

# Оценка хромогенной среды при выявлении энтеробактерий, продуцирующих бета-лактамазу широкого спектра действия (ESBL)

Philippe Lagace-Wiens, Franil Tailor, Patricia Baudry-Simner, George G Zhanel, Daryl J. Hoban

Кафедра Микробиологии и Инфекционных Заболеваний, Медицинский факультет, Университет Манитобы, Манитоба, Канада

Диагностический центр Манитобы, Манитоба, Канада

## Изложение

### Цели

Во всем мире все больше внимания уделяется микроорганизмам, вырабатывающим ESBL, в аспекте контроля инфекционных заболеваний. Сложность разработки простых и специфичных методов скрининга *Escherichia coli* и *Klebsiella sp*, продуцирующих ESBL, заключается в том, что резистентность к цефалоспорином у энтеробактерий может быть опосредована другими механизмами. Цель настоящего исследования – оценить эффективность различных хромогенных сред при скрининге ESBL-продуцирующих бактерий, с использованием обширной базы цефалоспорино-резистентных *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, с наличием генетических характеристик.

### Методы

Изоляты получены из 12 медицинских центров на территории Канады. Изучено 213 образцов *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* с резистентностью к цефалоспорином, опосредованной ESBL либо AmpC. Скрининг *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* проводился с использованием цефтазидима и/или цефтриаксона, MIC  $\geq 1$  мкг/мл, гены ESBL (CTX-M, SHV, TEM, OXA), нарушения промоции/аттенуации AmpC и наличие приобретенных генов AmpC типа (ACT-1/MIR-1 – связанные, ДНА-связанные, FOX-связанные, CMY2-связанные) определялись при помощи ПЦР; при необходимости проводилось секвенирование. Микроорганизмы (150 КОЕ) инокулировались в среду Colorex ESBL (CHROMagar, France). Учитывалось количество колоний и их цвет.

### Результаты

Изучено 114 ESBL – *E. coli* (по 1 - CTX-M-1,9,24 и 65; 2 CTX-M-2; 24 CTX-M-14; 77 CTX-M-15; 4 CTX-M-27; 3SHV-2a), 91 AmpC-*E. coli* (46CMY-2 и 45 мутантных по промотору/аттенуатору), 8 ко-экспрессоров ESBL и AmpC *E. coli* (4 CTX-M-15, 2CTX-M-14, по 1 CTX-M-3 и TEM-12, все - мутантны по промотору/аттенуатору), 14 ESBL-*K. pneumoniae* (ко-экспрессия CTX-M и SHV-тип ESBL) и 50 *E. coli* дикого типа. У 2.5% *E. coli* отмечались атипичные хромогенные реакции – колонии не приобретали цвета. У всех *K. pneumoniae* отмечалась типичная хромогенная реакция. У 9/10 микроорганизмов с гиперпродукцией AmpC количество колоний на среду превышало 100; у 7/10 механизм резистентности к цефалоспорином был обусловлен геном CMY-2. 1 изолят ESBL-*E. coli* ингибировался средой. Данный изолят экспрессировал ген TEM-12, MIC цефтриаксона для него – 0.12 мкг/мл, MIC цефтазидима – 8 мкг/мл.

### Выводы

Для *E. coli* с MIC для цефтриаксона/цефтазидима  $\geq 1$  мкг/мл чувствительность в отношении ESBL-продуцирующих микроорганизмов составляет 99.2%, специфичность – 89.0%. Чувствительность в отношении *K. pneumoniae* – 100%, при небольшом числе изолятов. Использование среды позволит ускорить скрининг ESBL-продуцирующих бактерий, особенно в областях с относительно небольшим их числом (по сравнению с микроорганизмами, продуцирующими цефалоспориномазу AmpC либо прочие цефалоспориномазы класса C)

### Благодарности

Благодарим техников и микробиологов из всех центров CANICU/CANWARD за вклад в исследования CANICU/CANWARD проводившиеся в 2007 – 2009 гг.

### Введение

Отмечается нарастание антибиотикорезистентности *Escherichia coli*. Во всем мире, в госпитальном и коммунальном секторах все шире распространяются изоляты, способные к образованию бета-лактамаз широкого спектра действия

(ESBL) (1). По данным национальной программы наблюдения, проведенной в Канаде, резистентность к цефтриаксону у изолятов, выделенных в отделениях интенсивной терапии выросла с 3.7% согласно исследованию ICU, Канада в 2006г., до 8%, согласно исследованию CANWARD 2008 г. ( $p = 0.043$ ) (2). Результаты нашего исследования изолятов *E.coli* со сниженной чувствительностью к цефалоспорином третьего поколения, свидетельствуют, что примерно половина из них вырабатывают ESBL, вторая половина вырабатывает AmpC (2). Имеется ряд материалов, свидетельствующих в пользу проведения скрининга пациентов на носительство микроорганизмов, вырабатывающих ESBL в целях контактной изоляции колонизированных пациентов при госпитализации. Компания CHROMagar (Париж, Франция) разработала селективную/дифференциальную среду для скрининга ESBL-продуцирующих бактерий (на рынке Северной Америки продукт представлен под названием Colorex ESBL). Среда селективна в отношении бактерий, продуцирующих ESBL, и позволяет дифференцировать различные виды энтеробактерий. В условиях лечебных учреждений, где необходим скрининг ESBL, применение этой среды позволит уменьшить нагрузку, связанную с мероприятиями по дифференциации ESBL-продуцирующих бактерий от прочих микроорганизмов, резистентных к цефалоспоринолу. Цель исследования – определить особенности роста колоний ESBL-продуцирующих *E.coli* и *K.pneumoniae* с установленным генотипом ESBL (SHV, TEM, CTX-M), а также AmpC- продуцирующих *E.coli* (получены из канадских клиник), на среде Colorex ESBL.

## **Материалы и методы**

### **Изоляты бактерий**

Изоляты были получены в ходе текущего исследования CANWARD (сегменты 2007 – 2008 годов) (2) ([www.can.gc.ca](http://www.can.gc.ca)) и исследования CANICU (2006) на базе 12 медицинских центров в 7 из 10 провинций Канады. Изучено 213 изолятов *E.coli* и 14 изолятов *K.pneumoniae*, резистентных как минимум к одному цефалоспоринолу третьего поколения, а также 50 клинических изолятов дикого типа (фенотипической резистентности к цефалоспоринолу не выявлено). Скрининг ESBL/AmpC продуцирующих *E.coli* и *K.pneumoniae* проводился с использованием цефтазидима и/или цефтриаксона при MIC  $\geq 1$  мкг/мл. Для определения генов ESBL (CTX-M, SHV, TEM, OXA) использовалась ПЦР, для определения генотипов ESBL – секвенирование продуктов; для определения полиморфизма, обуславливающего экспрессию AmpC у *E.coli* использовалась ПЦР и секвенирование AmpC и участков промотора/аттенуатора (2). Кроме того, ПЦР проводилась в случае известной приобретенной резистентности AmpC (EBC(ACT-1/MIR-1-связанные гены), DNA (DNA-92-связанные гены), FOX-93 (FOX-связанные гены), CIT (CMY-2-связанные гены)) (2).

### **Культивирование**

Проводилась инокуляция микроорганизмов, задействованных в каждом исследовании, в среду Colorex ESBL. На 1 среду инокулировалось около 150 КОЕ каждого из протестированных микроорганизмов (с использованием турбидометрии и волюметрических петель). Инкубация сред проводилась в течение 18-24 часов, при температуре 35°C, в темном месте. Учитывались характеристики роста колоний – в том числе их цвет и количество, были сделаны фотографии.

### **Результаты**

Единственный изолят ESBL, на который среда оказывала ингибирующее воздействие, был носителем TEM-12 – для данной  $\beta$ -лактамазы характерен слабый гидролиз цефтриаксона и мощный гидролиз цефтазидима (3). Изолят содержал MIC цефтриаксона – 0.12 мкг/мл, MIC цефтазидима – 8 мкг/мл, MIC цефепима – 0.5 мкг/мл.

9 из 10 (90%) AmpC – продуцирующих *E.coli* показали хороший рост на среде ( $>50$  колоний). В 70% (7/10) механизм продукции AmpC был обусловлен наличием гена CMY-2; в 3 из 10 случаев в его основе лежало изменение промотора, что вело к выработке AmpC. Во всех случаях, SHV, TEM, CTX-M  $\beta$ -лактамаз активных в отношении цефалоспоринолу третьего поколения выявлено не было. Тем не менее, не-ESBL  $\beta$ -лактамазы (TEM-1) были выявлены в 4 из 10 штаммов.

**Таблица 1**

Характеристики роста *E.coli* и *K.pneumoniae* на среде Colorex ESBL. Во всех случаях на среду высевалось около 150 КОЕ каждого протестированного микроорганизма

Механизм резистентности (организм) (n)	Рост любой	>100 колоний (%)	50-100 колоний (%)	1- 50 колоний (%)	Роста нет
ESBL ( <i>E.coli</i> ) (114)	114(100)	111 (97.4)	3 (2.6)	0(0)	0(0)
ESBL <i>K.pneumoniae</i>	14(100)	14(100)	0(0)	0(0)	0(0)
AmpC ( <i>E.coli</i> ) (91)	10 (11.0)	8(8.8)	1(1.1)	1 (1.1)	81 (89.0)
ESBL + AmpC ( <i>E.coli</i> ) (8)	7 (87.5)	7 (87.5)	0(0)	0(0)	1 (12.5)
Дикий тип ( <i>E.coli</i> ) (50)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	50(100)

**Таблица 2**

В-лактамазы типа ESBL обнаруженные у *E.coli* при ПЦР и секвенировании *blaSHV*, TEM, CTX-M; у 54 *E.coli* (44.3%) имелся TEM-1, у 47 (38.5%) – OXA-1

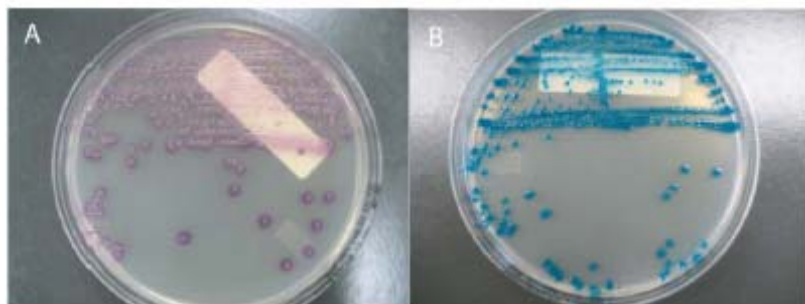
В-лактамазы	Количество протестированных <i>E.coli</i> (%)
CTX-M-1	1 (0.8)
CTX-M-2	2(1.6)
CTX-M-9	1 (0.8)
CTX-M-14	24 (17.7)
CTX-M-15	77 (63.1)
CTX-M-24	1 (0.8)
CTX-M-27	4(3.3)
CTX-M-65	1 (0.8)
SHV-2a	3(2.5)
AmpC + CTX-M-3	1 (0.8)
AmpC + TEM-12	1 (0.8)
AmpC + CTX-M-14	2 (0.8)
AmpC + CTX-M-15	4 (0.8)

**Таблица 3**

В-лактамазы типа ESBL обнаруженные у *K.pneumoniae* при ПЦР и секвенировании blaSHV, TEM, CTX-M;

у 9 (64.3%) имелся TEM-1, у 1 (7.1%) – SHV-1, у 6 (42.9%) – OXA-1

В-лактамазы	Количество протестированных <i>K.pneumoniae</i> (%)
CTX-M-15 + SHV-11	4 (28.6)
CTX-M-15	1 (7.1)
CTX-M-14 + SHV-11	1 (7.1)
CTX-M-2a	3 (21.4)
CTX-M-15	77 (63.1)
CTX-M-15 + SHV-28	1 (7.1)
CTX-M-2 + SHV-11	2 (14.3)
CTX-M-15 + SHV-12	2 (14.3)
SHV-12	1 (7.1)

**Рисунок 1**

Вид колоний на среде Colorex ESBL

A – ESBL- продуцирующие *E.coli*; 119/122 (97.5%) – типичная розовая окраска, 3/122 (2.5%)– бесцветные

B – ESBL- продуцирующие *K.pneumoniae*; все – типичный металлический синий цвет

### Выводы

Для всех резистентных *E.coli* (AmpC и ESBL) чувствительность при идентификации ESBL-продуцирующих организмов составила 99,2%; специфичность для всех ESBL-продуцирующих микроорганизмов по сравнению с AmpC-продуцирующими *E.coli* составляет 89%, тогда как в сравнении с *E.coli* дикого типа специфичность составляет 100%.

Согласно опубликованным данным, среда более специфична в отношении ESBL-продуцирующих микроорганизмов, чем прочие среды (например, агар MacConkey с цефтриаксоном – 54.2%, прочие хромогенные среды – 60.7% - по данным одного исследования (4)).

Среда не позволяет идентифицировать ESBL-продуцирующие микроорганизмы с низкими показателями МИС для цефтриаксона (напр. – TEM-12).

Ложноположительные результаты для AmpC-продуцирующих *E.coli* могут быть обусловлены не-ESBL β-лактамазами (напр., TEM-1/2, SHV-1), которые экспрессируются в большом количестве, либо альтерациями поринов, либо обоими

факторами. Подобные организмы могут экспрессировать ESBL фенотип, как это наблюдалось нашей группой и другими исследователями (3).

В Канаде, где AmpC-продуцирующие *E.coli* составляют около 50% изолятов с резистентностью к цефтриаксону, при внедрении данной среды для скрининга ESBL-продуцирующих микроорганизмов ожидается уменьшение трудоемкости процесса, в частности – при подтверждающих тестах на ESBL (по сравнению с использованием менее специфичных сред).

## Ссылки

1. Pitout J.D., Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase -producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008 8(3): 159-66.
2. Zhanel G.G., DeCorby M.R., Nichol K.A., Wierzbowski A, Baudry P.J., Tailor F., Lagace-Wiens P.R.S. et. al. Canadian Hospital Ward Antibiotic Resistance Surveillance (CANWARD) Study - 2007. *Can J Infect Dis and Med Microbiol.* 2009 (20), Suppl. A:9-19
3. Livermore D.M., Brown D.F. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2001 ;48 Suppl 1:59-64.
4. Glupczynski Y., Berhin C., Bauraing C., Bogaerts P. Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2007. 45(2):501-5