



Хромогенные среды: опыт применения в практике микробиологической лаборатории

О.И.Кречикова

*Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии
Смоленский государственный медицинский университет*

Москва, V РКЛМ, 11 сентября 2019

Каким требованиям должны отвечать микробиологические исследования?

Быстро давать результат о возбудителе инфекции

Быстро отвечать на вопрос: чем лечить?

Классические культуральные методы многоэтапные и требуют не менее 72 часов до получения результата



I этап



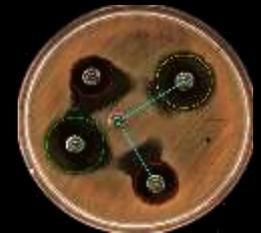
II этап



III этап



IV этап



V этап

Огромный недостаток классического метода – длительность!

Что меняет траекторию классического культурального метода ?



1.

Инновационные технологии на этапах 2, 3, 4 и 5 микробиологического исследования

- ❖ Микробиологические анализаторы
- ❖ Видовая идентификация и выявления генов резистентности МО методом ПЦР в реальном времени
- ❖ Время пролётная Масс-спектрометрия видовой идентификации МО

Скорость

Информативность

Видовой идентификации

+

+

Определении Чувствительности к АМП

+

+

Выявление механизмов резистентности

+

+

Инновационные технологии изменили алгоритм классического микробиологического культурального метода

I.

Клинически значимая информация через 48 часов - 72 часа



I этап



II этап

III этап

IV этап



V этап

Что меняет траекторию классического метода ?

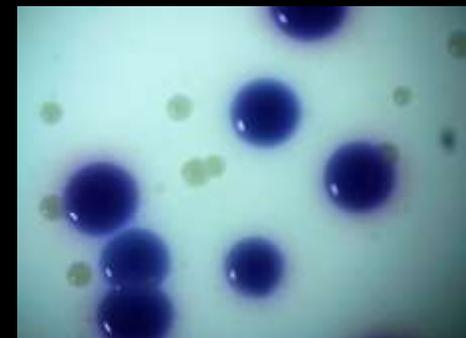


II.

Инновационные технологии создания питательных сред первичного посева биобразцов

Хромогенные среды - видовая/родовая идентификация МО по морфологии и окраске колоний

В состав **Хромогенных сред** входят индикаторные системы с широким спектром цветных молекул- **«хромогенов»**, которые образуют определённую окраску с продуктами гидролиза таксономическими ферментами МО и локализуются в месте роста колонии МО, не «расплываясь».



Инновационные технологии изменили алгоритм классического микробиологического культурального метода

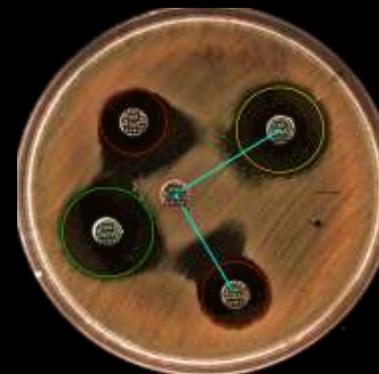
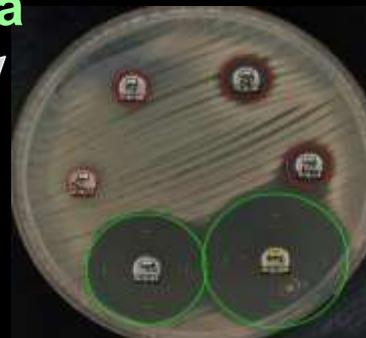
II.

Клинически значимая предварительная информация через 24 часа,

Окончательный результат – через 48-72 часа

Антибиотикограмма
Фенотипические тесты

Скрининг на ESBL, KPC



I этап

II этап

III этап

IV этап

V этап

24 часа

«Выявлен рост *K.pneumoniae* с подозрением на продукцию ESBL

Выявлен рост *A.baumannii* с подозрением на продукцию карбапенемаз»

Хромогенные среды

- ❖ Хромагары селективные, поддерживающие рост одного вида МО:
Агар для выделения и идентификации *S.galactiae*, бактерий рода *Salmonella* ...
- ❖ Хромагары многоцветные неселективные позволяют одновременно дифференцировать родовую/видовую принадлежность на одной среде более 20 видов МО.

Цветовые реакции микроорганизмов



E. coli - от розового до красного цвета

K. pneumoniae - глубокого синего цвета

P. mirabilis – светлые с диффузным коричневым окружением

P. aeruginosa – прозрачные с оттенком присущих им пигментам

A. baumannii - белые выпуклые с ровным краем

Enterococcus spp. – глубокого синего цвета, мелкие

Staphylococcus aureus - с легким желтым оттенком

Хромогенные среды. Клинические случаи

Пациент С.Р.А. 10 лет. Диагноз «Острый средний отит»

Образец для исследования: отделяемое среднего уха. Лаб № 19_2218 от 22.07.

Посев материала

- ❖ Хромагар неселективный
- ❖ Кровяной агар
- ❖ Шоколадный агар

На всех средах рост двух типов колоний

Результат исследования

Выделены:

1. *Staphylococcus aureus* – обильный рост
2. *Aeromonas veronii* – обильный рост



Хромогенные среды. Клинические случаи

Пациент К.А.А. 40 лет. Диагноз «Пневмония внебольничная. Гнойный плеврит»

Образец для исследования: пунктат из плевральной полости.
Лаб № 19_2118 от 15.07.

Бактериоскопия: СЯЛ > 25 в поле зрения

Микрофлора: грам (-) палочки, тонкие >20 в поле зрения

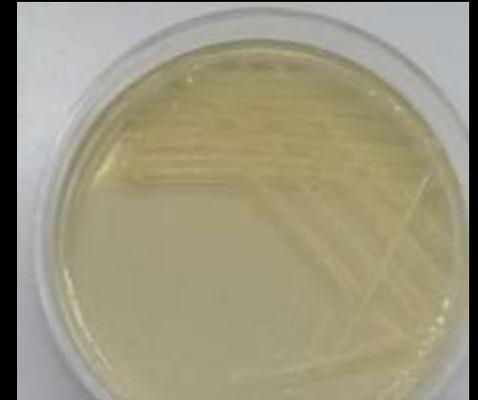
Посев материала

- ❖ Хромагар неселективный, хромагары ESBL, KPC
- ❖ Кровяной агар
- ❖ Шоколадный агар
- ❖ Агар анаэробный №1

На всех средах рост очень мелких колоний, через 48 часов
величина колоний примерно 1 мм голубоватого зеленоватого
цвета

Результат исследования

Выделена *Stenotrophomonas maltophilia*



Хромогенные среды. Клинические случаи

Пациент С.Н.Е. 72 года. Диагноз «Абсцесс ягодицы?»

Образец для исследования: гнойное отделяемое свищевого хода
Лаб № 19_2374 от 02.08.2019

Посев материала

- ❖ Хромагар неселективный, хромагары ESBL, KPC
- ❖ Кровяной агар
- ❖ Шоколадный агар
- ❖ Агар анаэробный №1

На хромагаре рост 2 типов колоний:
мелкие сине голубые колоний, и пылевидный рост белых колоний

Результат исследования

1. *Enterococcus faecium*
2. *Corynebacterium urealyticum*



Хромогенные среды. Клинические случаи

Пациент Б.Е.В. 46 лет. Диагноз «Пролежни в области спины»

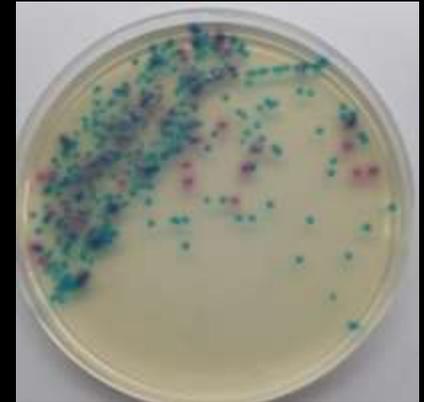
Образец для исследования: гнойное отделяемое.

Лаб № 19_209 от 31.01.2019

Образец 18-5601

Посев материала

- ❖ Хромагар неселективный, хромагары ESBL, KPC
- ❖ Кровяной агар
- ❖ Шоколадный агар



На хромагаре рост 2 типов колоний:

мелкие сине голубые колоний, и пылевидный рост белых колоний

Результат исследования

1. *Enterococcus faecalis*
2. *Streptococcus agalactiae*



Техника посева

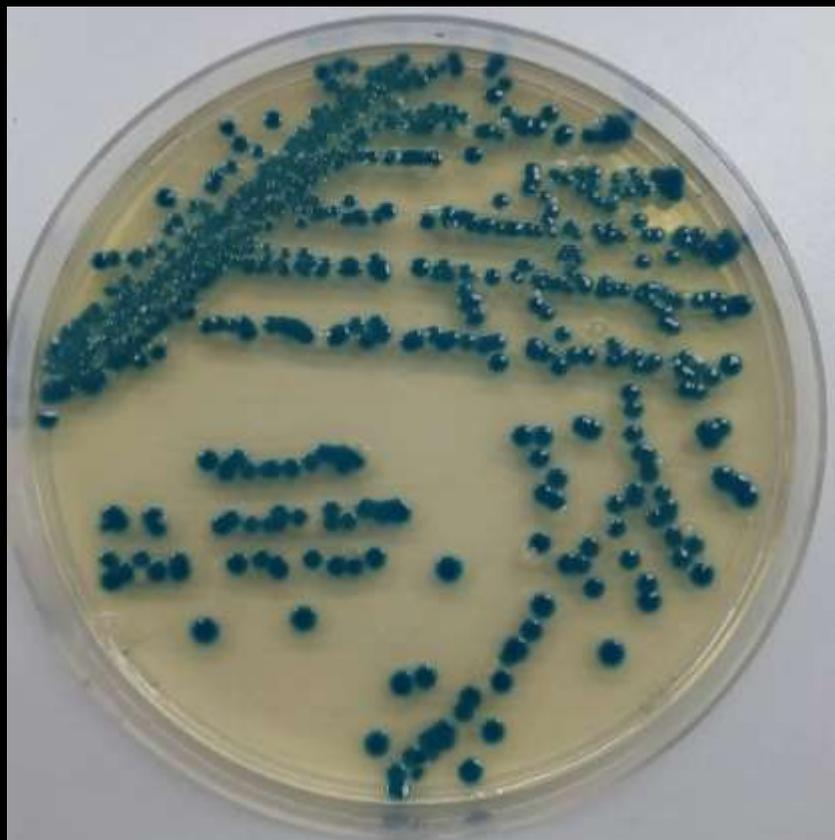
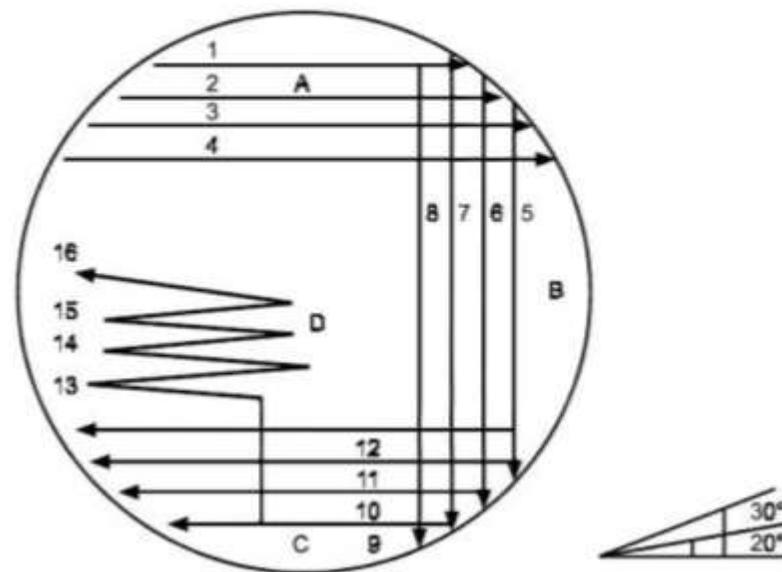


Рисунок 1 - Образец проведения инокуляции при помощи модифицированного метода посева штрихом и угол наклона петли



ГОСТ ISO 11133 - 20011

**Микробиология пищевых продуктов и кормов
для животных**

Часть 2

**Практические руководящие указания по
эксплуатационным испытаниям
культуральных сред**

Хромогенные среды. Некоторые особенности цветных реакций МО

Citrobacter freundii



15 часов роста

Proteus mirabilis



24 часа роста

P.aeruginosa



24 часа роста



24 часа роста

EVALUATION OF A NEW MEDIUM FOR ISOLATION, DIFFERENTIATION AND PRESUMPTIVE IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS IN URINARY TRACT INFECTIONS

Z. Samra¹; M. Heifetz¹; J. Talmor²; E. Bain²; and J. Bahar² Microbiology Dept.¹; Beilinson Med. Cent. Petach Tikva and Hy-Laboratories Ltd.², Rehovot Israel
Tel: 972-3-9376 725 - Fax: 972-3-9218 466 - Presented at ASM'97 in Miami, May 5 - 7 1997

INTRODUCTION

In the past few years several chromogenic media such as Albicans ID and CPSID2 (Biomérieux), CHROMagar Candida (CHROMagar), etc... have been commercialized allowing the direct identification of microorganisms on primary plates. CHROMagar Orientation is based on the same principles and proposes a simultaneous presumptive identification of gram negative and positive bacteria and yeasts on one single medium by means of distinct colony colors. The clinical evaluation of this medium was conducted at the Microbiological Laboratory at Beilinson Medical Center.

Aim of
The aim
according

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 1996, p. 1788-1793
0095-1137/96/\$04.00+0
Copyright © 1996, American Society for Microbiology

Vol. 34, No. 7

Evaluation of CHROMagar Orientation for Differentiation and Presumptive Identification of Gram-Negative Bacilli and *Enterococcus* Species

JOHN MERLINO,* STEVEN SIARAKAS, GRAHAM J. ROBERTSON, GLENN R. FUNNELL,
THOMAS GOTTLIEB, AND ROSS BRADBURY

*Department of Microbiology and Infectious Diseases, Concord Repatriation
General Hospital, Concord, New South Wales 2139, Australia*

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 1998, p. 990-994
0095-1137/98/\$04.00+0
Copyright © 1998, American Society for Microbiology

Vol. 36, No. 4

Evaluation of Use of a New Chromogenic Agar in Detection of Urinary Tract Pathogens

Z. SAMRA,^{1*} M. HEIFETZ,¹ J. TALMOR,² E. BAIN,² AND J. BAHAR²

*Microbiology Department, Rabin Medical Center, Beilinson Campus, Petah Tiqva, and the Sackler Faculty of
Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv,¹ and Hy-Laboratories Ltd., Rehovot,² Israel*

Достоинства хромогенных сред

❖ Специфическая окраска колоний делает лёгкой и быстрой идентификацию широкого круга микроорганизмов: *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Escherichia coli*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *Streptococcus agalactiae* ...

Точность видовой идентификации по цветовой реакции и морфологии:

E.coli – 99,3%; для других энтеробактерий – 60%.¹

Для большинства МО требуется дополнительная идентификация:

❖ Для энтеробактерий:

постановка аминокислот (лизин, орнитин), индола, серологическая идентификация (шигеллы, салмонеллы) увеличивает точность идентификации до 98%

❖ Полная идентификация на коммерческих системах для некоторых микроорганизмов

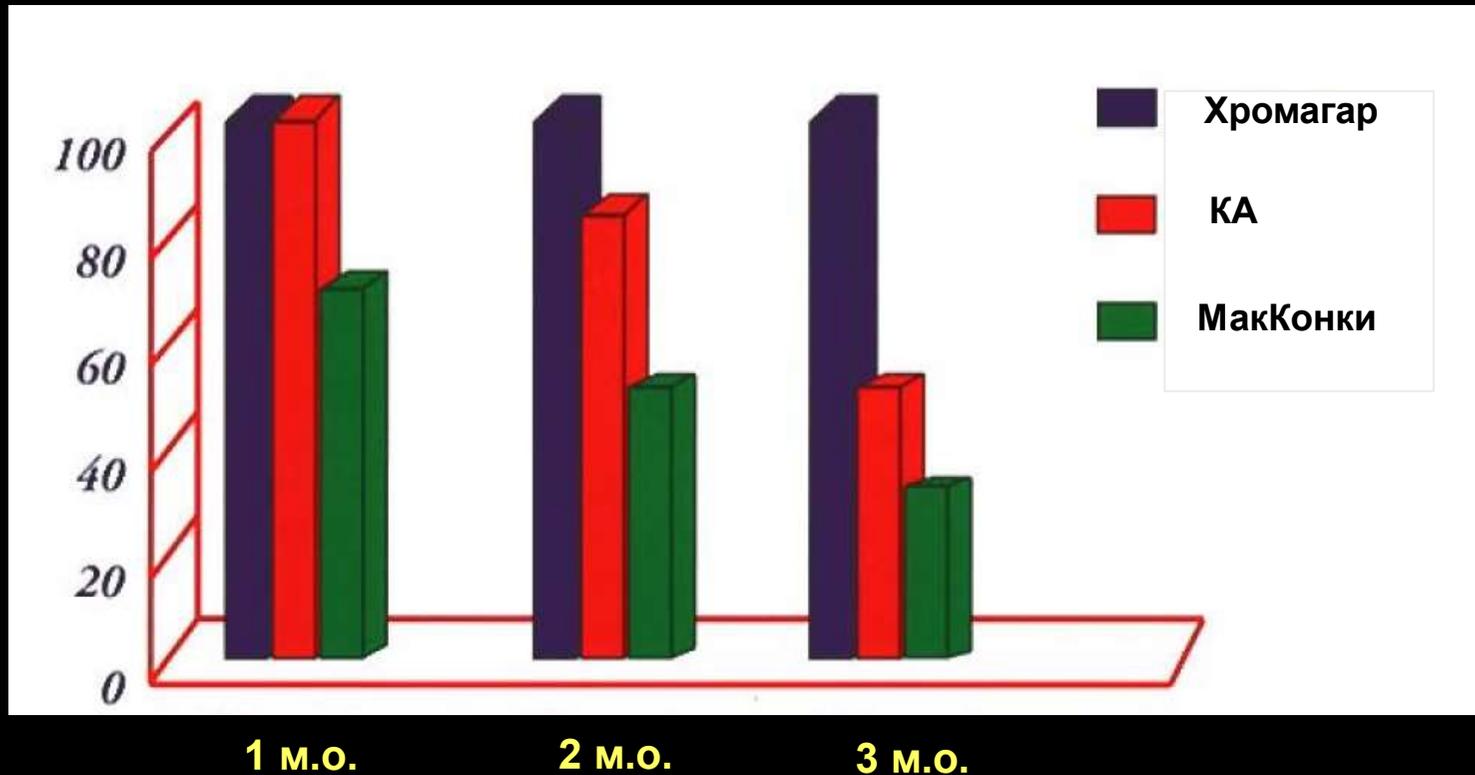
Достоинства хромогенных сред

- ❖ **Повышают чувствительность идентификации грампозитивных кокков (стрептококков, энтерококков, стафилококков) в смешанной с энтеробактериями культуре**
- ❖ **Уменьшают потребность субкультивирования МО для постановки антибиотикограммы и фенотипических тестов, а также идентификации на MALDI**
- ❖ **Существенно снижают материальные затраты на исследования (до 70%)**
- ❖ **Снижаются трудозатраты**

Достоинства хромогенных сред

Повышают эффективность исследования образцов в смешанной культуре

% положительных результатов
в корреляции с числом М.О.



Хромагары – приемлемая альтернатива традиционным средам

Тенденции изменения резистентности к карбапенемам ГОНБ - возбудителей госпитальных инфекций в России

	2002-2004	2006-2007	2011-2012*	2013-2014*	2015	2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
Меропенем нечувствительные	55,4 %	70,3%	67,2 %	66,1 %	73%	72,9%
Имипенем нечувствительные	39,0%	55,9 %	58,7 %	71,1 %	67,8%	68,6%
Продукция МБЛ (класс В)	4,5 %	20,1%	28,3%	21,3%	32,35%	18,7%
<i>Acinetobacter baumannii</i>						
Нечувствительны к карбапенемам	11,8 %	38,6 %	68,8 %	75 %	73,5-76,8%	87,1-90,7%
Продукция карбапенемаз	0,6%	2,4%	46,8%	64,7%	70,4%	81,1%

*нечувствительные штаммы (I+R), %
* критерии EUCAST

Сухорукова и др. КМАХ. 2014;16(4):266-272 Сухорукова и др. КМАХ. 2017;19(1):49-56
map.antibiotic.ru – Карта антибиотикорезистентности

Тенденции изменения резистентности к β -лактамам Энтеробактерий – возбудителей госпитальных инфекций в РФ

	2002-2004	2006-2007	2011-2012	2013-2014	2015	2016
Нечувствительность* к Цефалоспорином: Цефотаксиму, Цефтазидиму, Цефепиму						
Энтеробактерии	54,9-64,5 %	69,5-75,6 %	79,0-83,7 %	73,6-77,5 %	75-79%	74,3-80,6
Продукция ESBL	52,3%	69,3%	79,9%	63,9%	-	-
Нечувствительность* к карбапенемам						
Меропенем	0,1 %	0,3 %	2,8 %	7,2 %	7,9%	14,35
Имипенем	3,6 %	2,1 %	8,4 %	8,8 %	8,5%	14,5%
Эртапенем	6,7 %	9,8 %	14,0 %	18,4 %	23,9%	25,9%
Продукция карбапенемаз	0	0,1 %	3,3 %	7,8 %	13,6%	17,9%

*нечувствительные штаммы (I+R), %
критерии EUCAST v.7 (2017)

Сухорукова и др. КМАХ. 2014;16:254-65
Сухорукова и др. КМАХ. 2017;19:49-56
map.antibiotic.ru – Карта антибиотикорезистентности

Резистентность к карбапенемам у грамотрицательных бактерий

Самая тревожная форма устойчивости !

Эти бактерии резистентны ко всем β -лактамным АБП также как к большинству других классов АБП

Для штаммов продуцирующих карбапенемазы характерны **экстремальная резистентность (XDR)** и **панрезистентность (PDR)**

В феврале 2017 года ВОЗ опубликовала список из «приоритетных микроорганизмов», включая

- **Enterobacteriaceae** карбапенем резистентные
- **Acinetobacter baumannii** карбапенем резистентные
- **Pseudomonas aeruginosa** карбапенем резистентные

Хромогенные среды – современные технологии в микробиологической диагностике

Хромагары с селективными добавками обеспечивают скрининг продукции ESBL и карбапенемаз через 24 часа от начала исследования

Преимущества применения хромагаров

- ❖ позволяют ставить антибиотикограмму через 24 часа без дополнительного накопления микробной массы исследуемого МО
- ❖ ставить тесты, подтверждающие продукцию карбапенемаз через 24 часа
- ❖ нетрудоёмки в применении
- ❖ экономят материальные ресурсы

Чувствительность CHROMagar™ KPC

Чувствительность %	Исследователи
92,7 % - 100 %	Moran Gilad et al., 2011; Samra et al., 2008
85,0 %	Adler et al., 2011
76,6 %	Shawn Vasoo et al., 2014
43,0 %	Delphine Gerlich et al., 2013

Возможные причины различий в оценке чувствительности CHROMagar™ KPC

- Методология изучения
- Возможные различия МПК карбапенемов изучаемых культур
- Различные классы карбапенемаз и разнообразие продуцируемых β - лактамаз

Чувствительность/специфичность CHROMagar™ KPC

Чувствительность:

Детекция карбапенемаз энтеробактерий – 43 %

Специфичность - 67,8%

Чувствительность детекции карбапенемаз различных классов колеблется в широких пределах:

Класс А (KPC) - 70%

Класс В (MBL, IMP, VIM) - 58,8%

Класс D (OXA 48) - 11%

Характеристика наиболее значимых карбапенемаз грам(-) МО

Продукция карбапенемаз

Мол. Класс/ Функцион.гр	пенициллины	ЦС III, ЦС IV	Азтреонам	Ингибитор - клавуланов. кислота	Карбапенемы
A/2f	Сериновые карбапенемазы: KPC, GES, BIC			У/Ч	
B/3	Металло β-лактамазы: VIM, MBL, NDM, GIM				
D/2df	Оксациллиназы: OXA-48, OXA-like				

Продукция карбапенемаз наиболее важный, но не единственный механизм резистентности к карбапенемам у грам(-) бактерий

Видовой состав изолятов энтеробактерий, продуцирующих известные карбапенемазы (Россия 2013-2014)

Вид	N	Типы карбапенемаз				
		VIM	NDM	OXA-48	KPC	OXA48 +NDM
<i>K. pneumoniae</i>	118	2	21	100	1	6
<i>E. coli</i>	3		3			
<i>P. mirabilis</i>	3		3			
<i>S. marcescens</i>	3			3		
<i>C. freundii</i>	1			1		
<i>E. cloacae</i>	1			1		
<i>K. oxytoca</i>	1			1		
	130	2	27	106	1	6

Сниженная чувствительность/резистентность к карбапенемам

Следует помнить, что сниженная чувствительность/резистентность к карбапенемам, может быть определена другими механизмами резистентности

- М.О. наряду с продукцией карбапенемаз могут продуцировать различные β -лактамазы
- Сниженная чувствительность/резистентность к карбапенемам может быть связана с гиперпродукцией AmpC, ESBL
- Со снижением проницаемости клеточной стенки М.О.
- С механизмом эффлюкса



Продукция карбапенемаз Грам(-) МО.

	Содержание В-лактамаз	мкг/мл IMP*	мкг/мл ERT*	мкг/мл MEM*
<i>K.pneumoniae</i> ROV	OXA-48, CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	0,5 / Ч	3 / P	0,38 / Ч
<i>K.pneumoniae</i> LAS	OXA-48, CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	3 / Ч	> 32 / P	8 / P
<i>K.pneumoniae</i> MUS	KPC-2, TEM-1 CHV-12	0,75 / Ч	4 / P	1,5 / УЧ
<i>K.pneumoniae</i> 475	KPC-2, CTX-M-15, CHV-11	16 / P	>32 / P	>32 / P
<i>K.pneumoniae</i> KIE	NDM-1, CHV-38, CMY-16, OXA-10	0,75 / Ч	2 / P	1 / Ч
<i>E.coli</i> PEK	NDM-4, CTX-M-15, OXA-1	>32 / P	>32 / P	>32 / P
<i>E.coli</i> MAR	Гиперэкспрессия AmpC	16 / P	>32 / P	2 / УЧ
<i>K.pneumoniae</i> COO	CTXM-15, CHV-28	8 / P	32 / P	4 / P

Примечание: Критерии интерпретации CLSI 2014

IMP Ч ≤ 1 P ≥ 4; MEM Ч ≤ 1 P ≥ 4; ERT Ч ≤ 0,5 P ≥ 2

Сравнение агаров и CHROMagar KPC и SUPER CARBA

Количество культур энтеробактерий с продукцией карбапенемаз - 46

		Энтеробактерии при посеве 10 ⁵ КОЕ/мл и менее								
Тип карбапенемаз		%	МПК меропенема, мкг/мл / % культур							
			0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
ОХА 48 (класс D)	42		4	4	6	8	4	2	4	10
Рост на KPC	34*	80,9%	0	4	2	8	4	2	4	10
Рост на SuperCarba	42**	100%	4	4	6	8	4	2	4	10
ОХА-48+NDM	4					1	1		2	
Рост на KPC	4		-	-	-	1	1		2	
Рост на SuperCarba	4					1	1		2	
			54,7% категория Ч							

Критерии интерпретации «КР Россия. Версия 2018 »

Меропенем Ч- ≤ 2 мкг/мл; Р > 8 мкг/мл

Неопубликованные данные НИИА Х, 2017

У каких штаммов требуется подтверждение продукции карбапенемаз

У всех штаммов, давших рост на Хромагаре КРС при отсутствии природной резистентности к карбапенемам

У энтеробактерий категории «Чувствительности», но с зоной задержки роста) :

- меропенема менее 27 мм (Ч - \geq 22 мм)
- имипенема менее 23 мм (Ч - \geq 22 мм)

Детекция не является обязательной для *Proteus* spp., *Morganella*, *Providencia* spp. со сниженной чувствительностью к имипенему (МПК 2-4 мг/л) – видоспецифическое свойство

У каких штаммов требуется подтверждение продукции карбапенемаз

У всех штаммов, давших рост на Хромагаре КРС при отсутствии природной резистентности к карбапенемам

У энтеробактерий категории «Чувствительности», но с зоной задержки роста) :

- меропенема менее 27 мм (Ч - \geq 22 мм)
- имипенема менее 23 мм (Ч - \geq 22 мм)

Детекция не является обязательной для *Proteus* spp., *Morganella*, *Providencia* spp. со сниженной чувствительностью к имипенему (МПК 2-4 мг/л) – видоспецифическое свойство

K.pneumoniae № 19_2604

Антибиотик	Добавить	Диаметр	RIS			MIC	
			Адажио	Эксперт	Итого	Пересчет	Измерено
Цефепим 30 µg		6	R			> 256	
Гентамицин 10 µg		6	R			32	
Амикацин 30 µg		19	S			8	
Амоксициллин + клавулановая кислота 30 µg		7	R			> 8	
Цефтазидим 10 µg		6	R			> 256	
Эртапенем 10 µg		6	R			64	
Имипенем 10 µg		27	S			1	
Ципрофлоксацин 5 µg		6	R			256	
Меропенем 10 µg		13	R			16	
Тигециклин 15 µg		20					
Пиперациллин-тазобактан 36 µg		11	R			64	

ESBL



IMi



MERO

Тест СМІ отрицательный

K.pneumoniae № 19_1976

Антибиотик	Добавить	Диаметр	RIS			MIC	
			Адажио	Эксперт	Итого	Пересчет	Измерено
Цефепим 30 µg		6	R			> 256	
Гентамицин 10 µg		6	R			32	
Амикацин 30 µg		19	S			8	
Амоксициллин + клавулановая кислота 30 µg		7	R			> 8	
Цефтазидим 10 µg		6	R			> 256	
Эртапенем 10 µg		6	R			64	
Имипенем 10 µg		27	S			1	
Ципрофлоксацин 5 µg		6	R			256	
Меропенем 10 µg		13	R			16	
Тигециклин 15 µg		20					
Пиперациллин-тазобактан 36 µg		11	R			64	

ESBL



IMi



MERO

Тест СМІ положительный!

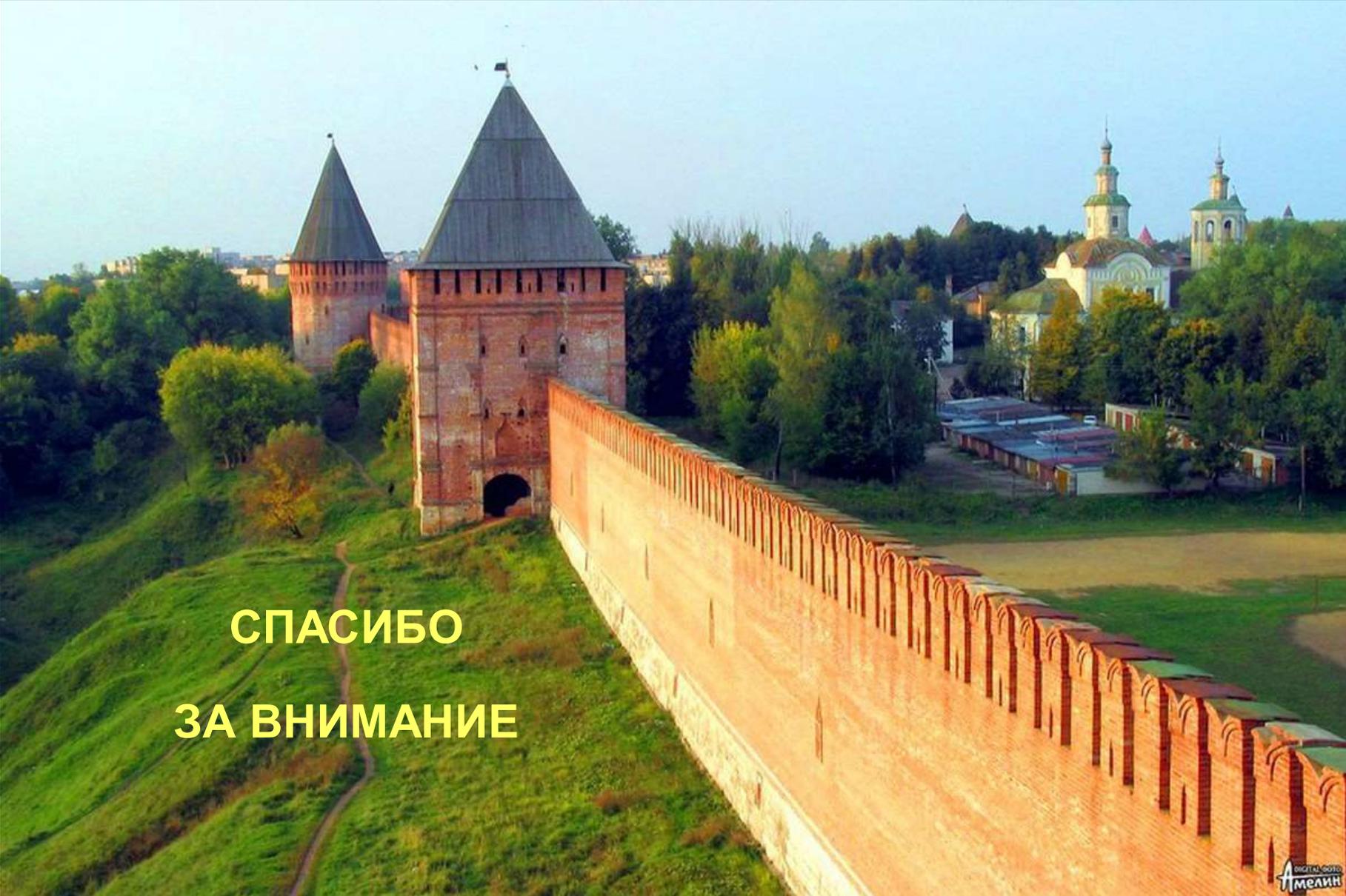
Заключение

Стремительное распространение поли-, экстремально- и панрезистентных бактерий, широкое разнообразие и появление ранее неизвестных механизмов резистентности

Определили необходимость пересмотра методических подходов к культуральной диагностике

Чтобы обеспечить быстроту и информирование специалистов для назначения своевременной и адекватной антибактериальной терапии:

Необходимо широко использовать скрининговые, фенотипические и молекулярно-генетические методы выявления механизмов резистентности



**СПАСИБО
ЗА ВНИМАНИЕ**