

Wykrywanie mechanizmów oporności u ziarenkowców Gram-dodatnich

Schematy diagnostyczne

Dorota Żabicka

Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD)

Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej NIL

Wersja 1.0

Warszawa 01.12.2020



Spis treści:

1. Oznaczanie wrażliwości na antybiotyki β -laktamowe u *Streptococcus pneumoniae*
2. Wykrywanie i interpretacja mechanizmu oporności MLS_B u ziarenkowców Gram-dodatnich
3. Oznaczanie oporności na metycylinę u *Staphylococcus* spp.
4. Oznaczanie wrażliwości na glikopeptydy u *Staphylococcus* spp.
5. Testy przesiewowe wykrywające mechanizm obniżonej wrażliwości *Staphylococcus aureus* na glikopeptydy (GISA, hGISA)
6. Oznaczanie wrażliwości na glikopeptydy u *Enterococcus* spp.
7. Wykrywanie oporności wysokiego stopnia na aminoglikozydy u *Enterococcus* spp.

Oznaczanie wrażliwości na antybiotyki β -laktamowe u *Streptococcus pneumoniae*

Metoda dyfuzyjno-krążkowa, Mueller-Hinton agar + 5% odwiókniona krew końska i 20 mg/L β -NAD (MH-F) zawiesina 0,5 McFarlanda z podłoża agar z 5% krwią lub 1 McFarlanda z podłoża czekoladowego, inkubacja $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, z 5% CO_2 , 18 ± 2 godz.

Średnica strefy zahamowania wzrostu

krążek z oksacyliną 1 μg

≥ 20 mm

< 20 mm

Wrażliwy na antybiotyki β -laktamowe; cefaklor WZE

Interpretacja zależna od leku patrz tabela
Oznaczyć MIC penicyliny i innych leków

Oznaczanie MIC

Wartość MIC

penicylina benzylowa

$\leq 0,06$ mg/L

0,06 – 2 mg/L

$> 2,0$ mg/L

Wrażliwy na antybiotyki β -laktamowe

Interpretacja zależna od lokalizacji zakażenia (ZOMR, inne) i dawki leku

Oporny

Szczep kontrolny

	Mechanizm oporności
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Penicylina WZE

Postępowanie w przypadku uzyskania w metodzie dyfuzyjno-krążkowej z krążkiem z oksacyliną 1 μg wyniku: średnica strefy < 20 mm

Antybiotyki	Dodatkowe badania i/lub interpretacja	
Penicylina benzylowa (zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych) i fenoksymetylopenicylina (wszystkie postaci kliniczne zakażenia)	Raportować „oporny”. Dla izolatów z ZOMR należy ZAWSZE oznaczyć MIC penicyliny	
Penicylina benzylowa (wszystkie zakażenia z wyjątkiem zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych)	Oznaczyć MIC i wynik interpretować zgodnie z klinicznymi wartościami granicznymi	
Ampicylina, amoksycylina, cefepim, cefotaksym, ceftriakson i ceftarolina	Średnica zahamowania wzrostu wokół krążka z oksacyliną ≥ 8 mm	Raportować „wrażliwy”. <u>W ZOMR oznaczać MIC leku planowanego do terapii</u>
	Średnica zahamowania wzrostu wokół krążka z oksacyliną < 8 mm	Oznaczyć MIC antybiotyku beta-laktamowego planowanego do terapii i interpretować zgodnie z wartościami granicznymi.

UWAGA!

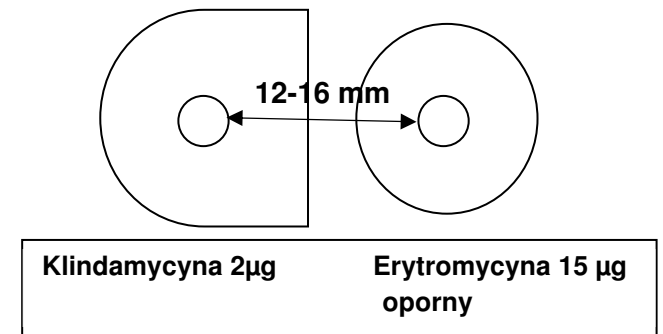
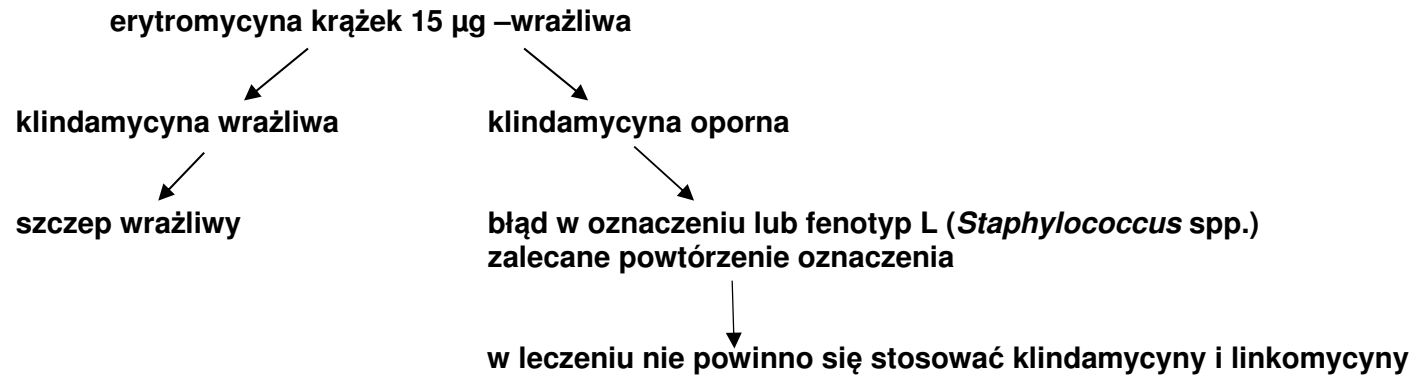
Dla izolatów z ZOMR zawsze oznaczać MIC penicyliny, cefotaksymu lub ceftriaksonu, a także meropenemu, wankomycyny, rifampicyny i chloramfenikolu

Wykrywanie i interpretacja mechanizmu oporności MLS_B u ziarenkowców Gram-dodatnich

Wykrywanie antagonizmu klindamycyny i antybiotyku z grupy makrolidów (mechanizm indukcyjny)

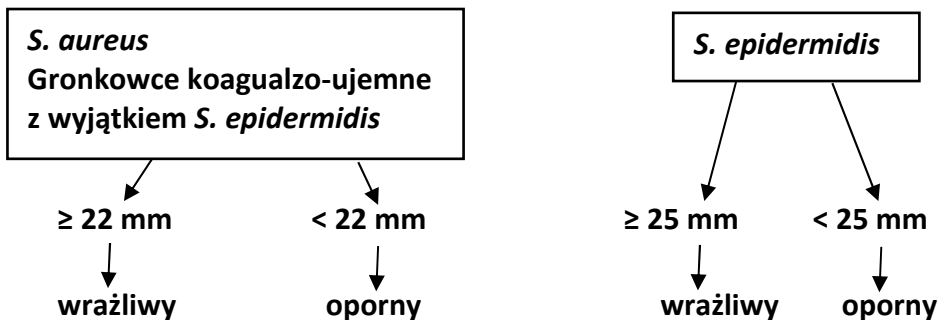
Staphylococcus spp. krążki z klindamycyną 2 µg i erytromycyną 15 µg w odległości 12-20 mm (od krawędzi do krawędzi krążków)

Streptococcus spp. krążki z klindamycyną 2 µg i erytromycyną 15 µg w odległości 12-16 mm (od krawędzi do krawędzi krążków)



Oznaczanie oporności na metycylinę u *Staphylococcus* spp.

Badanie przesiewowe z użyciem krążka z cefoksytiną 30 µg Metoda dyfuzyjno-krążkowa, podłoże Mueller-Hinton agar, zawiesina 0,5 McFarlanda, inkubacja 35°C ± 1°C, O₂, 18 ± 2 godz.



Krążek z oksacyliną 1 µg

S. pseudintermedius i *S. schleiferi*: wrażliwy ≥20 mm, oporny <20 mm

Szczepy kontrolne

	Mechanizm oporności
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Wrażliwy na metycylinę
<i>S.aureus</i> NCTC 12493	Oporny na metycylinę (<i>mecA</i>)
<i>S.aureus</i> NCTC 13552	Oporny na metycylinę (<i>mecC</i>)

Interpretacja w przypadku różnicy wyników dla oksacyliny i cefoksyliny

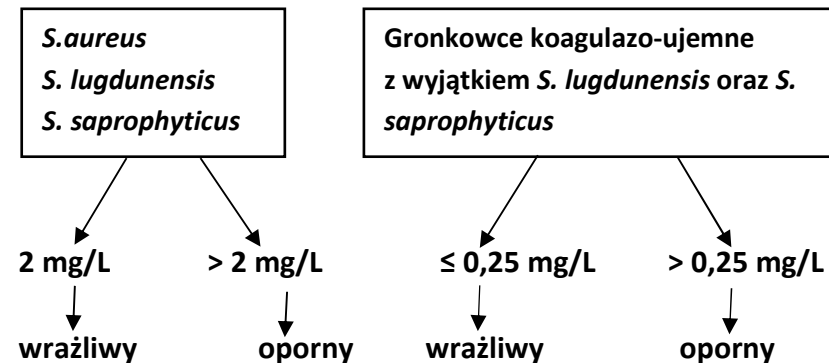
	Cefoksytyna - MIC lub metoda dyfuzyjno-krążkowa	
	wrażliwy	oporny
Oksacylina MIC oporny	Raportować oksacylina „oporny”	Raportować oksacylina „oporny”
Oksacylina MIC wrażliwy	Raportować oksacylina „wrażliwy”	Raportować oksacylina „oporny”

Testy potwierdzenia dla *S.aureus*:

1. Potwierdzenie obecności genu *mecA* lub *mecC* metodą PCR z odpowiednimi starterami
2. Potwierdzenie obecności białka PBP2a metodą aglutynacji lateksowej (genotyp *mecA*)

Oznaczanie MIC oksacyliny lub cefoksyliny

Wartość MIC oksacyliny

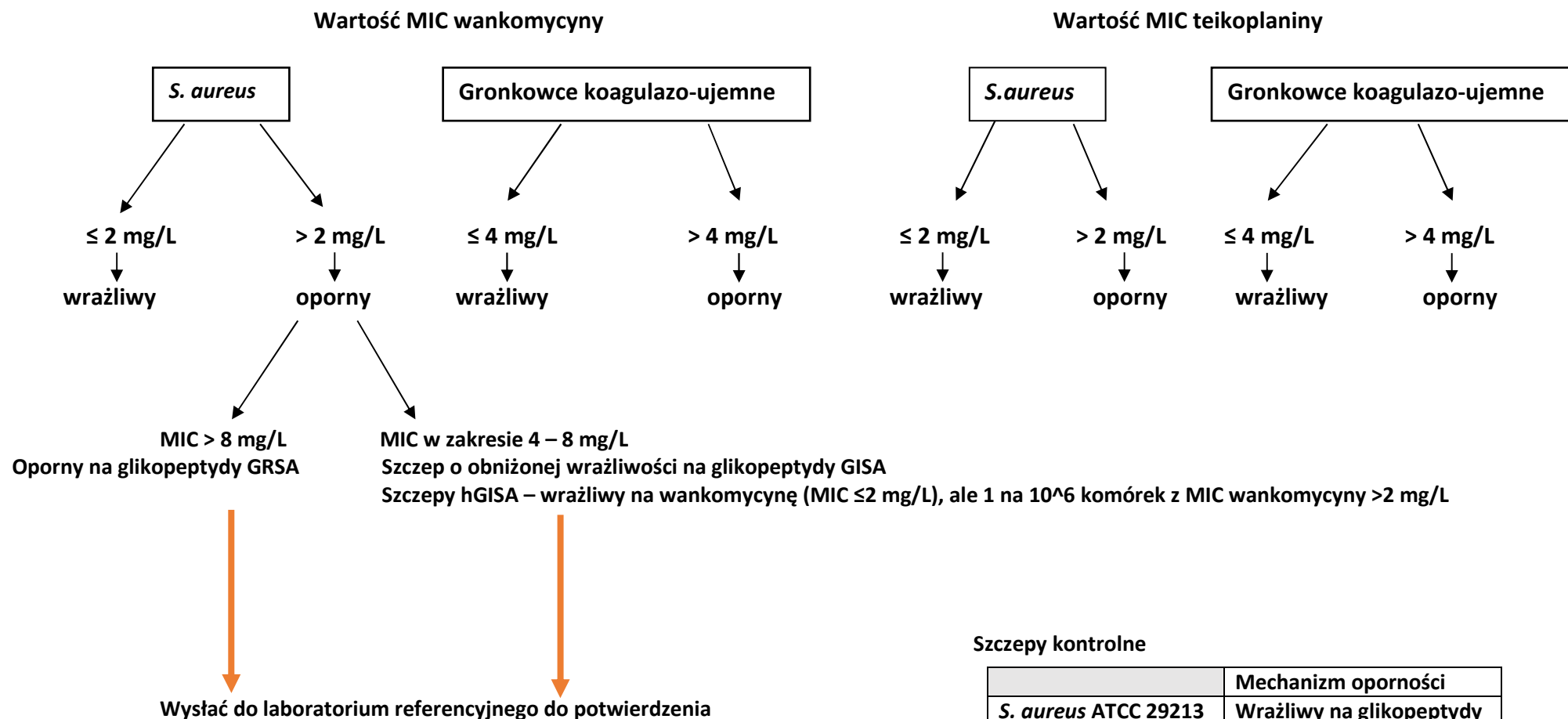


Wartość MIC cefoksyliny

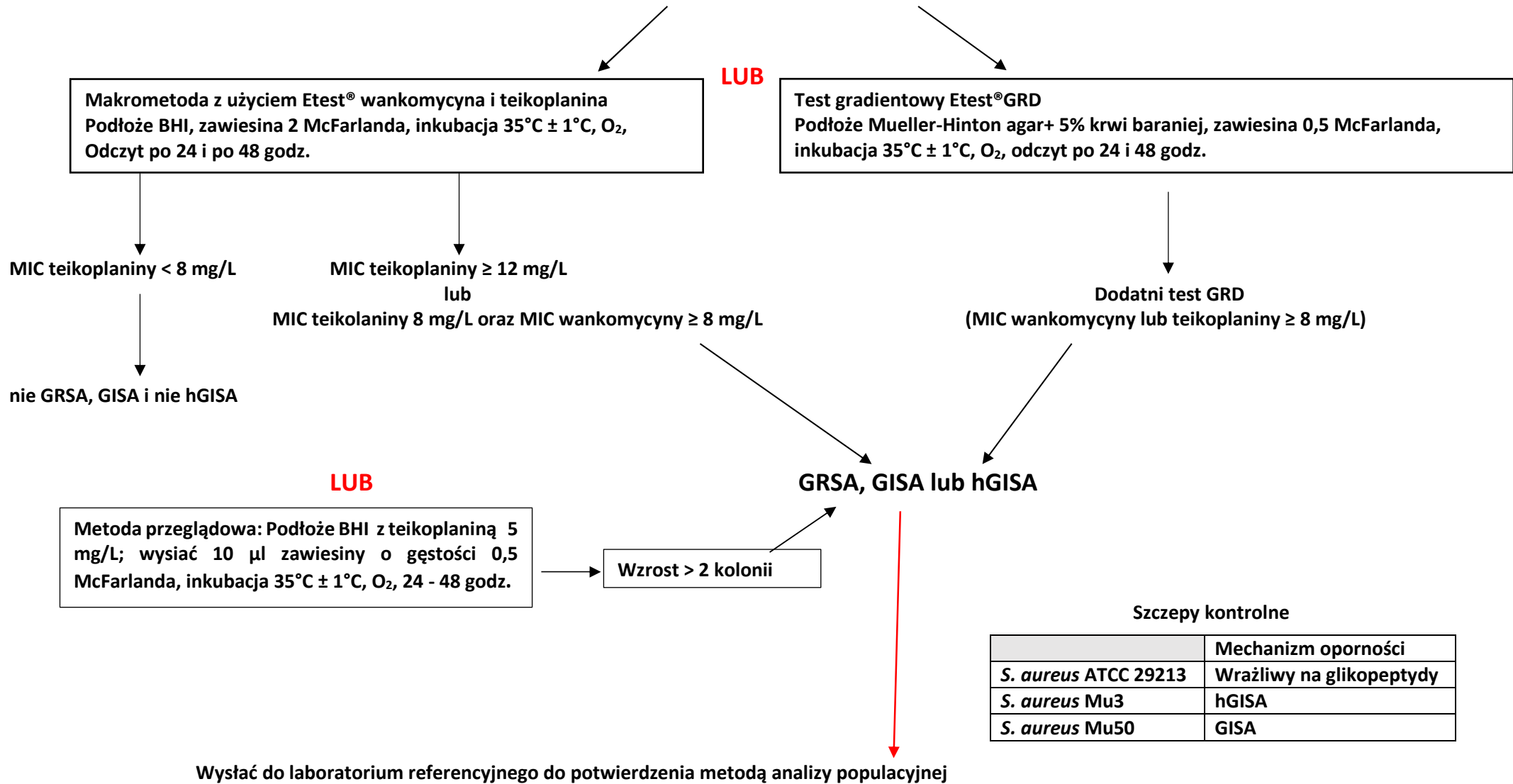
Gatunek	Cefoksytyna MIC mg/L	Interpretacja
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 4	oporny
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	> 4	oporny
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	> 8	oporny
Gronkowce koagualzo-ujemne	MIC cefoksyliny nie jest dobrym wskaźnikiem oporności na metycylinę	
<i>S. pseudintermedius</i>		
<i>S. schleiferi</i>		

Oznaczanie wrażliwości na glikopeptydy u *Staphylococcus* spp.

Oznaczanie MIC glikopeptydów



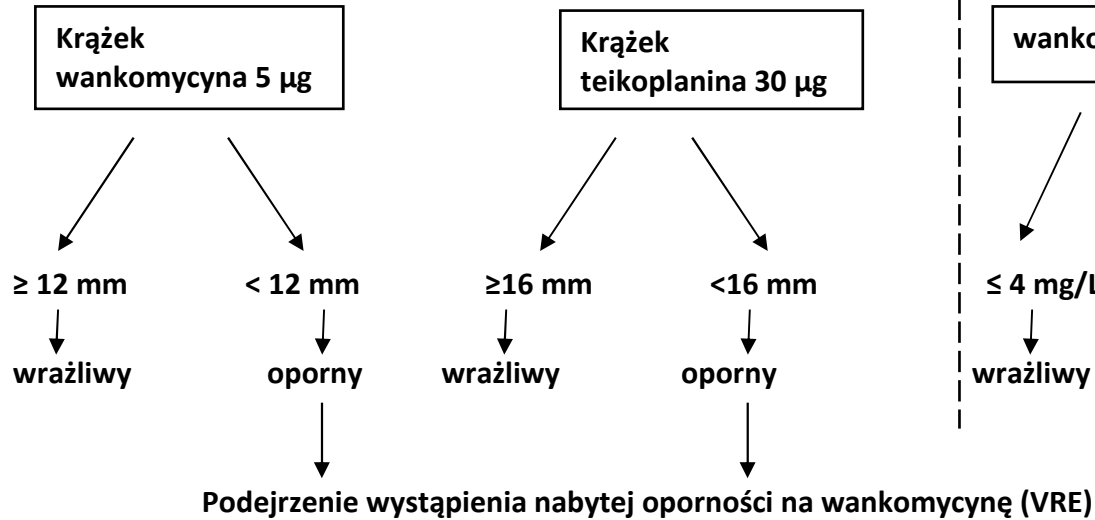
Testy przesiewowe wykrywające mechanizm obniżonej wrażliwości *Staphylococcus aureus* na glikopeptydy (GISA, hGISA)



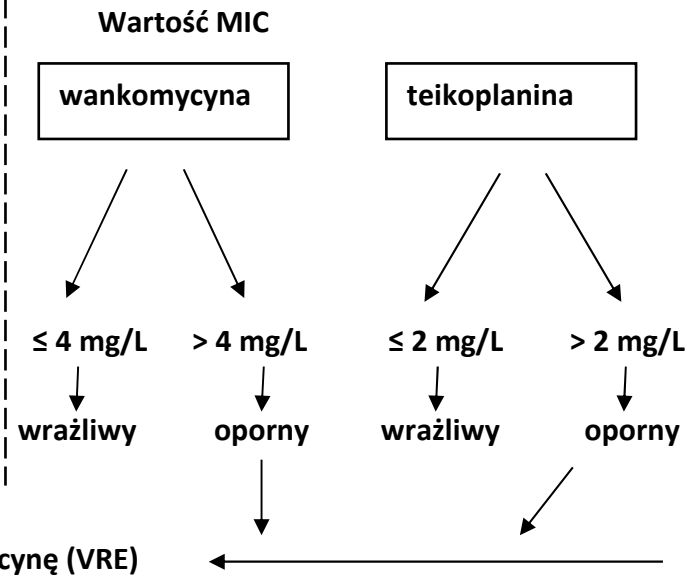
Oznaczanie wrażliwości na glikopeptydy u *Enterococcus* spp.

Metoda dyfuzyjno-krażkowa, podłoże Mueller-Hinton agar, zawiesina 0,5 McFarlanda, inkubacja 35°C ± 1°C, O₂, 24 godz.

Średnica strefy zahamowania wzrostu



Oznaczanie MIC



Metoda przeglądowa

Posiew na podłoże z antybiotykiem np.:
podłoże BHI z wankomycyną 6 mg/L lub podłoże chromogenne
Postępować zgodnie z zaleceniami producenta.

Wzrost > 1 kolonia
Test dodatni

Wartości MIC dla szczepów o fenotypie VanA i VanB

Antybiotyk	Wartości MIC	
	VanA	VanB
wankomycyna	64 – 1024 mg/L	4 – 1024 mg/L
teikoplanina	8 – 512 mg/L	0,06 – 1 mg/L

Testy potwierdzenia nabytej oporności na wankomycynę u enterokoków (VRE): potwierdzenie obecności genów *vanA* i *vanB* metodą PCR z odpowiednimi starterami

Naturalna oporność niskiego stopnia na wankomycynę VanC:

1. *Enterococcus gallinarum* i *Enterococcus casseliflavus*
2. Wartości MIC wankomycyny w zakresie 4-16 mg/L
3. Potwierdzenie obecności genu *vanC* metodą PCR z odpowiednimi starterami

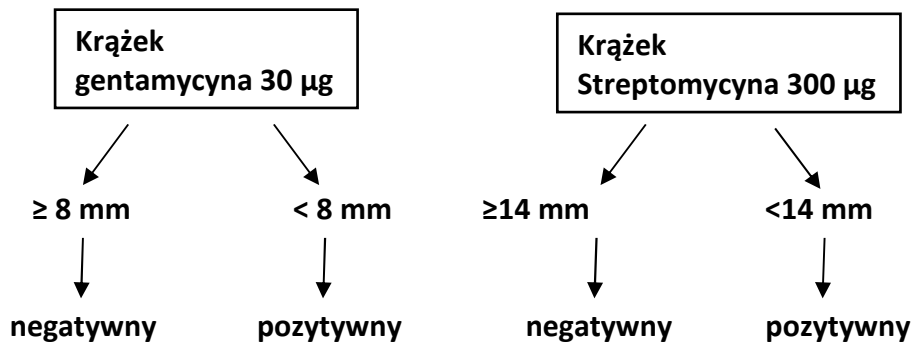
Szczepy kontrolne

	Mechanizm oporności
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Wrażliwy na wankomycynę
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	Oporny na wankomycynę (<i>vanB</i>)

Wykrywanie oporności wysokiego stopnia na aminoglikozydy u *Enterococcus* spp.

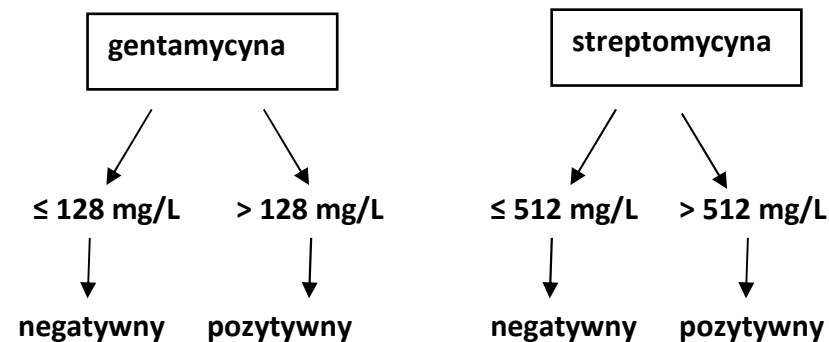
Metoda dyfuzyjno-krążkowa, podłoże Mueller-Hinton agar, zawiesina 0,5 McFarlanda, inkubacja 35°C ± 1°C, O₂, 18 ± 2 godz.

Średnica strefy zahamowania wzrostu



Oznaczanie MIC

Wartość MIC



Interpretacja wyników oznaczania oporności wysokiego stopnia na aminoglikozydy u *Enterococcus* spp.

Aminoglikozyd	Wynik testu	
	NEGATYWNY	POZYTYWNY
gentamycyna	Izolaty o wartości MIC gentamycyny ≤128 mg/L lub strefie zahamowania wzrostu wokół krążka ≥8 mm. Są to izolaty typu dzikiego, o naturalnej oporności niskiego stopnia na gentamycynę. W odniesieniu do innych aminoglikozydów może to nie być izolat typu dzikiego, o naturalnej oporności niskiego stopnia. Należy oczekiwać synergizmu z penicylinami lub glikopeptydami, jeśli izolaty są wrażliwe na te leki.	Szczep posiada nabyte mechanizmy oporności wysokiego stopnia na aminoglikozydy, z wyjątkiem streptomycyny, dla której należy wykonać osobne oznaczenie. Nie występuje synergizm działania z penicylinami lub glikopeptydami
streptomycyna	Izolaty typu dzikiego o naturalnej oporności niskiego stopnia na streptomycynę. Należy oczekiwać synergizmu z penicylinami lub glikopeptydami, jeśli szczep jest wrażliwy na te leki.	Szczep posiada nabyte mechanizmy oporności wysokiego stopnia na streptomycynę. Nie występuje synergizm działania z penicylinami lub glikopeptydami

Szczepy kontrolne

	Mechanizm oporności
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Naturalna oporność niskiego stopnia
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	Oporność wysokiego stopnia