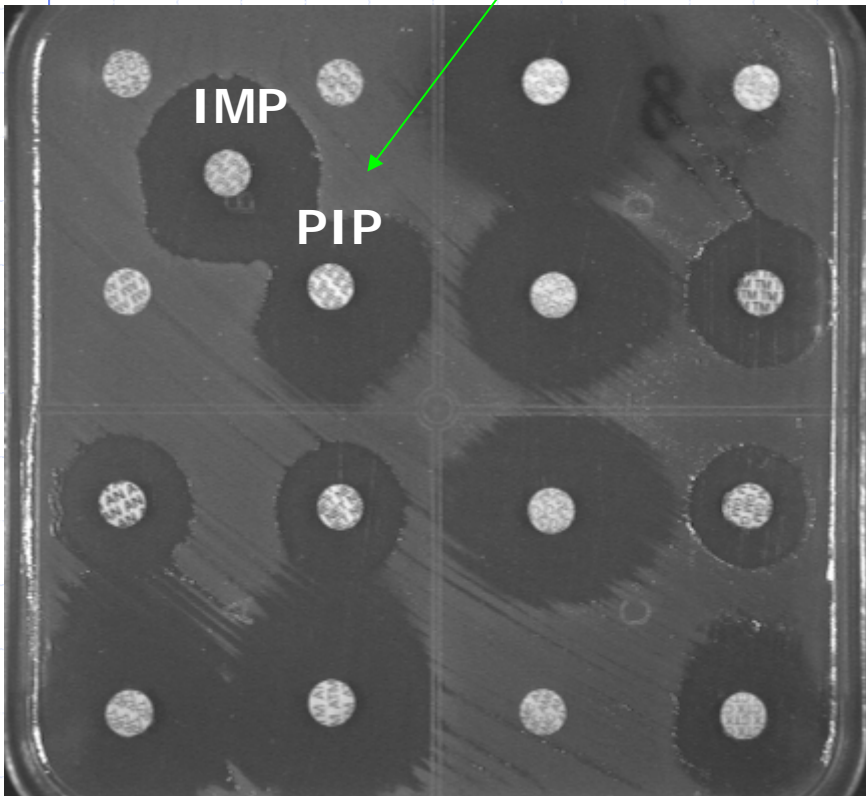
Συμβαίνει σπάνια

E. cloacae
Amp^rC υπερπαραγωγή

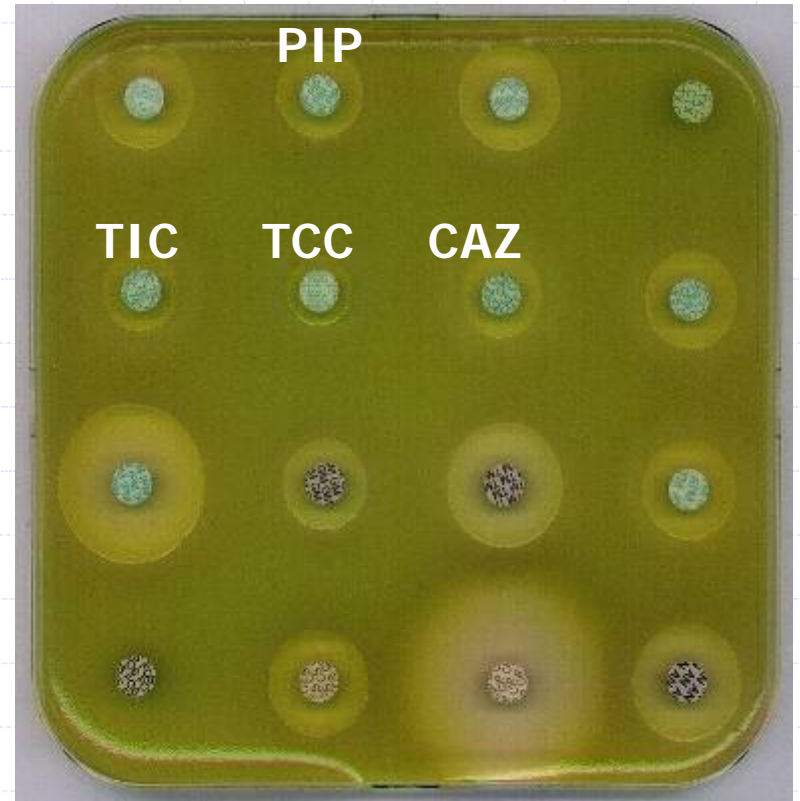


P. aeruginosa

Παραγωγή AmpC (άγριο στέλεχος)
Φαινόμενο Επαγωγής



Υπερπαραγωγή AmpC



R: TIC, PIP, TCC, CAZ

Ανίχνευση των AmpC

- ◆ Δεν υπάρχει προτυποποιημένη μέθοδος
- ◆ Προτείνονται τα παρακάτω:
 - Φαινότυπος αντοχής (AMP, CEF, AMC, FOX)
 - Έλεγχος ESBL: Αρνητικός
 - Επαγωγή παρουσία CLAV (Μείωση των ζωνών αναστολής με δίσκους CAZ/CAZ-CLAV ή TIC/TCC)
 - Επαγωγή παρουσία FOX (Μείωση της ζώνης της CAZ)
 - Αναστολή παρουσία βορονικού οξέος (APB) ή κλοξακιλλίνης
 - Etest AmpC CN/CNI: Cefotetan/Cefotetan+Cloxacillin

Etest[®] για ανίχνευση AmpC

- ◆ Etest CN/CNI (cefotetan ± cloxacillin)
- ◆ Σχεδιασμός ίδιος με ανίχνευση ESBL & MBL
- ◆ Κλινές cefotetan (7 αραιώσεις) ± cloxacillin
- ◆ Τα αποτελέσματα ΔΕΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΝΤΑΙ από την παραγωγή ESBL

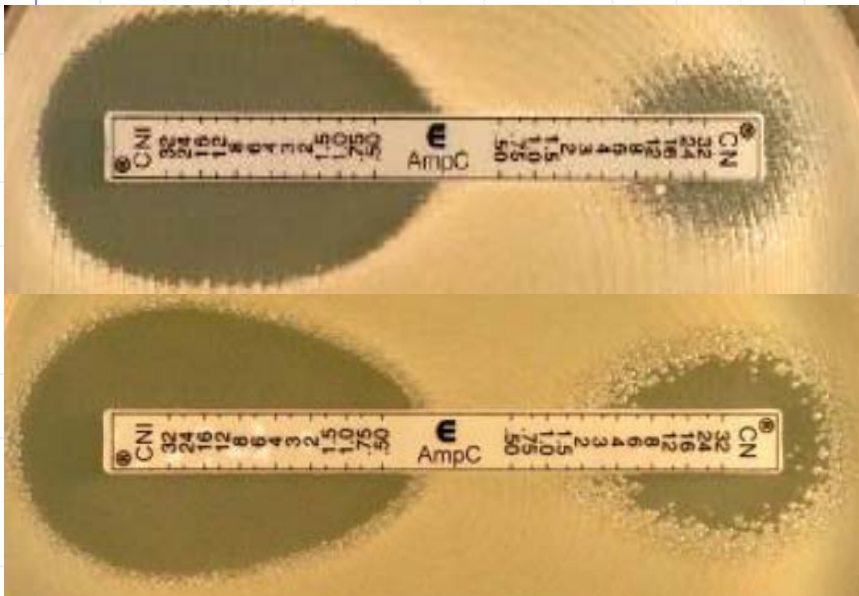


Ανάγνωση αποτελεσμάτων Etest[®] AmpC

◆ Ίδια κριτήρια όπως στα Etest ESBL & MBL:

- CNI 3 αραιώσεις πιο κάτω από το CN ή $CN/CNI \geq 8$
- Αποδόμηση της έλλειψης ή ζώνη φάντασμα

AmpC (+)



CN/CNI : >32 / <0.5 μg/ml

CN/CNI : 6 / <0.5 μg/ml

ΟΧΥ-β-λακταμάσες (K1)

- ◆ Χρωμοσωματική K1 β-λακταμάση στην *K. oxytoca*
 - Φυσική Αντοχή: AMP, TIC, PIP
- ◆ Υπερπαραγωγή χρωμοσωματικής K1 β-λακταμάσης
 - Αντοχή: AMP, AMC, TZP, TCC, CFX, AZI
 - Ευαισθησία: FOX, CAZ, CTX
- ◆ Πιθανόν να διαφύγει σαν ESBL
- ◆ Στην ανίχνευση της K1 βοηθάει η σωστή ταυτοποίηση του μικροβίου ως *K. oxytoca*

K. oxytoca - Υπερπαραγωγή K1



Καρβαπενεμάσες

- ◆ Ένζυμα που υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά
- ◆ Ταξινομούνται σε:
 - Τάξης A (τύπου **KPC**)
 - ◆ *K. pneumoniae*
 - Τάξης D (**OXA- καρβαπενεμάσες**)
 - ◆ *Acinetobacter baumannii*
 - Τάξης B (μεταλλο-β-λακταμάσες: τύπου **VIM**, IMP)
 - ◆ Εντεροβακτηριακά
 - ◆ Ψευδομονάδες
- ◆ **Ελλάδα:επιδημικές διαστάσεις !!!**

Καρβαπενεμάσες τάξης Α - Ταξινόμηση

◆ Χρωμοσωματικές

- SME
- NMC/IMI
- SFC-1
- SHV-38

◆ Πλασμιδιακές

- **KPC!!!**
- GES

- Οι χρωμοσωματικές πρωτοεμφανίστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '80, πριν την κλινική χρήση της ιμιπενέμης
- Είναι όλες **επίκτητες**

Καρβαπενεμάσες τάξης A

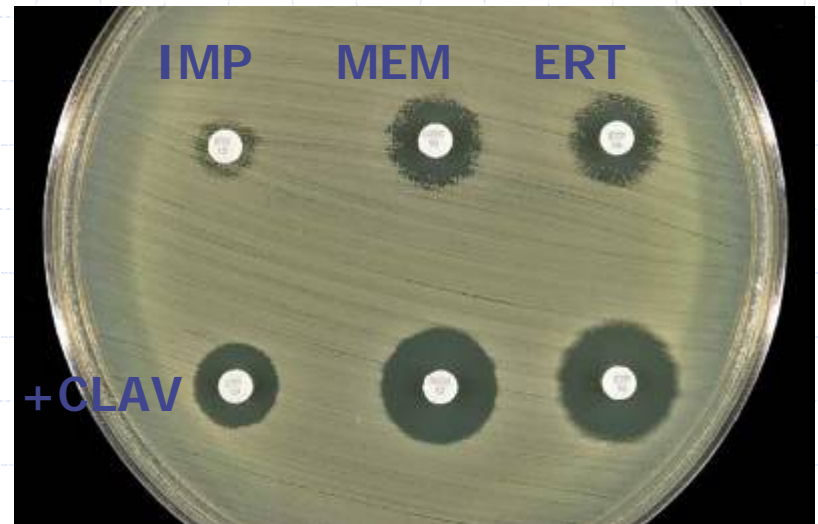
Χρωμοσωματικές και επαγωγίμες

- ◆ Είναι σπάνιες
 - SME-1, -2, -3
 - ◆ *S. marcescens*
 - ◆ Λονδίνο (1982), ΗΠΑ (1992), Ελβετία (2006)
 - IMI-1, -2
 - ◆ *E. cloacae* (1984-2001 σε ΗΠΑ και Κίνα)
 - NMC-A
 - ◆ *E. cloacae* (1990-2003 σε Γαλλία, Αργεντινή και ΗΠΑ)
- ◆ Υδρολύουν σημαντικά AMP, CEF, IMP, μέτρια PIP, AZT, MEM και λιγότερο την ERT
- ◆ Δεν υδρολύουν CTX, CAZ, FER, (FOX)
- ◆ Αναστέλλονται εν μέρει από τους αναστολείς

SME και IMI / NMC

Φαινοτυπική ανίχνευση

- ◆ Δεν υπάρχει προτυποποιημένη μέθοδος
- ◆ Βασίζεται στα παρακάτω:
 - Είδος του βακτηρίου (*S. marcescens* ή *E. cloacae*)
 - Χαρακτηριστικό φαινότυπο αντοχής **IMI^R/CAZ^S**
 - Αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ



Καρβαπενεμάσες τάξης A

Πλασμιδιακές

- **KPC-1,-2,-3,-4 (1996)**

- ◆ *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella spp*, *Enterobacter spp*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *E.coli*, *P. aeruginosa*
- ◆ ΗΠΑ, Κίνα, Γαλλία, Ισραήλ, Κολομβία, Σκωτία, Ελλάδα

- **GES/IBC (2000)**

- ◆ *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*
- ◆ Ελλάδα, Ν. Αφρική, Κορέα, Ιαπωνία

- ◆ Υδρολύουν και τις CTX, CAZ, FEP

- ◆ Αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ

- ◆ Έχουν 1000 φορές μικρότερη δραστικότητα σε σχέση με τις χρωμοσωματικές

KPC καρβαπενεμάσες

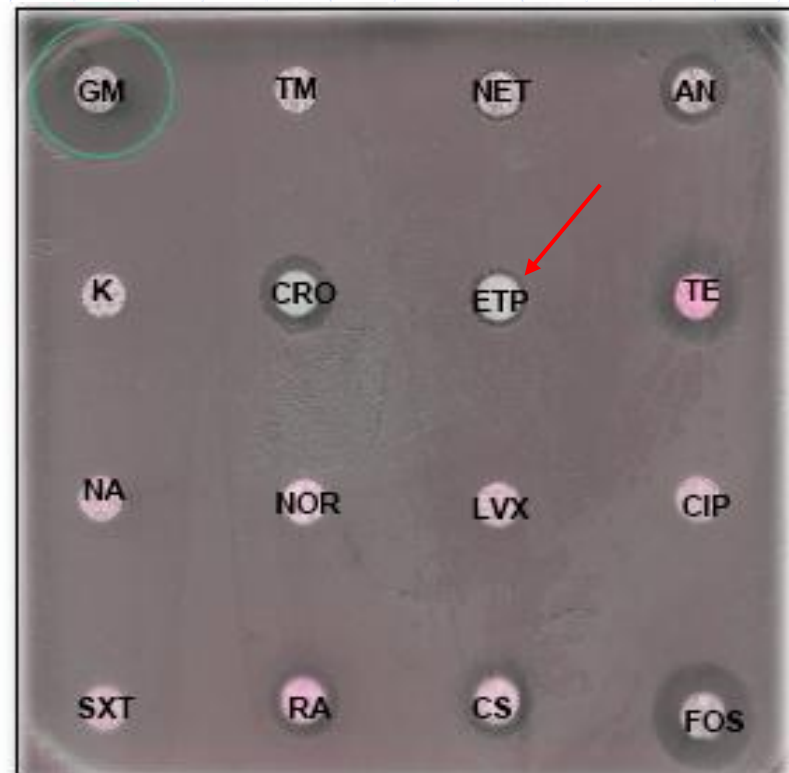
- ◆ KPC-1: Β. Καρολίνα (1996) σε *K. pneumoniae*
- ◆ KPC-2, -3, -4: **ΗΠΑ**, Κίνα, Γαλλία, Ισραήλ, Κολομβία, Σκωτία, **Ελλάδα!**
- ◆ Διαθέτουν τη **μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς**
- ◆ Ελλάδα: επιδημικές διαστάσεις στα περισσότερα νοσοκομεία
- ◆ Συχνά συνυπάρχει αντοχή σε πολλές τάξεις αντιβιοτικών (FQs, AMGs, COL)
- ◆ Εύκολα χαρακτηρίζονται σαν ESBLs
- ◆ **Η ανίχνευση των KPCs είναι δύσκολη, λόγω των χαμηλών MICs στις καρβαπενέμες**

Ανίχνευση των ΚΡCs

Ιδιαιτερότητες - δυσκολίες

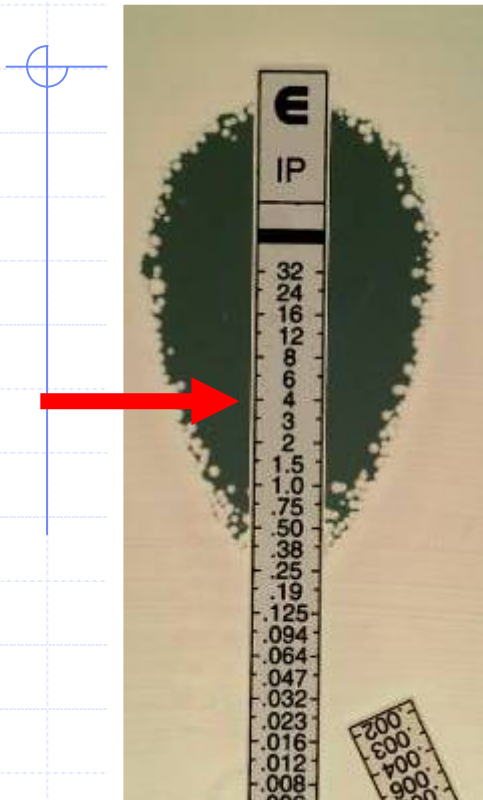
- ◆ Οι MICs της IMP και λιγότερο της MEM επηρεάζονται σημαντικά από την πυκνότητα του εναιωρήματος “inoculum effect”
- ◆ Το φαινόμενο αυτό δεν επηρεάζει την ETP
- ◆ Το Etest δίνει καλύτερα αποτελέσματα
- ◆ Τα αυτόματα μηχανήματα δεν μπορούν να τις ανιχνεύσουν
- ◆ Τροποποιημένο (Modified) Hodge Test (MHT): θετικό
- ◆ Δοκιμή συνέργειας: Αύξηση της ζώνης αναστολής της IMP ή FEP σε γειτνίαση με CLAV
- ◆ MBL test: αρνητικό
- ◆ Αναστολή από το βορονικό οξύ

Φαινότυπος αντοχής της KPC-2 *K. pneumoniae*

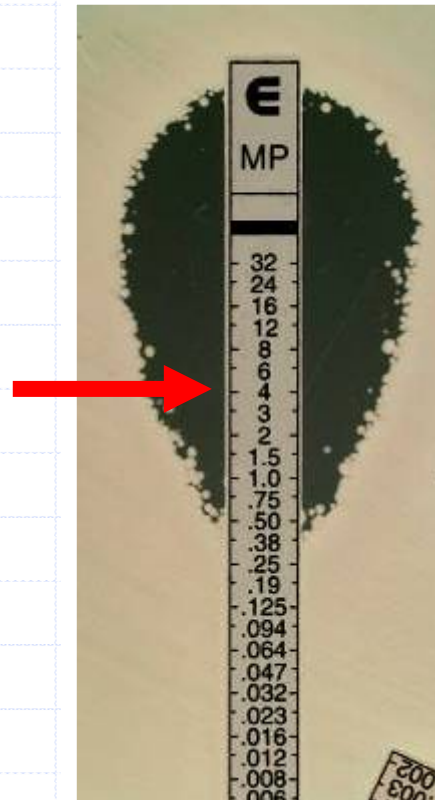


T. Naas

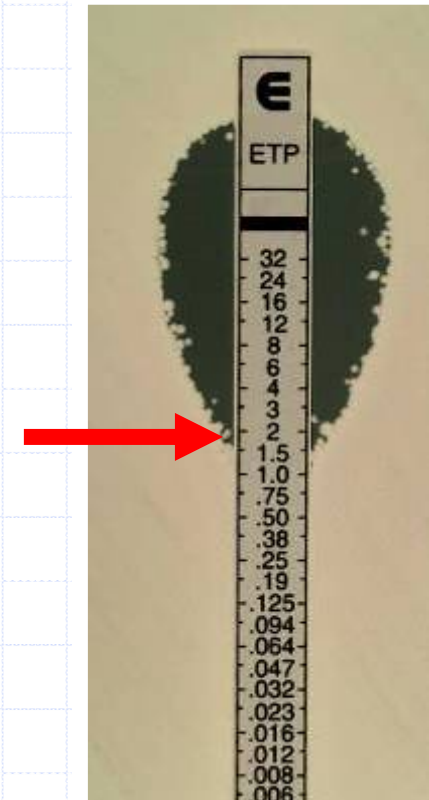
Παραγωγή ΚΡC – σημειώνονται οι χαμηλές τιμές MICs, όχι πάντα.



imipenem
 $\leq 4 \mu\text{g/mL}^*$



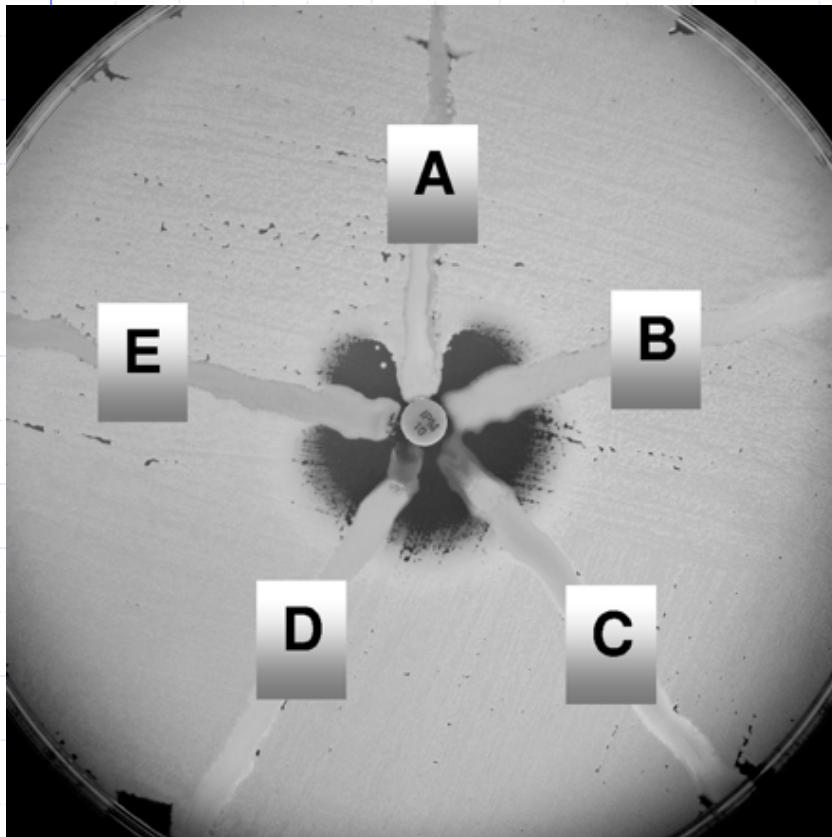
meropenem
 $\leq 4 \mu\text{g/mL}^*$



ertapenem
 $\leq 2 \mu\text{g/mL}^*$

* Όρια ευαισθησίας βάσει CLSI

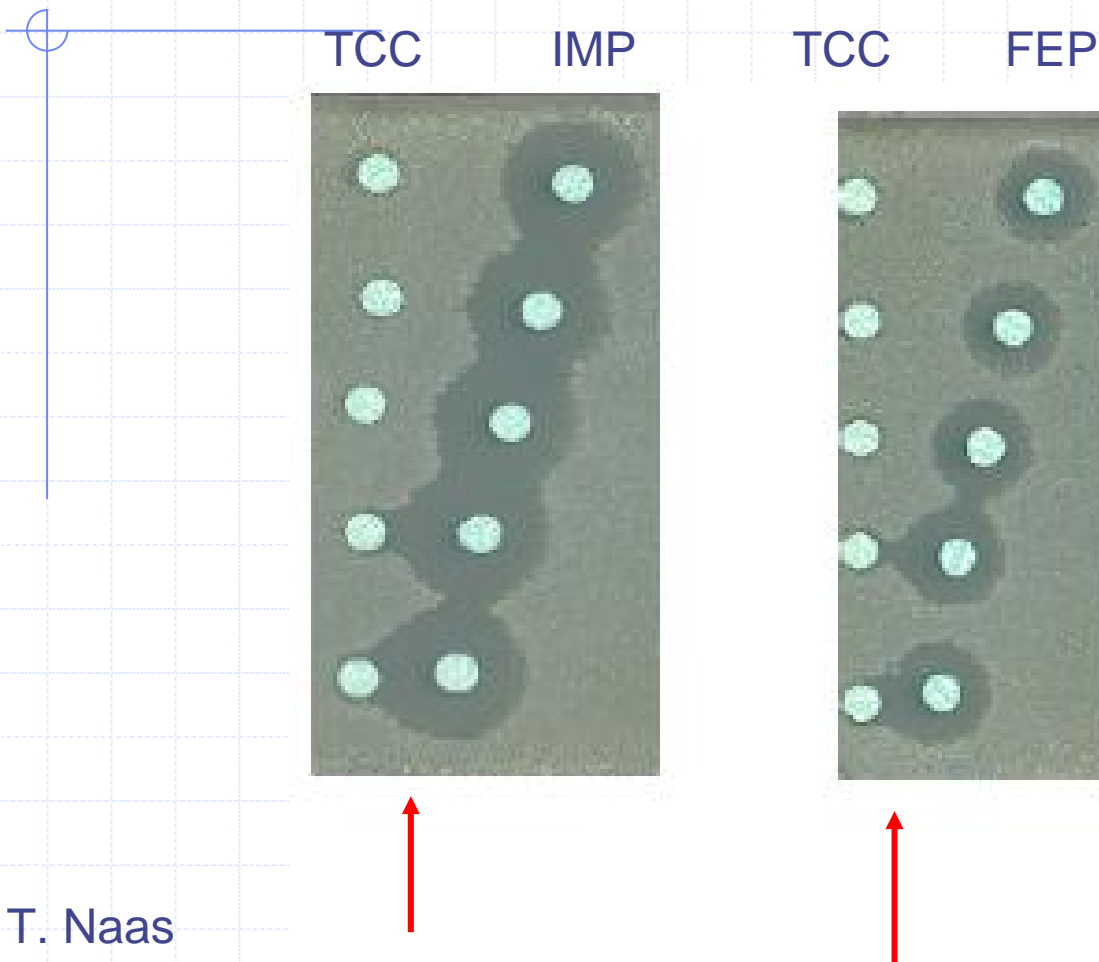
Τροποποιημένο Hodge Test (ΜΗΤ)



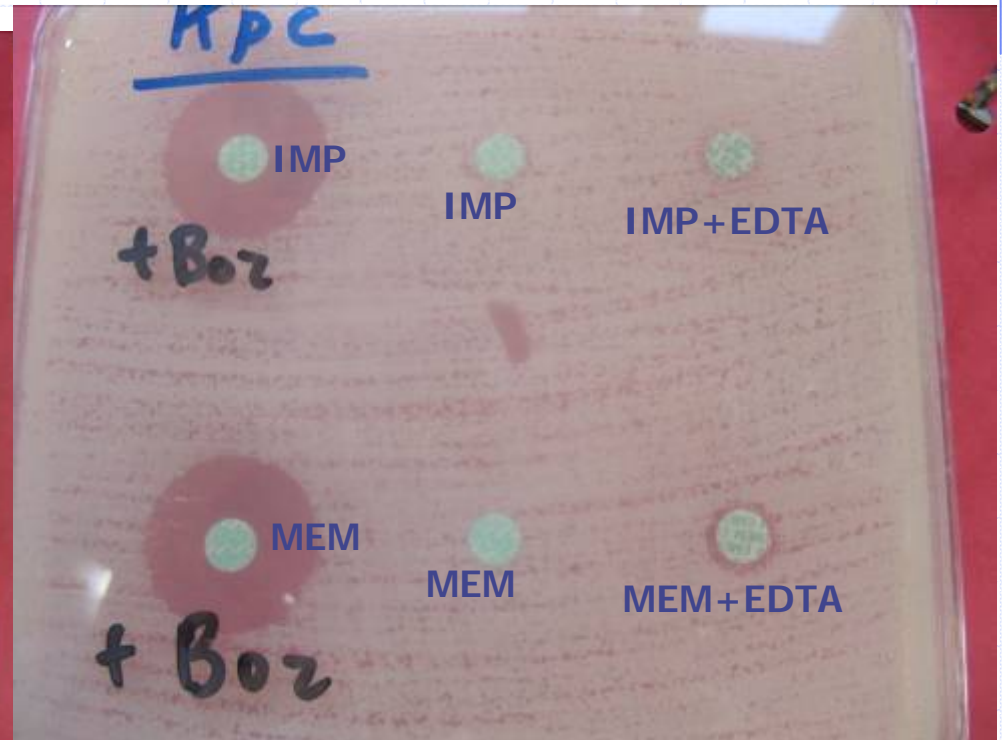
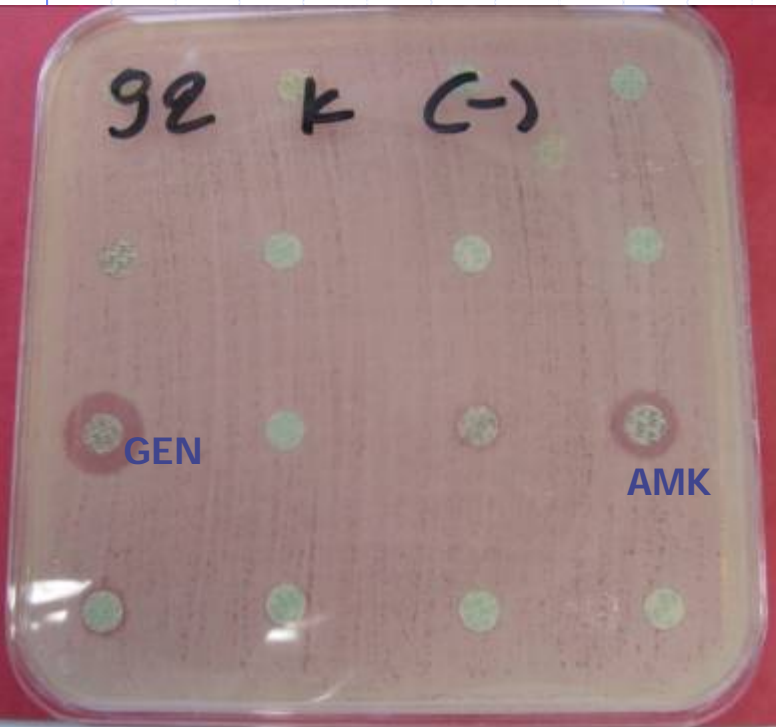
- ◆ Ενοφθαλμισμός ΜΗ agar με 1:10 αραιώση 0.5 McFarland εναιωρήματος *E. coli* ATCC 25922.
- ◆ Δίσκος ιμιπενέμης 10 μg στο κέντρο
- ◆ Στρώνουμε με κρίκο από το δίσκο προς την περιφέρεια το εξεταζόμενο στέλεχος
- ◆ Το στέλεχος A παράγει ΚΡC και έχει θετικό ΜΗΤ.
- ◆ Θετικό ΜΗΤ σημαίνει παραγωγή καρβαπενεμάσης

Anderson KF et al. JCM 2007 Aug;45(8):2723-5.

Δοκιμή συνέργειας με κλαβουλανικό KPC-2



Αναστολή από βορονικό



Μικροβιολογικό εργαστήριο "Π. & Α. Κυριακού"

Συχνά τα στελέχη KPC(+) είναι ευαίσθητα στην GEN

Συνοψίζοντας

- ❖ Οι καρβαπενεμάσες τάξης A είναι προς το παρόν περιορισμένες και εμφανίζονται σποραδικά ή σε μικρές επιδημίες
- ❖ Στην Ελλάδα έχουν προκαλέσει πολύ σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας
- ❖ Είναι κλινικά σημαντικές σε είδη, που φυσικά κατέχουν ή μπορεί να αποκτήσουν πρόσθετους μηχανισμούς αντοχής στις καρβαπενέμες
- ❖ Την τελευταία 5ετία οι πλασμιδιακές και ιδιαίτερα οι τύπου **KPC** ανησυχούν πολύ.

β-λακταμάσες τάξης D ή ΟΧΑ β-λακταμάσες ή Οξακιλλινάσες

- ◆ Συνιστούν την ομάδα 2d κατά Bush-Jacoby-Medeiros, η οποία περιλαμβάνει 119 ένζυμα
- ◆ Ασυνήθεις β-λακταμάσες, χαρακτηρίζονται από ετερογένεια (δομή και βιοχημικές ιδιότητες)
- ◆ Τα περισσότερα μέλη υδρολύουν ταχύτερα την ΟΧΑ σε σχέση με την PEN
- ◆ Στα τέλη της δεκαετίας του '70 και αρχές της δεκαετίας του '80 ήταν από τις πιο συχνές πλασμιδιακές β-λακταμάσες
- ◆ Το 1993 περιγράφηκε η πρώτη ΟΧΑ τύπου ESBL και η πρώτη ΟΧΑ καρβαπενεμάση

ΟΧΑ-καρβαπενεμάσες ή **CHDLs** “Carbapenem Hydrolysing D – Lactamases”

- ◆ Αποτελούν τον βασικότερο μηχανισμό αντοχής του *A. baumannii* στις καρβαπενέμες
- ◆ Συνήθως είναι χρωμοσωματικές
- ◆ Σήμερα έχουν περιγραφτεί **45 ένζυμα**
- ◆ Ταξινομούνται σε 9 υποομάδες

Ταξινόμηση OXA - καρβαπενεμασών

OXA-23	-27, -49	<i>A.baumannii</i>
OXA-24	-25, -26, -40, -72	"
OXA-51	-64 έως -71, -75 έως -78, -83, -84, -86 έως -89, -91, -92, -94, -95	"
OXA-58		"
OXA-55	OXA-SHE	<i>Shwanella</i> spp
OXA-48	-54, -SAR2	"
OXA-50	-50a έως -50d (PoxB oxacillinases)	<i>P.aeruginosa</i>
*OXA-60	-60a έως -60d	<i>R.pickettii</i>
*OXA-62		<i>P.promenusa</i>

*species - specific OXA enzymes

Ιδιότητες ΟΧΑ - καρβαπενεμασών

◆ Το φάσμα υδρόλυσης ποικίλλει

- Υδρολύουν τις πενικιλίνες [AMP, TIC, (PIP)] και την κεφαλοθίνη
- Ενώ ελάχιστα ή καθόλου τις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες και την AZT
- Διακρίνονται από χαμηλή υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών, σε σχέση με τις MBLs

◆ Αναστέλλονται:

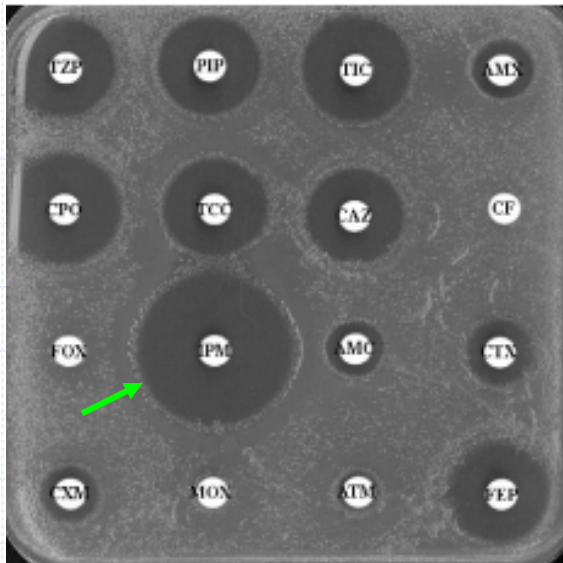
- Καλύτερα από την ταζοβακτάμη, ελάχιστα από το κλαβουλανικό, καθόλου από το EDTA

Φαινότυπος Αντοχής

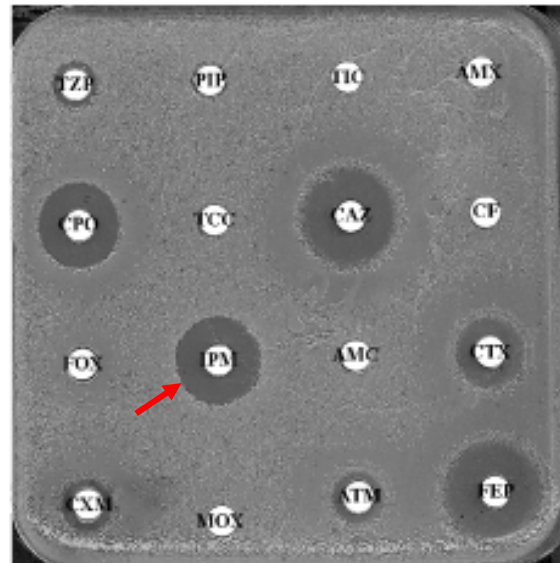
A. baumannii
Ευαίσθητο σε IMP

A. baumannii με OXA-23 *A. baumannii* με OXA-58

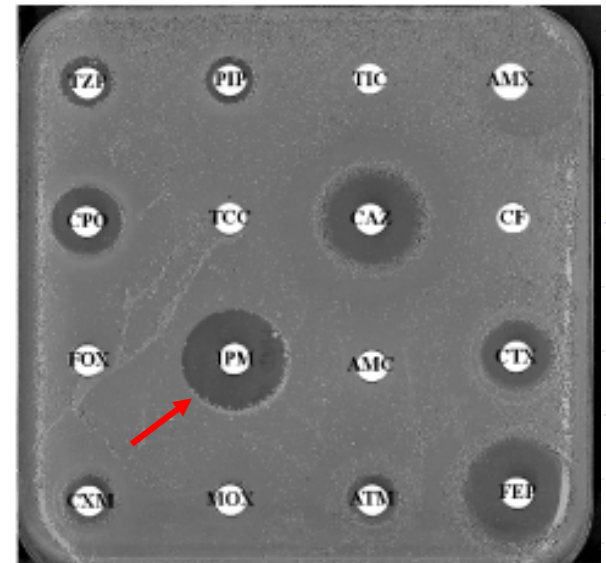
(A)



(B)

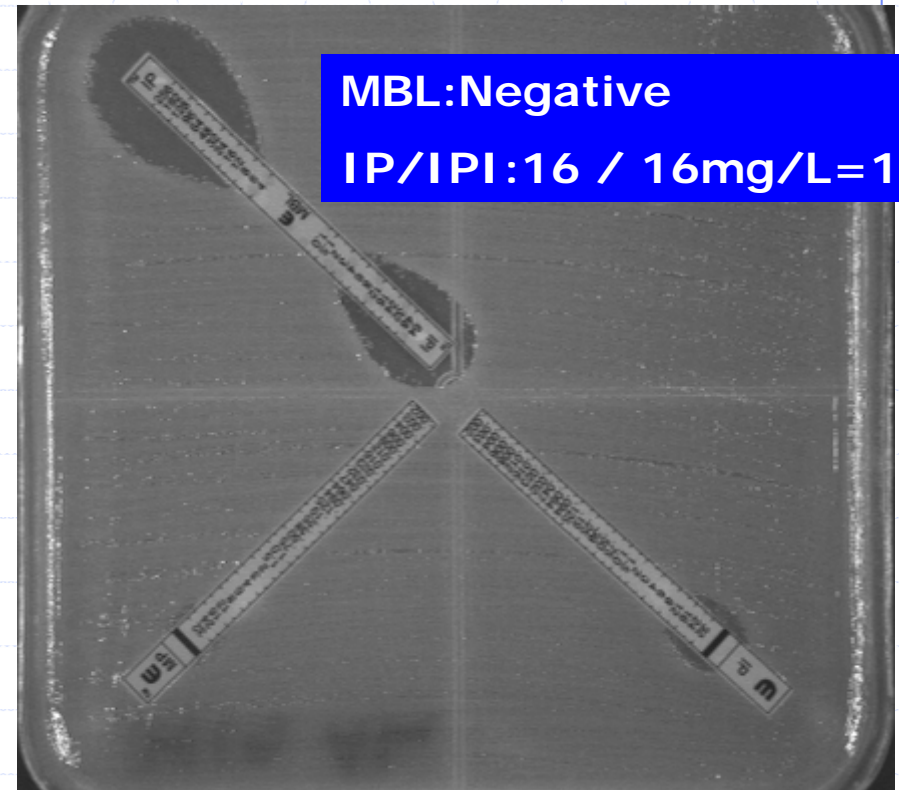
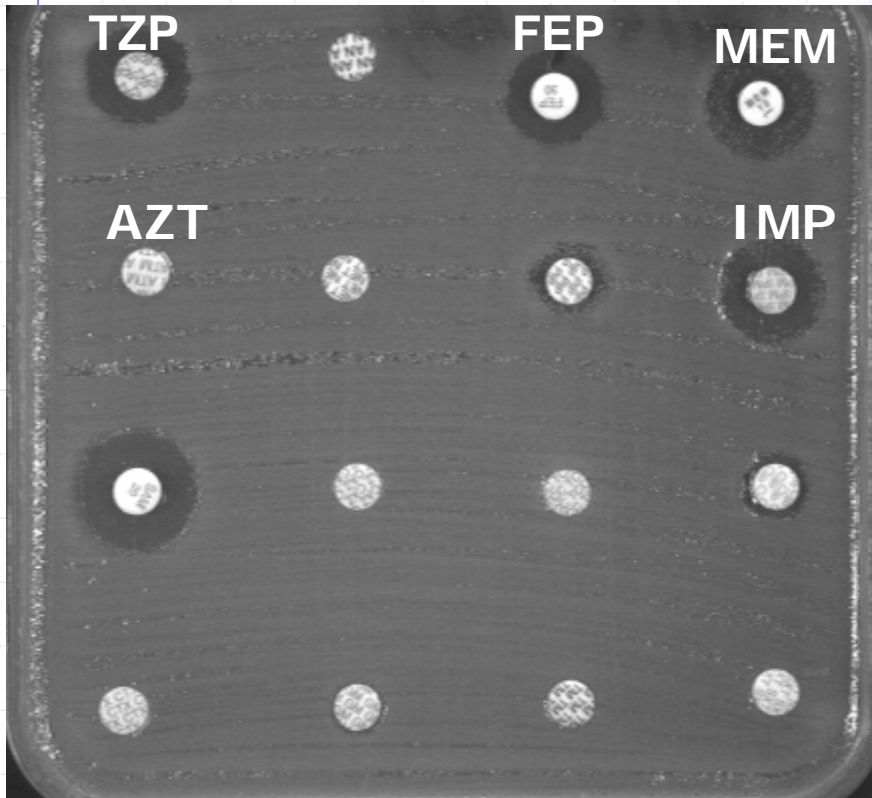


(C)



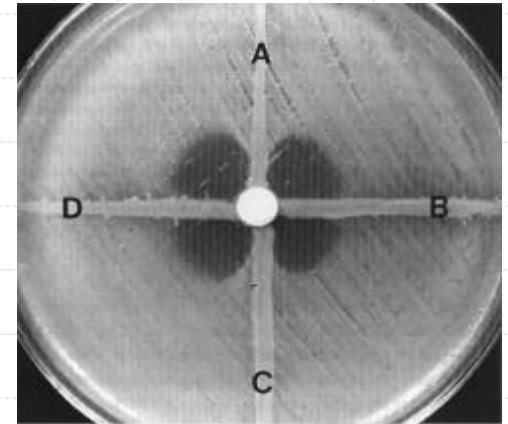
A. baumannii

Παραγωγή OXA –58 καρβαπενεμάσης



Ανίχνευση των ΟΧΑ- καρβαπενεμασών

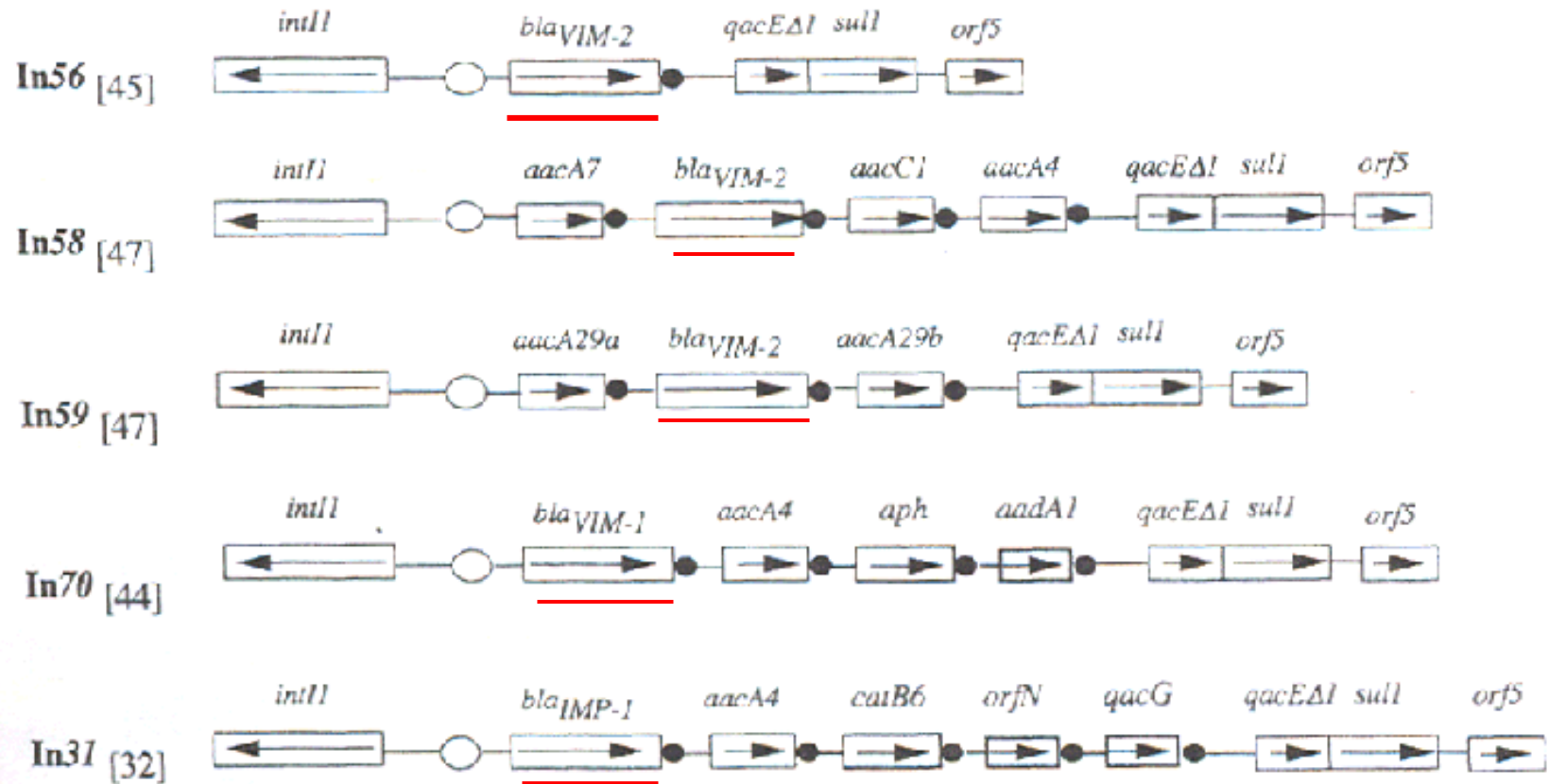
- ❖ Δεν υπάρχει προτυποποιημένη φαινοτυπική μέθοδος ανίχνευσης
- ❖ Το Etest μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα
- ❖ Η αντοχή δεν είναι πάντα ανιχνεύσιμη
- ❖ Το τροποποιημένο Hodge test είναι χρήσιμο για στελέχη με πολύ χαμηλή υδρολυτική ικανότητα
- ❖ Τα νοσοκομειακά στελέχη χαρακτηρίζονται από υψηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες ($MIC > 8\text{mg/L}$), που οφείλεται στην παρουσία πολλών μηχανισμών αντοχής



β - λακταμάσες τάξης Β κατά Amplair ή Μεταλλο-β-λακταμάσες

- ◆ Ταξινομούνται σε 4 τύπους:
 - IMP-1, -2, -4, -7, -9, -10, -11, -13, -16, -18
 - VIM-1, -2, -3, -4, -5, -7, -11
 - SPM-1
 - GIM-1
- ◆ Ευρεία διασπορά - Ελλάδα: VIM-1, -2, -4
- ◆ Υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά, πλην AZT
- ◆ Αναστέλλονται από το EDTA
- ◆ Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται συνήθως σε ιντεγκρόνια τάξης 1

Ιντεγκρόνια τάξης 1 με γονιδιακές κασέτες που κωδικοποιούν μεταλλοένζυμα σε *P. aeruginosa*



Καρβαπενεμάσες τάξης B

Επιδημιολογία

- **IMP-1**: 1991 Ιαπωνία
- *S.marcescens*,
A.baumannii, *P.aeruginosa*,
A.xylooxidans, *P.putida*,
P.stutzeri, *K.pneumoniae*,
S.flexneri, *C.youngae*,
E.cloacae
- Ιαπωνία, Ταϊβάν,
Σιγκαπούρη, Ιταλία, Χονγκ-
Κονγκ, Κίνα, Πορτογαλλία,
Καναδάς
- **VIM-1**: 1997 Βερόνα Ιταλίας
- *P.aeruginosa*, *A.baumannii*,
A.xylooxidans, *E.cloacae*,
S.marcescens, *P.putida*,
Acinetobacter spp,
P.stutzeri, *C.freundii*, *E.coli*,
P.mirabilis
- Γαλλία, Ελλάδα, Ιταλία,
Ισπανία, Κορέα, Ταϊβάν,
Πορτογαλλία, Πολωνία, ΗΠΑ
Κροατία, Βέλγιο, Ν.Αμερική

SPM-1: 2001 Βραζιλία
P.aeruginosa

GIM-1: 2002 Γερμανία
P.aeruginosa

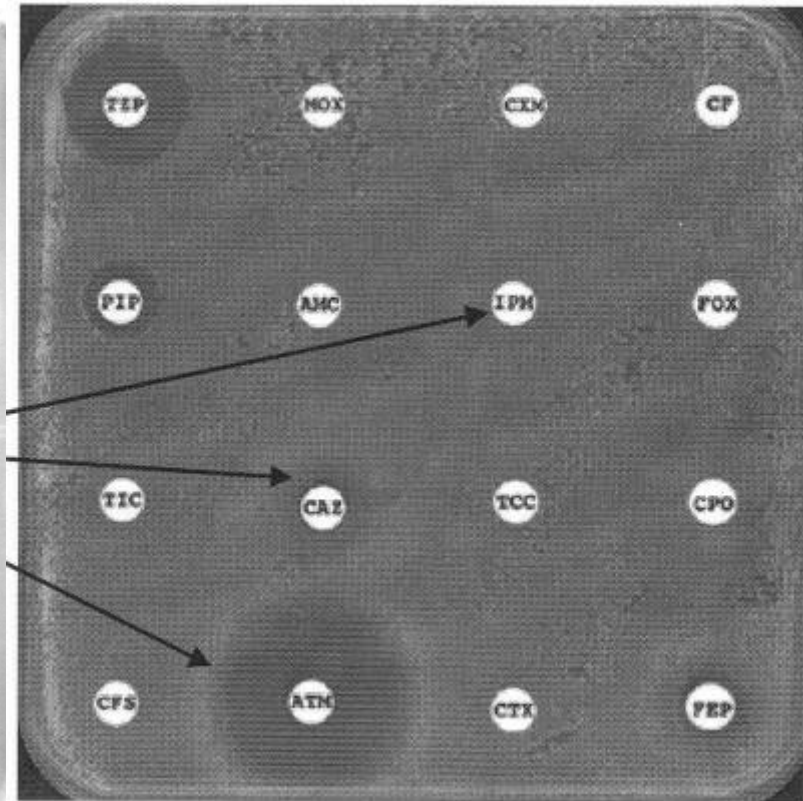
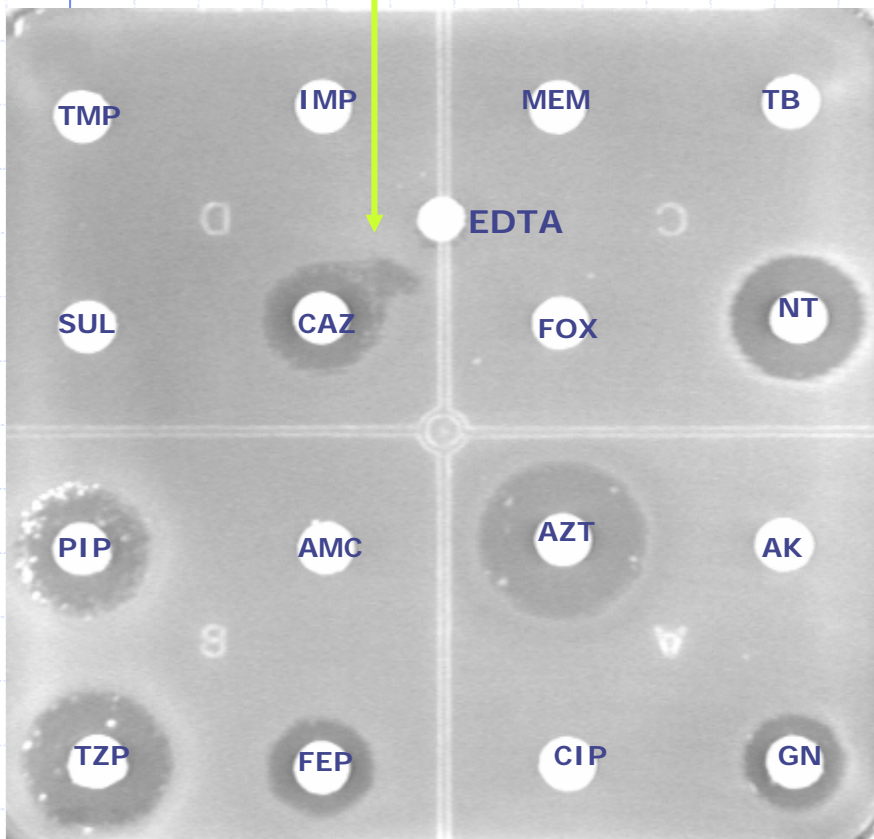
P. aeruginosa με παραγωγή MBL
Χαρακτηριστική η μεγάλη ζώνη ευαισθησίας
στην ΑΖΤΡΕΟΝΑΜΗ



P. aeruginosa

Παραγωγή μεταλλοενζύμου (VIM)

EDTA-Disk synergy test



Ανίχνευση καρβαπενεμασών τάξης Β με EDTA – disk synergy test

- Ενοφθαλμισμός των IMP^R στελεχών σε ΜΗ
- Τοποθέτηση δίσκων IMP(10μg) και EDTA (500mM-10μL) σε απόσταση 15-20mm
- Επώαση 18h και Ερμηνεία

Lee K. et al, CMI (2001), 7,88-102

