

Test nhanh kháng thuốc NG-CARBA - 5, CTX-M và MCR-1

TS. BS. Nguyễn Phú Hương Lan

Ths. BS. Hồ Quang Minh

Ths. Lê Thị Quỳnh Ngâm

BS. Đường Ngọc Lan

Khoa Xét Nghiệm, lab Vi Sinh, bệnh viện Bệnh Nhiệt đới

Nội dung

- Carbapenem resistant enterobacterales (CRE)
- Test nhanh chẩn đoán carbapenemase NG Test CARBA 5
- Test nhanh chẩn đoán kháng thuốc MCR-1
- Test nhanh chẩn đoán kháng thuốc CTX-M



Trực khuẩn gram âm đường ruột kháng carbapenem (CRE)

- Định nghĩa (IDSA 2022): kháng ít nhất 1 carbapenem hoặc tiết ra carbapenemase.
 - *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* spp kháng carbapene khác ngoài imipenem.
- 2 cơ chế kháng carbapenem: có carbapenemase hoặc đột biến kênh porin -> không thấm thuốc.



Tổng quan về carbapenemase

Theo phân loại Ambler

- Lớp A (Class A beta-lactamase) nhóm TEM, SHV, CTX-M, NMC, IMI, SME, KPC, GES.
 - *K.pneumoniae* carbapenemase (KPC): carbapenemase quan trọng nhất nhóm A. Di truyền plasmid, có thể lan truyền sang các VK khác.
- Lớp B – Metallo beta lactamase (MBL).
 - Không bị ức chế bởi các beta-lactamase inhibitors: tazobactam, avibactam....
 - IMP, VIM, SIM, NDM-1
 - Di truyền trên NST + plasmid
 - **NDM – 1**: New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1). Gene mã hóa rất di động, di chuyển nhanh chóng -> Lan rộng.
- Class D- betalactamase: OXA-type enzymes thủy phân oxacillin
 - Bị ảnh hưởng bởi các Betalactamase inhibitor.
 - > 100 loại enz, 6 group phổ biến: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-58, OXA-143, OXA-51.

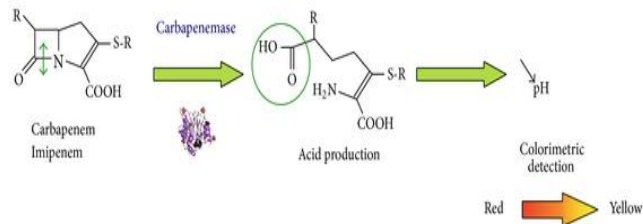
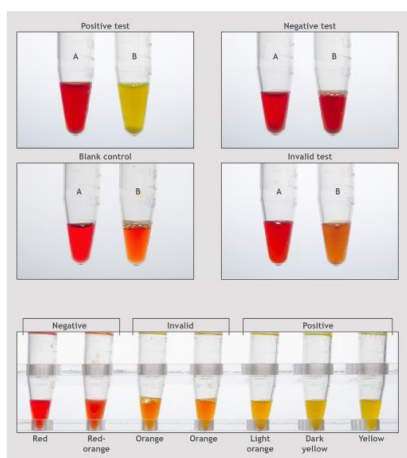


Chẩn đoán VK có carbapenemase

- Dựa trên MIC với Imipenem hoặc meropenem.
 - Ertapenem ≥ 2 ug/mL
 - Imipenem và meropenem > 4 ug/mL (R) , 2 – 4 -> Tầm soát
- Phenotypic test: CarbaNP, mCIM...
- Chẩn đoán genotypic trực tiếp: PCR, DNA microarrays.



CarbaNP test

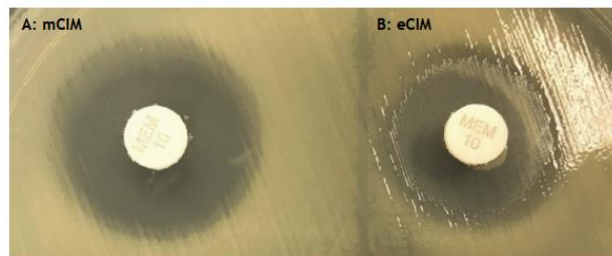


CLSI M100 (2021)



Figure 2B. mCIM Test Interpretation

- Result: positive mCIM
- Report: carbapenemase detected



CLSI M100 (2021)

HICS Hội Chi Minh City
Infection Control
Society
Hội kiểm soát nhiễm khuẩn TP HCM

Kháng sinh thử nghiệm cho vi khuẩn carbapenemase

- Novel beta-lactam beta lactamase inhibitors
- Ceftolozane – tazobactame (*Pseudomonas aeruginosa*).
- Aminoglycoside
- Colistin, polymyxin B
- Tigecyclin
- Cefiderocol
- Aztreonam
- Eravacycline
- Fosfomycin (NTT)
- MBL -> ceftazidime/avibactam và Aztreonam.

<https://www.idsociety.org/practice-guideline/amrguidance>

HICS Hội Chi Minh City
Infection Control
Society
Hội kiểm soát nhiễm khuẩn TP HCM

Số liệu về vi khuẩn *K. pneumoniae* kháng thuốc tại BV Bệnh Nhiệt đới



HICS Hội Kiểm soát Nhiễm Khuẩn TP HCM
Hội Kiểm soát Nhiễm Khuẩn TP HCM

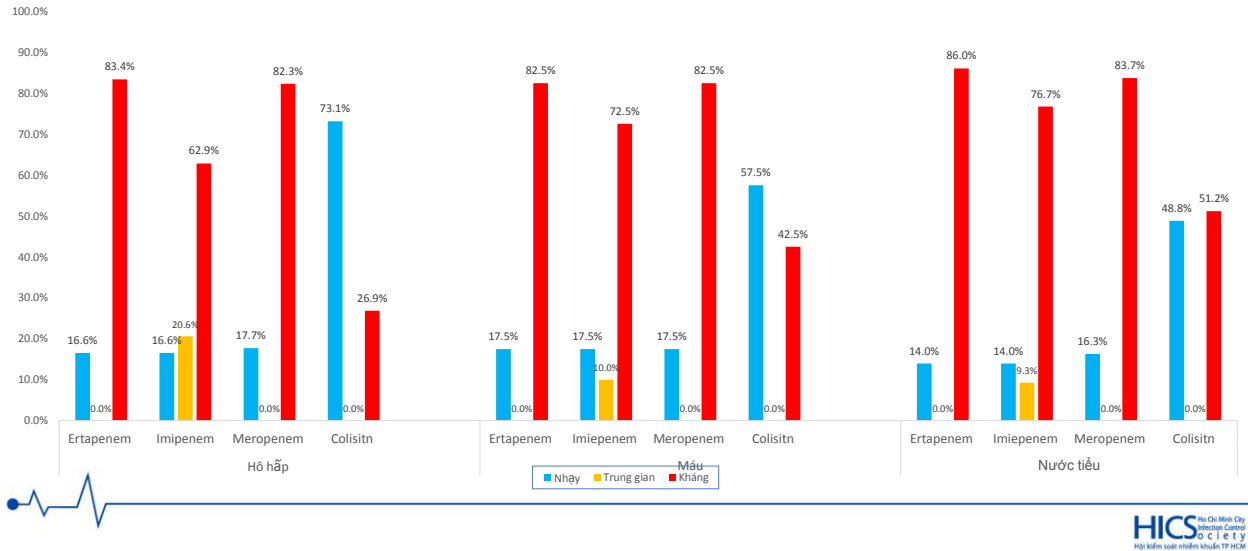
Số liệu của lab vi sinh, bệnh viện Bệnh Nhiệt đới, tháng 08/2021 – 04/2022, thống kê trên BN COVID-19 (+)

Vị trí phân lập	Số mẫu dương tính với Kleb (n=334) (%)	Số mẫu có thực hiện KSD (n=260)	Số mẫu đề kháng carbapenem
Hô hấp	201 (60,2%)	175	146 (83,4%)
Cấy máu	77 (23,1%)	40	33 (82,5%)
Nước tiểu	52 (15,6%)	43	37 (86,04%)
Dịch màng phổi	4 (1,2%)	2	2 (50%)
Nhiễm Kleb nhiều vị trí			
Cấy máu + Hô hấp	14 (4,2%)	Số liệu lab vi sinh, BVBND.	
Hô hấp + nước tiểu	12 (3,6%)		
Cấy máu + nước tiểu	6 (1,8%)		
Máu + hô hấp + nước tiểu	2 (0,6%)		
Máu + Dịch màng phổi	1 (0,3%)		

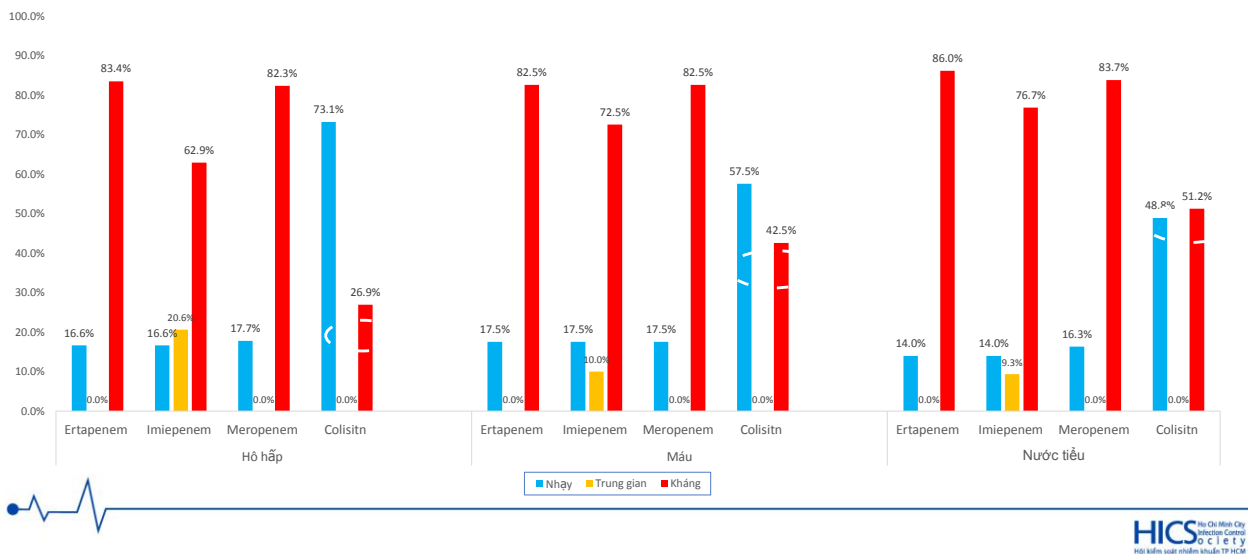


HICS Hội Kiểm soát Nhiễm Khuẩn TP HCM
Hội Kiểm soát Nhiễm Khuẩn TP HCM

Một số đặc điểm kháng sinh đồ



Một số đặc điểm kháng sinh đồ

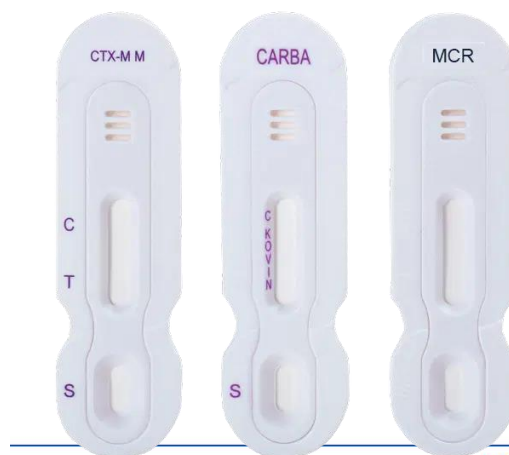


Sự phân bố gene kháng thuốc *Klebsiella pneumoniae*

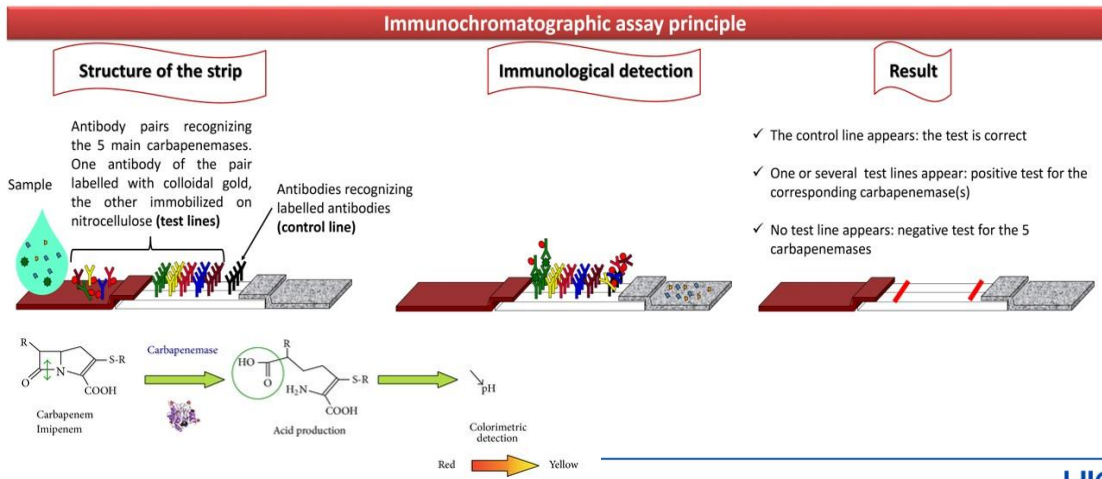
	Số mẫu (n=101)	Tỉ lệ%	Số ca tử vong	Tỉ lệ% trong nhóm
OXA-48	61	60,40%	32	52,46%
OXA-48+ NDM	14	13,86%	9	64,29%
NDM	6	5,94%	2	33,33%
KPC	2	1,98%	1	50,00%
OXA-48+ KPC	1	0,99%	1	100,00%
OXA-48+ IMP	2	1,98%	1	50,00%
NONE GENE	15	14,85%	11	73,33%



Test nhanh kháng thuốc NG-test CARBA 5

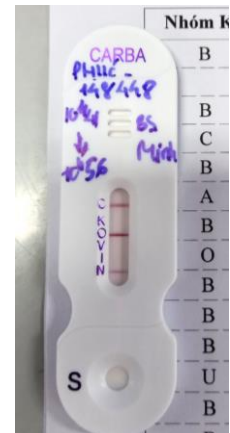
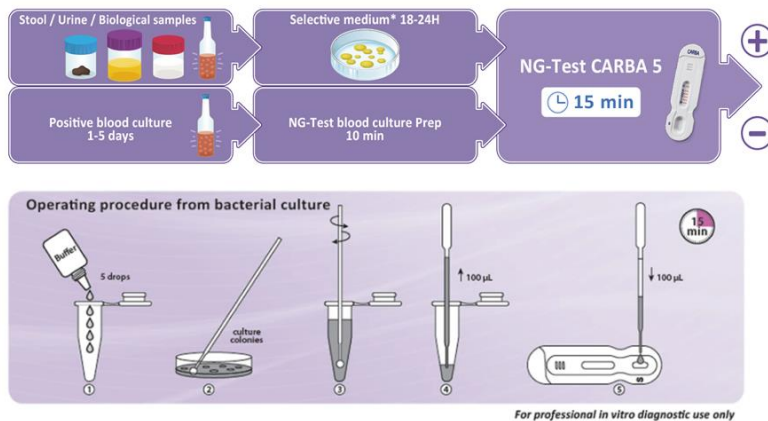


Nguyên lý xét nghiệm



HICS Hội Chi Minh City
Infection Control
Society
Hội kiểm soát nhiễm khuẩn TP HCM

Cách thực hiện



HICS Hội Chi Minh City
Infection Control
Society
Hội kiểm soát nhiễm khuẩn TP HCM



±Kết quả cấy: **DƯƠNG TÍNH**
 + Chủng vi sinh tìm thấy: *Klebsiella pneumoniae* 10⁶ CFU/ml Carbapenemase
 - Ghi chú: Vi trùng đa kháng thuốc
 Mã định danh vi khuẩn:

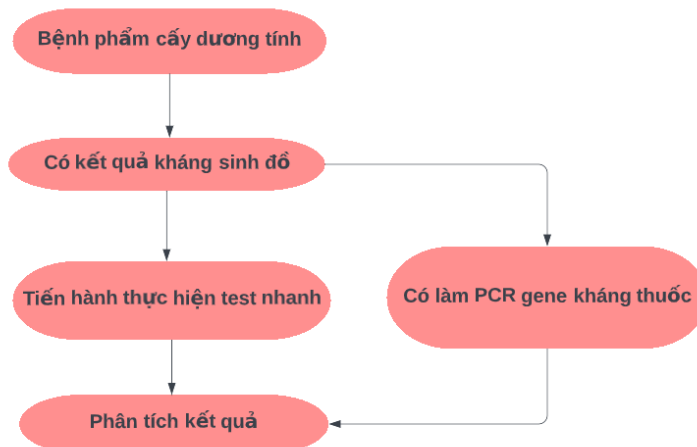
Phương pháp định danh: MALDI-TOF

Nhóm KS	Tên kháng sinh	MIC(μmg)	SRI	Phương pháp
B	Amikacin	16	S	MIC Vitek
	Ampicillin + Sulbactam		R	MIC Vitek
B	Amoxicillin + Clavulanic acid		R	Đĩa giấy*
C	Ceftazidime	>=64	R	MIC Vitek
B	Ciprofloxacin	>=4	R	MIC Vitek
A	Gentamycin	>=16	R	MIC Vitek
B	Ceftriaxone		R	Đĩa giấy*
O	Colistine	1	S	MIC Vitek
B	Cefotaxime		R	Đĩa giấy*
B	Ertapenem		R	Đĩa giấy*
B	Cefepime	>=64	R	MIC Vitek
U	Fosfomycin		S	Đĩa giấy*
B	Cefoxitin		R	Đĩa giấy*
B	Imipenem	>=16	R	MIC Vitek
B	Levofloxacin	>=8	R	MIC Vitek
B	Meropenem	>=16	R	MIC Vitek
B	Trimethoprim-sulfamethoxazole	>=320	R	MIC Vitek
O	Ticarcillin + Clavulanic acid (TV)	>=128	R	MIC Vitek
O	Tigecycline		I	Đĩa giấy*

Thử nghiệm tại BV BNĐ

- Mô tả loạt ca
- Tháng 9/2022
- So sánh test NG-test CARBA 5 và kết quả PCR gene carbapenemase.
- So sánh kết quả test MCR-1 và kết quả kháng colistin trên kháng sinh đồ
- So sánh kết quả test CTX-M Multi và kết quả ESBL trên kháng sinh đồ.

Quy trình thực hiện



Kết quả: tháng 09/2022, đặc điểm mẫu thu thập (n=48)

	Số ca (n=48)	Tỉ lệ %
Dịch rửa phế quản	22	45,8
Đàm	7	14,6
Nước tiểu	11	22,9
Máu	4	8,3
Mủ vết thương	2	4,2
Dịch màng bụng	1	2,1
Phân	1	2,1
	Vi khuẩn phân lập (n=48)	Tỉ lệ
<i>K. pneumoniae</i>	25	52,1
<i>E. coli</i>	13	27,1
<i>A. Baumannii</i>	5	10,4
<i>P. aeruginosa</i>	5	10,4



Phân phối test trong khảo sát

	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CARBA-5 (n=12)	0	0	10 (83,3)	2 (16,7)
CTX-M (n=18)	0	11 (61,1)	7 (38,9)	0
MCR-1 (n=16)	5 (31,1)	1 (6,3)	8 (50)	2 (12,5)



NG - Test CARBA – 5



Bảng 3. Giá trị MIC trung vị của các kháng sinh điều trị CRE.

	Trung vị	Khoảng giá trị
Amikacin (n=11)	16	2 – 64
TZP (n=12)	128	4 – 128
Imipenem (n=11)	16	0 – 16
Meropenem (n=12)	16	0,25 – 16
Colistin (n=11)	1	0,5 – 16
Số ca		
Tỉ lệ %		
Bệnh phẩm (n= 46)		
Dịch hút phế quản	7	58,3%
Đàm	3	25%
Mủ vết thương	1	8,3%
Nước tiểu	1	8,3%
Phân bố vi khuẩn phân lập (n=46)		
<i>K. pneumoniae</i>	10	83,3%
<i>P. aeruginosa</i>	2	16,7%

Bảng 4. Sự phân bố các gene carbapenemase trong mẫu nghiên cứu *K. pneumoniae*

Gene (n = 10)	Tần số	Tỉ lệ
KPC	1	10 %
NDM	0	0 %
OXA-48	3	30%
IMP	0	0
VIM	0	0
OXA-48 + IMP	1	10%
OXA-48 + NDM	5	50%
VIM	0	0 %

So sánh giữa kết quả CARBA – 5 và PCR

Xét nghiệm	Chung		<i>K. pneumoniae</i>	
	PCR, N = 12 ¹	NG- test CARBA- 5, N = 12 ¹	PCR N = 10	NG- test CARBA- 5 N = 10 ¹
IMP				
IMP- Âm	11 (91,7%)	12 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
IMP- Dương	1 (8,3%)	0 (0%)	0	0
KPC				
KPC- Âm	11 (91,7%)	12 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
KPC- dương	1 (8,3%)	0 (0%)	0	0
NDM				
NDM- Âm	7 (58%)	5 (50%)	5 (50%)	3 (30%)
NDM- Dương	5 (42%)	7 (50%)	5 (50%)	7 (70%)
OXA				
OXA- Âm	3 (25%)	3 (25%)	1 (10%)	1 (10%)
OXA- Dương	9 (75%)	9 (75%)	9 (90%)	9 (90%)
VIM				
VIM- Âm	12 (100%)	12 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
VIM-Dương	0 (0%)	0 (0%)	0	0

Bàn luận

- Kết quả test nhanh và khá chính xác.
 - 15 phút kể từ khi phân lập được khuẩn lạc, đối với *Kleb* -> độ tương hợp cao.
 - Phát hiện chính xác OXA-48
 - Hạn chế đối với IMP
- Độ nhạy/ đặc hiệu: thay đổi theo nghiên cứu và các nhóm gene
 - Ying Zhu (2021): Nhạy/ đặc hiệu: 100%/99,8%
 - Stenphem Jenkins (2020) PPA/NPA = 98,0/95,2
 - Của nhà sản xuất: nhạy/ đặc hiệu: 100%/100%

[1] Zhu Y, *Ann Transl Med.* 2021

[2] Jenkins S, *Journal of clinical microbiology.*, 2020



Hạn chế của xét nghiệm

- Kết quả âm tính -> không loại trừ hoàn toàn khả năng vi khuẩn có carbapenemase (IMI, GES, SME).
- Sai sót kỹ thuật, đặc biệt đối với *Proteus mirabilis* [2]
 - Phát triển thành đám trên thạch máu -> bắt cần thận.
- Cần được xác nhận bằng các xét nghiệm khác [1].

[1] S. Jenkins, N. A. Ledebøer (2020)

[2] H. Volland (2019)



Kết luận

- CRE: thử thách đối với nhiễm trùng bệnh viện
 - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, kháng colistin: tăng.
- Kiểu gene carbapenemase -> Sử dụng kháng sinh.
- NG- Test CARBA-5 hứa hẹn như 1 công cụ tầm soát, giúp lâm sàng sớm có quyết định.
- Hướng tương lai: khảo sát với cỡ mẫu lớn hơn, nhiều vi khuẩn hơn.

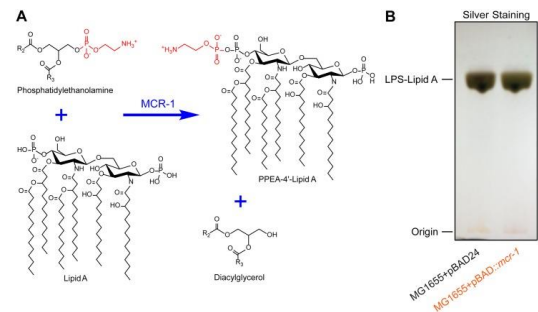


NG – test MCR-1



MCR – 1 và sự đề kháng colistin

- Cơ chế đề kháng colistin
 - Thay đổi bề mặt tế bào, điều chỉnh lớp lipopolysaccharide
 - Mất lớp polysaccharide capsule -> không liên kết với polymyxin.
- *Acinetobacter* sp:
 - Không sản xuất lipopolysaccharide
 - Thay đổi tính thấm màng tế bào



MCR-1

- MCR-1: China, 2015, *E. Coli*.
- *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* and *Salmonella* spp.
- Europe, South America, Asia and Africa 1
- MCR-1 và các biến thể khác nhau: mcr-2, mcr-3, mcr-4...

Thử nghiệm kháng colistin

- Ngưỡng nhạy: xác định khó khăn vì
 - Điều trị colistin đơn độc: kết cục xấu.
 - Liều dùng: phức tạp, điều chỉnh.
 - MIC -> vi pha loãng
 - Tầm soát gene kháng colistin: should be reported
 - Kết quả gene kháng -> không dự đoán được độ nhạy/ kháng colistin.

BACTERIA	SUSCEPTIBLE	INTERMEDIATE	RESISTANT
Enterobacteriaceae			
EUCAST	≤ 2	--	≥ 4
CLSI	-	≤ 2	≥ 4
Acinetobacter spp.*			
EUCAST	≤ 2	--	≥ 4
CLSI	-	≤ 2	≥ 4
Pseudomonas aeruginosa			
EUCAST	≤ 2	--	≥ 4
CLSI	-	≤ 2	≥ 4

Matuschek E. Clin, Microbiol Infect. 2018
Humphries RM, Journal of Clinical Microbiology Oct 2019

HICS
Hội Kiểm soát Nhiễm Khuẩn TP HCM

Kết quả test MCR-1 (n=10)

Kết quả	Kháng colistin (n=16)	MCR-1 (n=16)
Kháng/ Dương	6 (37,5%)	0
Nhạy/ Âm	10 (62,5%)	16 (100%)

Kết quả kháng colistin dựa trên MIC của colistin trên máy VITEK, so sánh theo CLSI
Kháng: MIC/ Colistin > 4 mg/L, Nhạy (trung gian) < 4 mg/L

GLASS - The detection and reporting of colistin resistance
HICS
Hội Kiểm soát Nhiễm Khuẩn TP HCM

NG – test CTX-M Multi

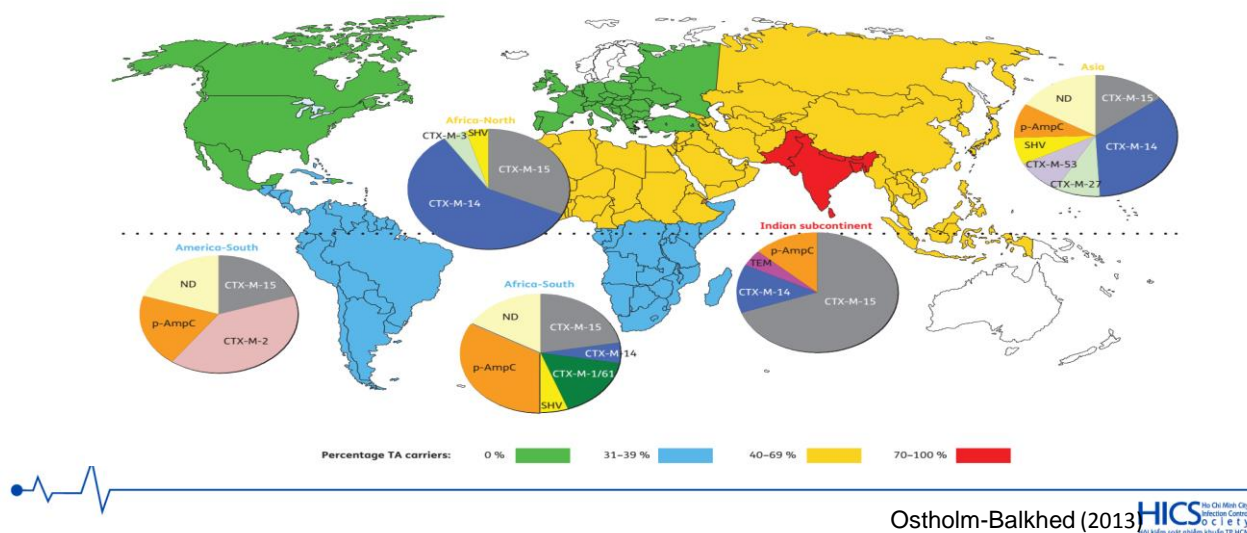


ESBL varieties

- TEM beta lactamase
- SHV betalactamase
- CTX-M Betalactamase
- OXA - Betalactamase
- Others: PER, VEB, GES...
- Xác định ESBL tại lab
 - Hệ thống máy tự động (VITEK-2, MicroScan, and BD Diagnostics)
 - Double disk test
 - E test strip
 - Pyrosequencing and microarray technologies



Sự phân bố gene ESBL trên thế giới



Kết quả thử nghiệm test CTX-M

Kết quả	ESBL (n=19)	Test CTX-M (n=19)
Dương	8 (42,1%)	8 (42,1%)
Âm	11 (57,9%)	11 (57,9%)

Xác định ESBL:

- Kết quả thử nghiệm screening trên máy VITEK.
- Đĩa kháng sinh tầm soát ESBL

Nhận xét

- Có sự tương quan tốt giữa kết quả CTX-M Multi và kết quả chẩn đoán ESBL trên kháng sinh đồ.
- MCR-1 và colistin: không tương quan tốt.



Kết luận

- Vi khuẩn kháng carbapenemase: thử thách.
- Lợi ích cho quá trình điều trị và kiểm soát nhiễm khuẩn.
- Thêm các nghiên cứu với các cỡ mẫu lớn.



XIN CẢM ƠN

