

Wykrywanie mechanizmów oporności u ziarenkowców Gram-dodatnich

Schematy diagnostyczne

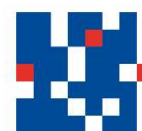
Dorota Żabicka

Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD)

Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej NIL

Wersja 2.0

Warszawa 1 grudnia 2023



Krajowy Ośrodek Referencyjny
ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów

KORLD

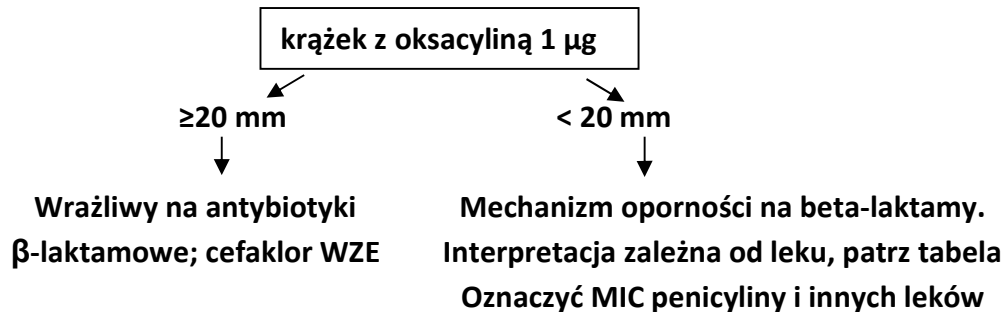
Spis treści:

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) zawieszona 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



Oznaczanie MIC

Szczep kontrolny

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

Wartość MIC

penicylina benzylowa

$\leq 0,06$ mg/L

$> 0,06 - 2$ mg/L

$> 2,0$ mg/L

Wrażliwy na antybiotyki β -laktamowe; cefaklor WZE

Mechanizm oporności na beta-laktamy. Interpretacja zależna od lokalizacji zakażenia (ZOMR, inne) i dawki leku

Oporny

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 zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (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, piperacylina (same oraz w połączeniu z inhibitorem beta-laktamaz), cefepim, cefotaksym, ceftarolina, ceftobiprol, ceftriakson, imipenem i meropenem	Średnica zahamowania wzrostu wokół krążka z oksacyliną 9-19 mm	Raportować „wrażliwy”. Zalecenie obowiązuje również dla wartości granicznych w ZOMR. <u>W ZOMR oznaczać MIC leku planowanego do terapii</u>
	Średnica zahamowania wzrostu wokół krążka z oksacyliną < 9 mm	Oznaczyć MIC antybiotyku beta-laktamowego planowanego do terapii i interpretować zgodnie z wartościami granicznymi. Zalecenie obowiązuje również dla wartości granicznych w ZOMR.

UWAGA!

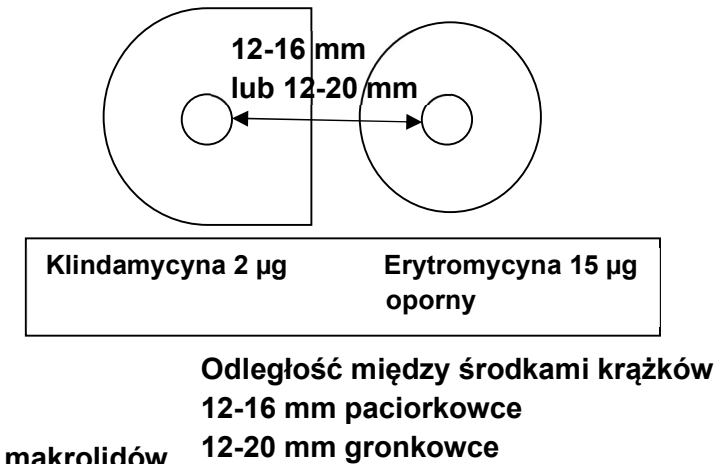
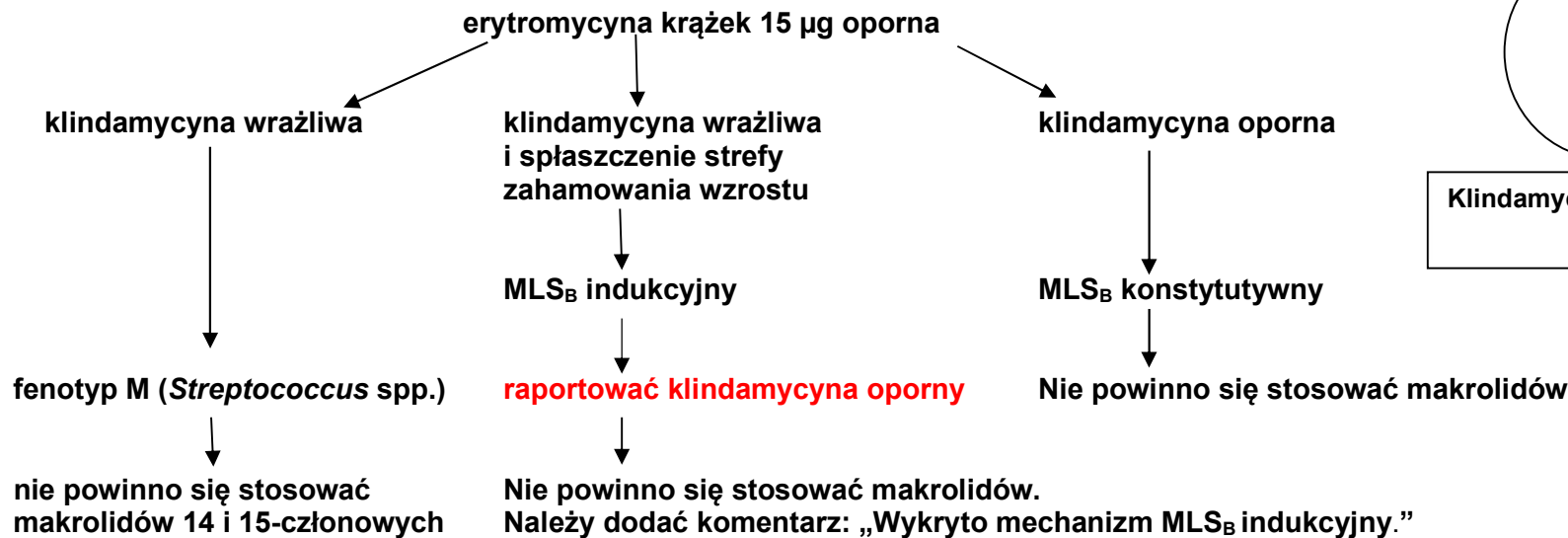
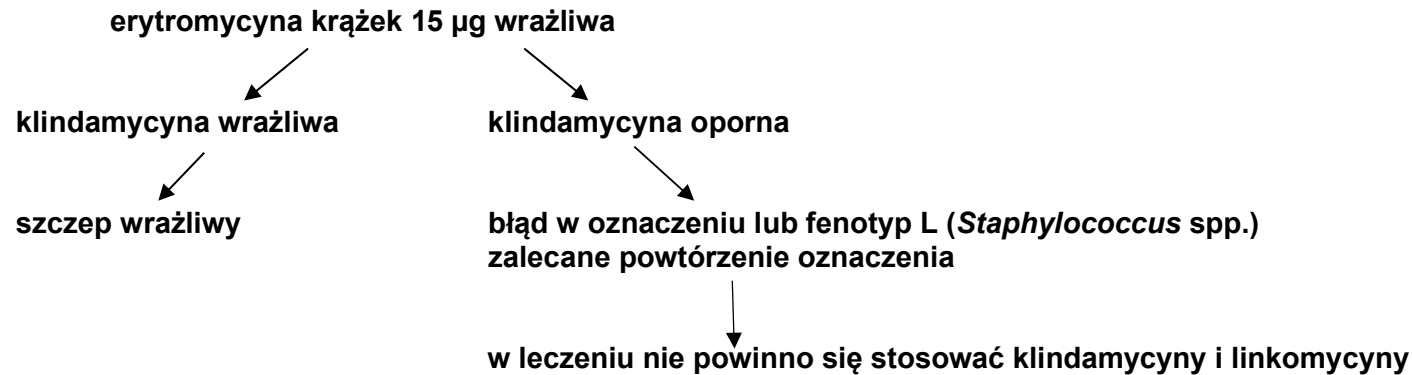
Dla izolatów z ZOMR zawsze oznaczać MIC penicyliny, cefotaksymu lub ceftriaksonu, a także meropenemu, wankomycyny, rifampicyny i chloramfenikolu

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)

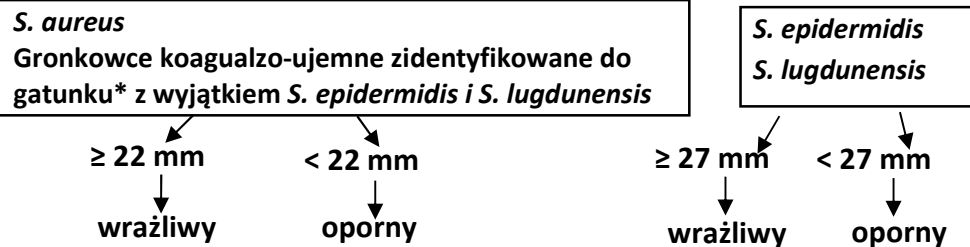
Streptococcus spp. krążki z klindamycyną 2 µg i erytromycyną 15 µg w odległości 12-16 mm (od krawędzi do krawędzi krążków)



Oznaczanie oporności na metycylinę u *Staphylococcus* spp.

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

Badanie przesiewowe z użyciem krążka z cefoksytiną 30 µg:



*Gronkowce koagulazo-ujemne nie zidentyfikowane do gatunku W ≤ 25 mm O > 25 mm

Badanie przesiewowe z użyciem krążka z oksacyliną 1 µg:

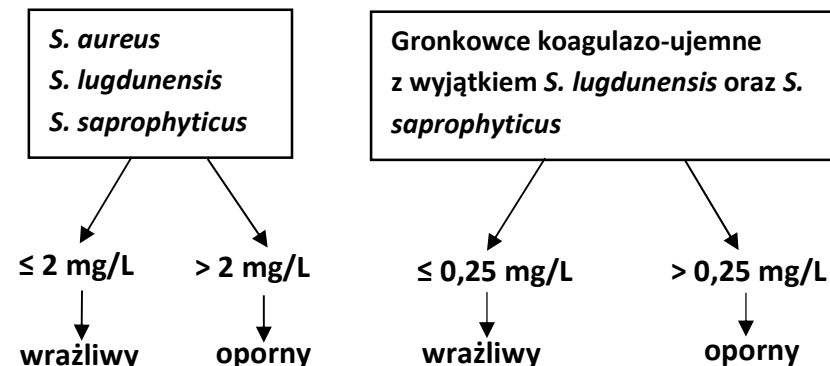
S. pseudintermedius, *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. coagulans*



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>)

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 koagulazo-ujemne		MIC cefoksyliny nie jest dobrym wskaźnikiem oporności na metycylinę
<i>S. pseudintermedius</i>		
<i>S. schleiferi</i>		
<i>S. coagulans</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*:

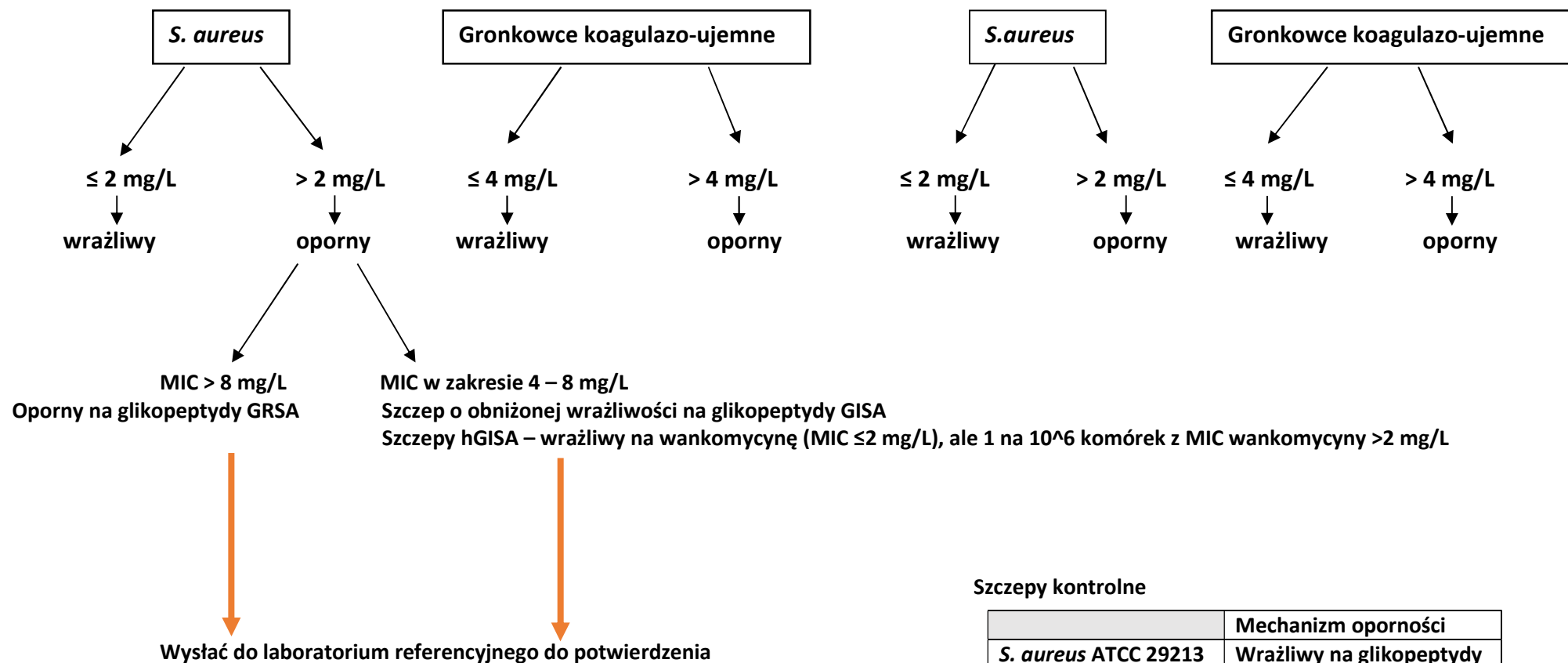
- Potwierdzenie obecności genu *mecA* lub *mecC* metodą PCR z odpowiednimi starterami
- Potwierdzenie obecności białka PBP2a metodą aglutynacji lateksowej (genotyp *mecA*)

Oznaczanie wrażliwości na glikopeptydy u *Staphylococcus* spp.

Oznaczanie MIC glikopeptydów

Wartość MIC wankomycyny

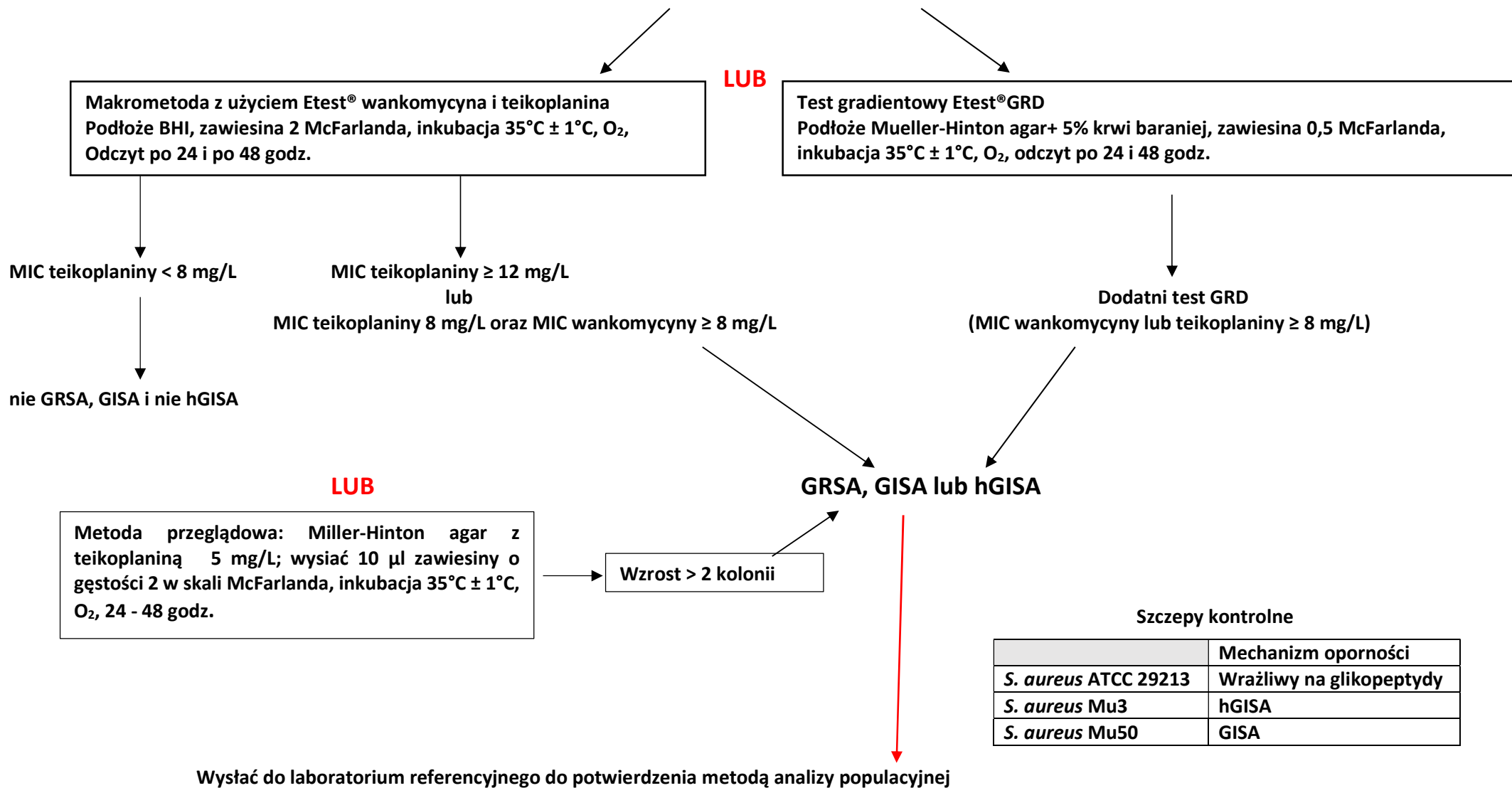
Wartość MIC teikoplaniny



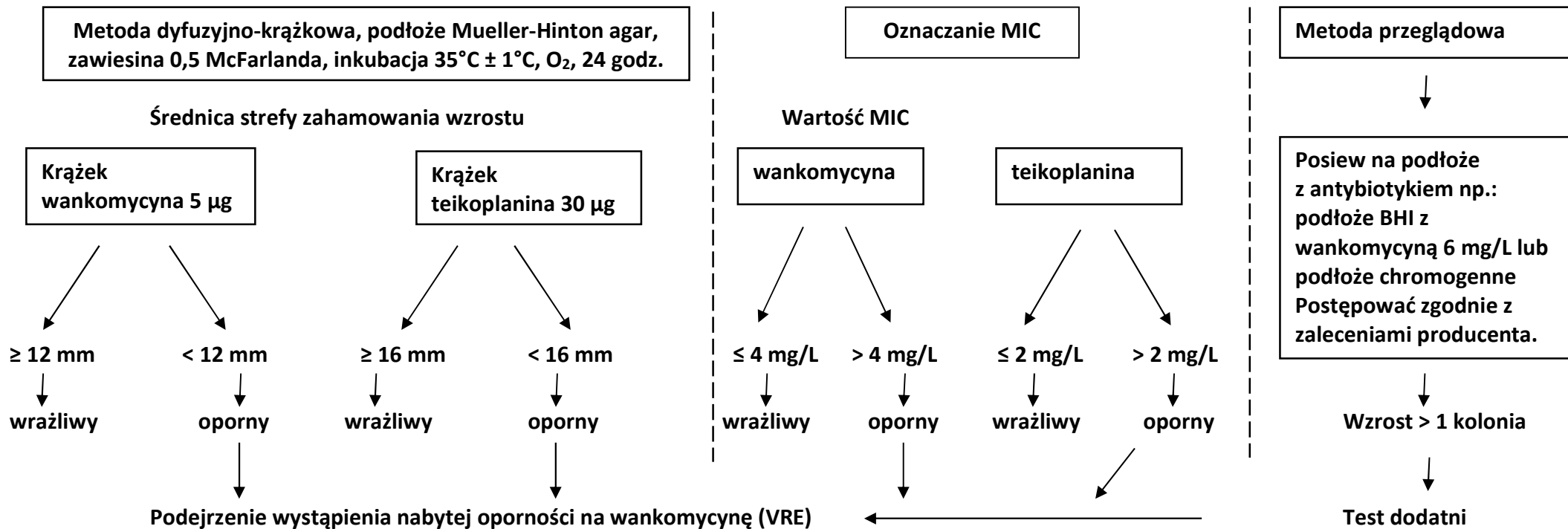
Szcepy kontrolne

	Mechanizm oporności
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Wrażliwy na glikopeptydy
<i>S. aureus</i> Mu3	hGISA
<i>S. aureus</i> Mu50	GISA

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



Oznaczanie wrażliwości na glikopeptydy u *Enterococcus* spp. z gatunków innych niż *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*



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

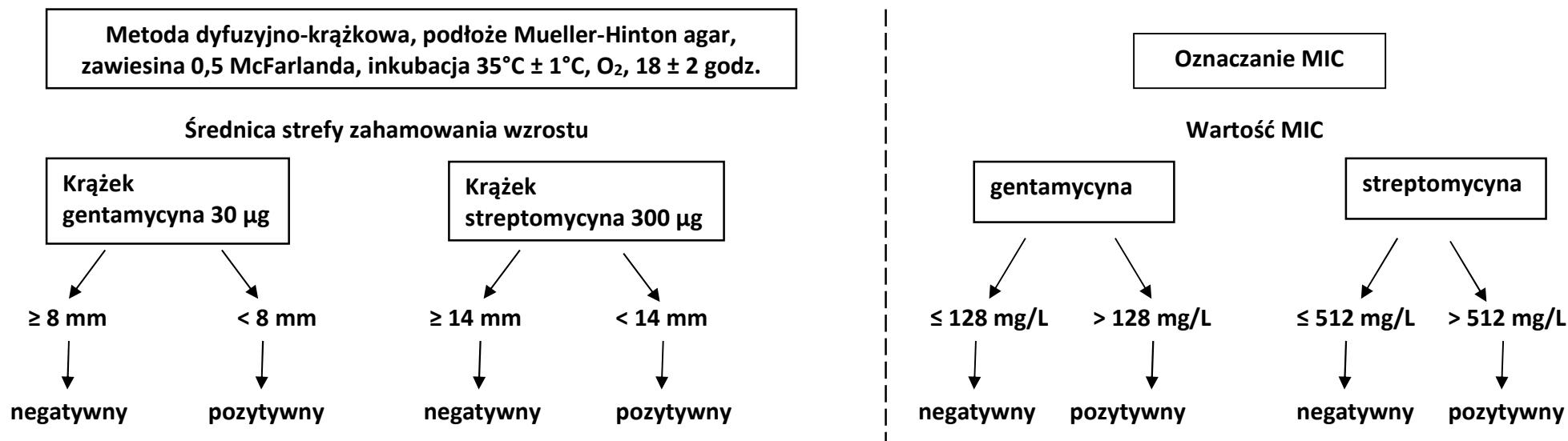
Wartości MIC dla szczepów o fenotypie VanA i VanB

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

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.



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 mogą to nie być izolaty typu dzikiego, o naturalnej oporności niskiego stopnia. Należy oczekiwać synergizmu z penicylinami lub glikopeptydami, jeśli izolaty są wrażliwe na te leki.	Izolat 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 izolaty są wrażliwe na te leki.	Izolot 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 na gentamycynę i streptomycynę