

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц

2013 г.

Регистрационный № 251-1212

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Осипов В.А.

к.м.н. Тапальский Д.В.

д.м.н., профессор Жаворонок С.В.

Гомель, Минск, 2012

В настоящей Инструкции по применению изложен метод выявления штаммов синегнойной палочки (далее – *P.aeruginosa*) с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и является модификацией фенотипического метода выявления МБЛ-продуцирующих штаммов *P.aeruginosa*.

Инфекции, вызванные штаммами *P.aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью, увеличивают сроки лечения в среднем на 17 дней и заканчиваются летально в три раза чаще, чем инфекции, вызванные чувствительными к антибактериальным лекарственным средствам штаммами. МЛУ является отличительной чертой клонального комплекса *P.aeruginosa* 235 (СС235) и его центрального сиквес-типа ST235 – международного эпидемического клона, известного своим глобальным распространением.

Маркером клона *P.aeruginosa* ST235 VIM-2 является продукция металло-бета-лактамаз (далее – МБЛ) типа VIM-2, класса В.

МБЛ являются металлосодержащими гидролазами, в активном центре которых содержатся атомы цинка. Опасность ферментов данного класса обусловлена их высокой каталитической активностью и способностью к быстрому горизонтальному распространению в бактериальных популяциях. Отдельные клоны мультирезистентных МБЛ-продуцентов способны быстро распространяться на обширных географических территориях и вызывать серьезные инфекции, с трудом поддающиеся терапии.

МБЛ гидролизуют не только карбапенемы, но и большинство других бета-лактамных антибиотиков, включая пенициллины и цефалоспорины. Кроме того, МБЛ не чувствительны к ингибиторам сериновых β -лактамаз (клавуланат, сульбактам, тазобактам). Активность МБЛ подавляется этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) и другими металлохелаторами, однако использование этих соединений в качестве ингибиторов МБЛ невозможно в антибактериальной терапии вследствие их высокой токсичности для макроорганизма. Хелатирующие агенты (ЭДТА, β -меркаптопропионовая кислота, дипиколиновая кислота) могут использоваться в микробиологической диагностике для фенотипического скрининга МБЛ-продуцентов.

Большинство генов, кодирующих продукцию приобретенных МБЛ, входят в состав интегронов, которые обладают высокой мобильностью и быстро распространяются между микроорганизмами с помощью плазмид и транспозонов. Кроме генов МБЛ, такие интегроны содержат в своем составе дополнительные генные кассеты, несущие детерминанты устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам других классов (например, аминогликозидам и хлорамфениколу) и дезинфектантам. Также в составе интегронов могут присутствовать гены других β -лактамаз, поэтому передача интегронов приводит к одномоментной передаче сложного фенотипа множественной лекарственной устойчивости. По этой причине штаммы клона *P.aeruginosa* ST235 VIM-2 устойчивы не только к карбапенемам, но и к антисинегнойным лекарственным средствам других групп: фторхинолонам, аминогликозидам и фосфомицину. Выделены штаммы *P.aeruginosa* ST235, устойчивые к колистину.

В этой ситуации только своевременная микробиологическая диагностика и строгое соблюдение мер инфекционного контроля в стационарах являются единственным путем сдерживания распространения штаммов синегнойной с МЛУ.

Настоящая Инструкция по применению предназначена для врачей-бактериологов, врачей лабораторной диагностики лабораторий клинической микробиологии организаций здравоохранения.

Показания к применению

1. Осуществление инфекционного контроля распространения штаммов *P.aeruginosa* с МЛУ в отделениях реанимации и интенсивной терапии, ожоговых и хирургических отделениях стационаров и определение возможности проведения терапии с использованием лекарственных средств группы карбапенемов

2. Метод может быть применен также для выявления продукции метало-бета-лактамаз у некоторых других видов циркулирующих во внутрибольничной среде грамотрицательных бактерий, устойчивых к карбапенемам (Приложение 1).

Противопоказания к применению

Отсутствуют.

Материально-техническое обеспечение метода

1. Стандартное оборудование и материалы микробиологической лаборатории для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам.

2. Контрольные штаммы (*контрольные штаммы можно получить по запросу на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», тел. (0232) 70 32 60:*

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – отрицательный контроль, МБЛ-;

- *Pseudomonas aeruginosa* 565 VIM-2 – положительный контроль, МБЛ+.

3. Стандартные материалы для выявления МБЛ:

- агар Мюллера-Хинтона;

- диски с имипенемом 10 мкг;

4. Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль (ЭДТА) – 0,5М водный раствор.

Реализация метода, изложенного в настоящей инструкции по применению, осуществляется с учетом Инструкции по применению № 226-1200 от 22.12.2008 «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Фенотипическое выявление продукции МБЛ у бактерий основано на способности ЭДТА подавлять гидролитическую активность металло-бета-лактамаз в отношении бета-лактамных субстратов. При определении чувствительности МБЛ продуцентов диско-диффузионным методом в присутствии ЭДТА наблюдается расширение зон подавления роста вокруг дисков с бета-лактамными антибиотиками, связанное с ингибированием МБЛ и восстановлением активности бета-лактамов.

Приготовление 0,5 М водного раствора ЭДТА. Навеску 0,15 г ЭДТА помещают в стерильную микропробирку типа Эппендорф, доводят до 1 мл нагретой до 80°C стерильной дистиллированной водой, и

растворяют путем встряхивания. Полученный раствор содержит 150 мг/мл ЭДТА, достаточно стабилен и не теряет своих свойств в течение месяца.

Чтобы избежать лишних затрат времени, можно готовить диски заранее. Приготовленного раствора ЭДТА достаточно для приготовления 100 дисков. Для этого стандартные диски с имипенемом (10 мкг) помещают в стерильную чашку Петри, используя стерильные наконечники наносят на каждый из них по 10 мкл приготовленного раствора ЭДТА. Готовые диски, закрыв чашку Петри крышкой, подсушивают в термостате в течение 10 мин при 37°C. Приготовленные диски ИЭДТА (имипенем 10 мкг + 1500 мкг ЭДТА) можно хранить в морозильной камере бытового холодильника при температуре -20°C без значительной потери активности в течение 3 месяцев.

Постановка теста

Постановку теста осуществляют в соответствии с методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам диско-диффузионным методом.

1. Для приготовления инокулюма используют чистую суточную культуру исследуемого микроорганизма, выращенную на простом питательном агаре. Несколько колоний стерильным тампоном или петлей переносят в пробирку с 3 мл стерильного физиологического раствора. Взвесь бактериальных клеток доводят до мутности 0,5 по МакФарланду и наносят стерильным ватным тампоном на поверхность агара Мюллера-Хинтон.

2. Через 5–10 мин после инокуляции на подсохшую поверхность агара накладывают два диска с имипенемом (10 мкг) на расстоянии не ближе 30 мм между центрами. На один из них стерильным наконечником дозатора наносят 10 мкл 0,5 М раствора ЭДТА. Параллельно с анализом испытуемых штаммов проводят исследование контрольных штаммов.

3. Чашки инкубируют в термостате при 35°C в течение 16-18 часов.

Учет и интерпретация результатов

Расширение зоны подавления роста (≥ 3 мм) вокруг диска с ИЭДТА (имипенем 10 мкг + (1500 мкг) ЭДТА) по сравнению с зоной задержки

роста у стандартного диска имипенема (10 мкг) указывает на продукцию МБЛ тестируемым штаммом микроорганизма (рис. 1).

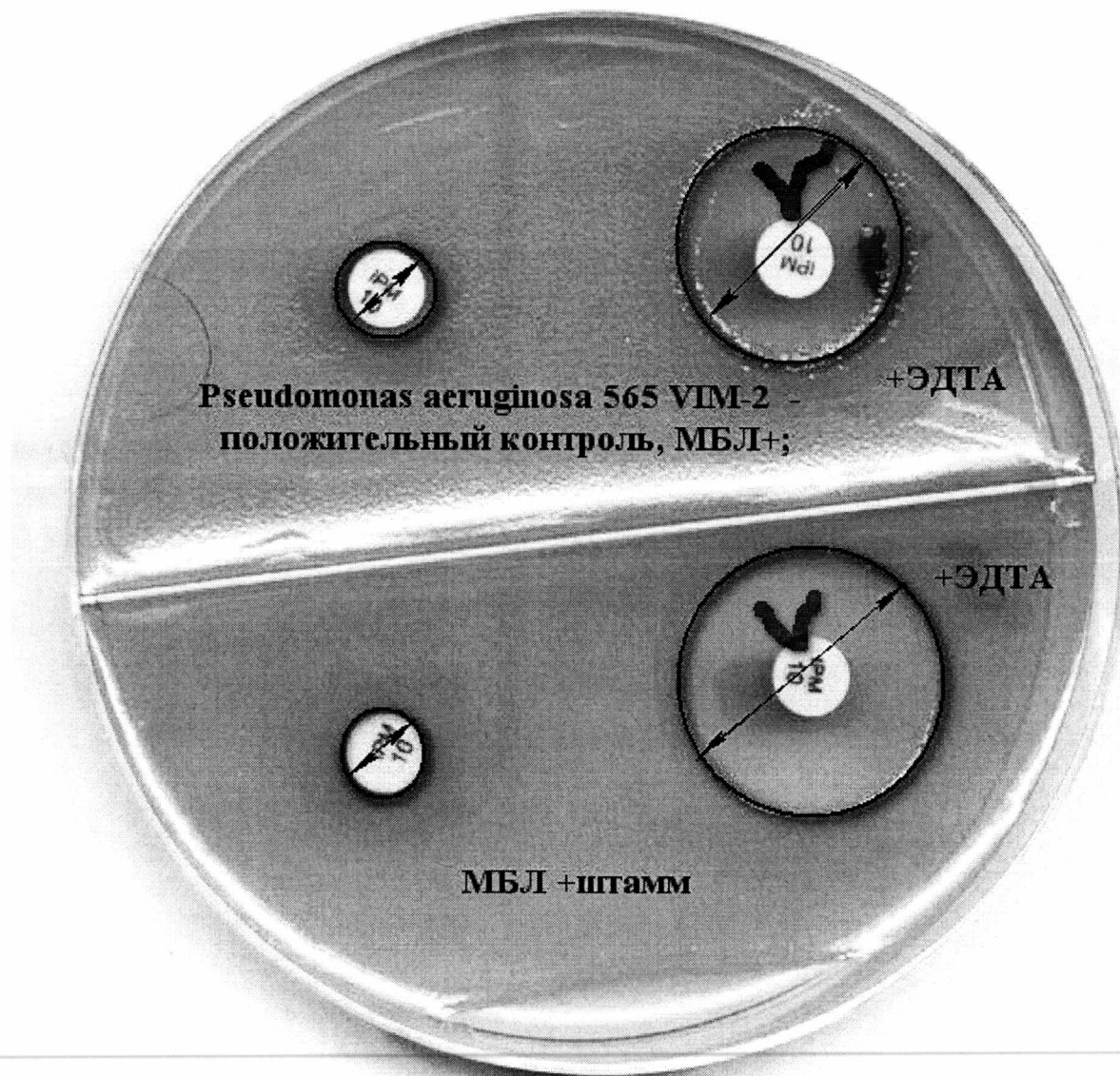


Рисунок 1. Выявление продукции МБЛ модифицированным методом

Возможные трудности при интерпретации результатов

При соблюдении всех требований инструкции по применению от 22.12.2008 № 226-1200 при постановке диско-диффузионного теста в большинстве случаев зона задержки роста у МБЛ+(положительных) штаммов *P.aeruginosa* ST235 VIM-2 вокруг диска с имипенемом (10мкг) отсутствует, а зона задержки роста вокруг диска с ИЭДТА > 7 мм. При возникновении трудностей интерпретации результатов следует учитывать, что у МБЛ-негативных штаммов зоны задержки роста вокруг диска с ИЭДТА всегда ≤ 17

мм, а у МБЛ+(положительных штаммов) зоны задержки роста вокруг диска с ИЭДТА всегда ≥ 20 мм. На рисунках 2-5 приведены типичные результаты выявления продукции МБЛ различными штаммами *P.aeruginosa*.

Избежать ошибочных результатов при определении чувствительности диско-диффузионным методом и выборе антибактериального лекарственного средства для адекватной терапии помогают регулярно корректируемые рекомендации Европейского комитета по определению чувствительности (EUCAST). Адрес веб-сайта: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.

В большинстве случаев удается выявить основные механизмы резистентности *P.aeruginosa* и подобрать лекарственные средства для лечения, поместив на одну чашку диаметром 90 мм 9 дисков с АБП, рекомендованных EUCAST для определения чувствительности *P.aeruginosa* (Приложение 2).

На рисунке 6 представлена схема стандартного (с помощью диспенсера) размещения 8 дисков с антибактериальным лекарственным средством на чашке Петри. Диск ИЭДТА (имипенем 10 мкг +ЭДТА 1500 мкг) помещают в центре с помощью пинцета.

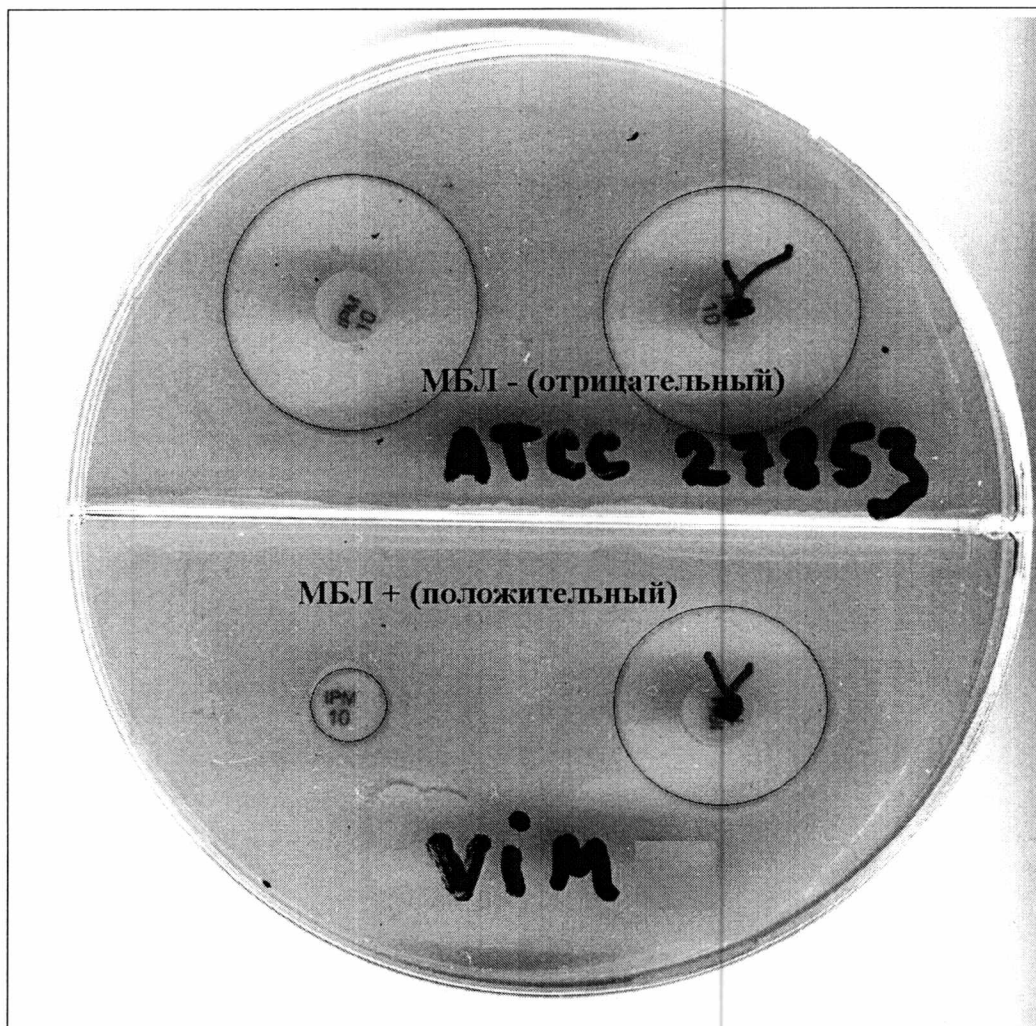


Рисунок 2. Результаты тестирования контрольных штаммов *P.aeruginosa* ATCC 27853 и *P.aeruginosa* 565 VIM-2

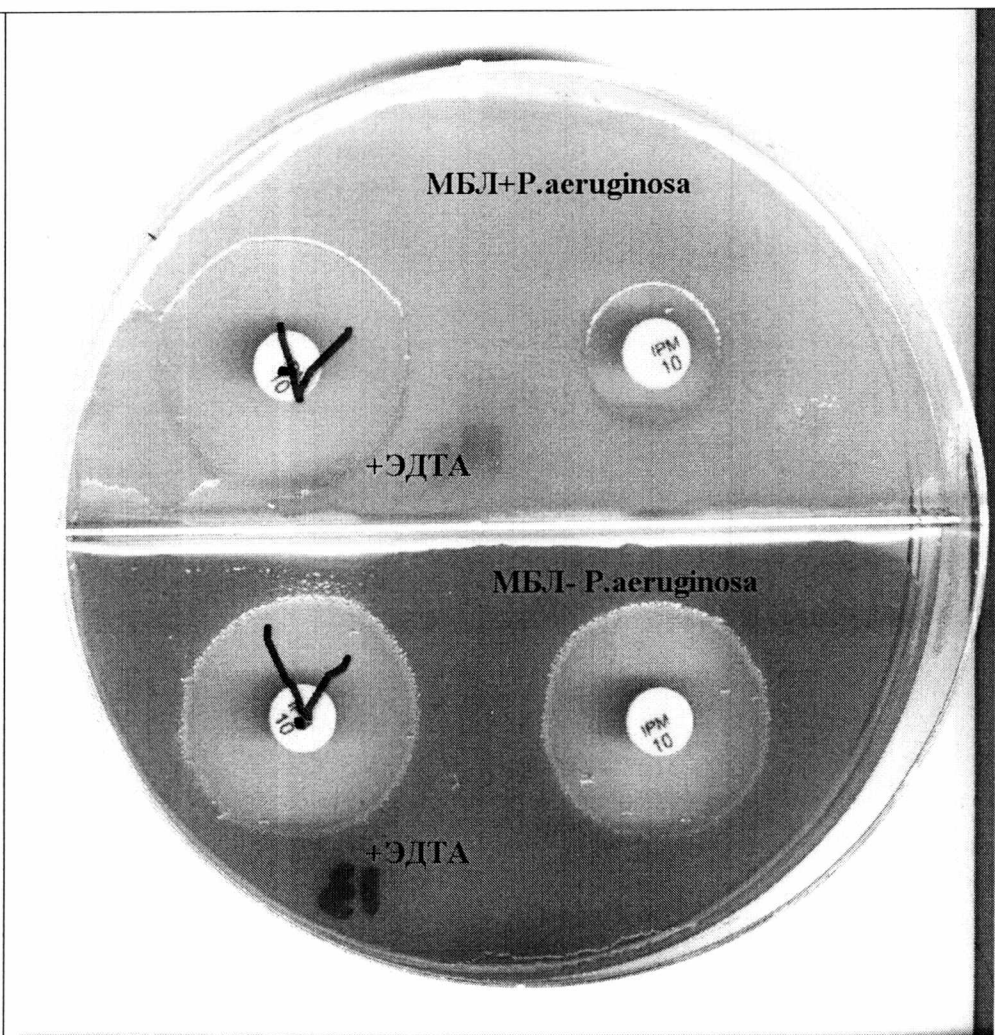


Рисунок 3. Результаты тестирования МБЛ-положительного и МБЛ-негативного изолятов *P.aeruginosa*

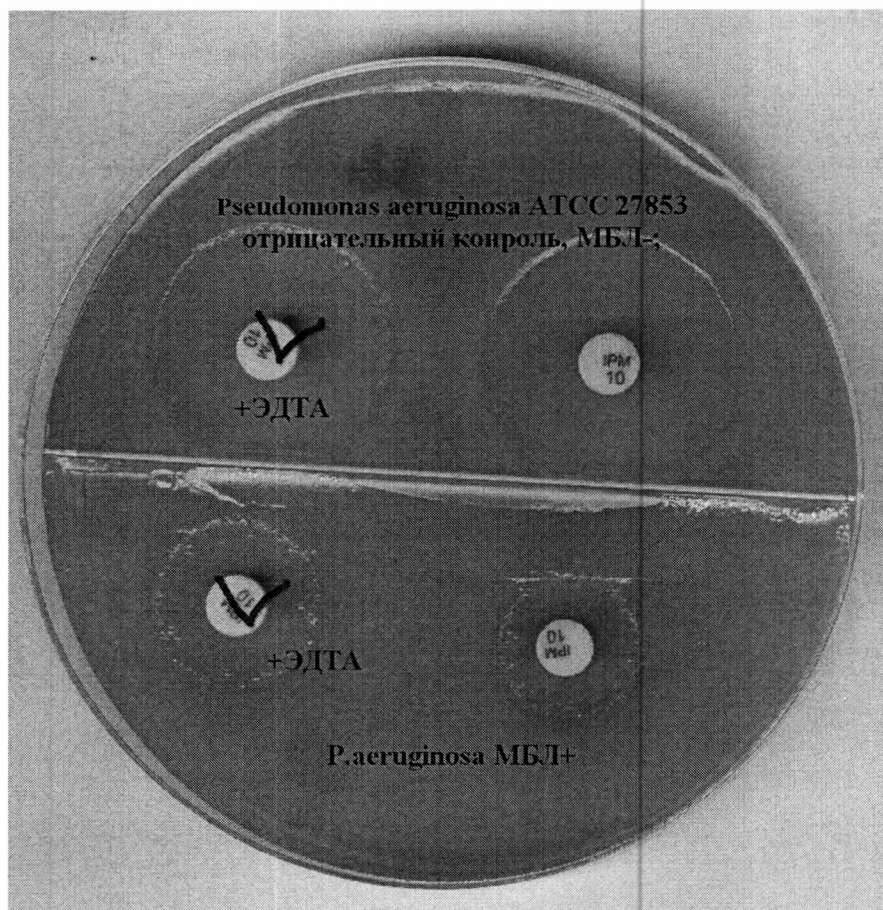


Рисунок 4. Результаты тестирования МБЛ-негативного контрольного штамма *P.aeruginosa* ATCC 27853 и МБЛ-позитивного изолята *P.aeruginosa*

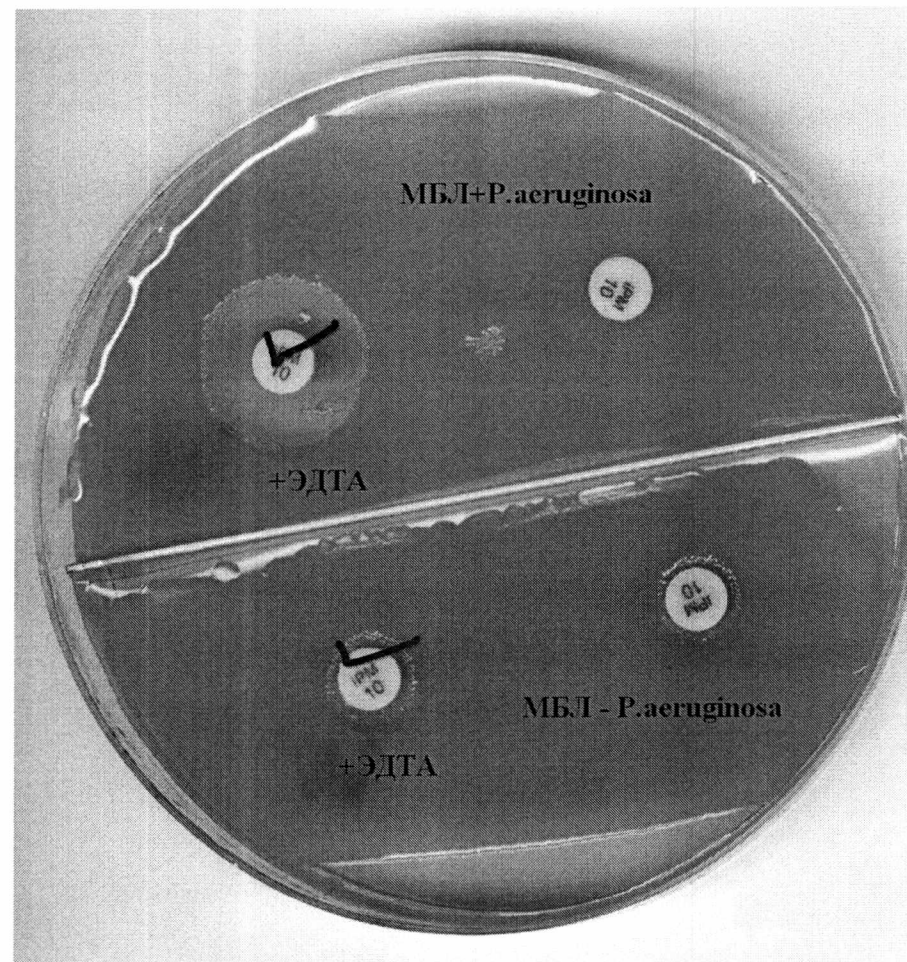


Рисунок 5. Результаты тестирования МБЛ-позитивного *P.aeruginosa* и карбапенемрезистентного МБЛ-негативного изолята *P.aeruginosa* с иным механизмом устойчивости к имипенему

Расположение дисков с антибактериальным лекарственным средством на 90мм чашке			
Антибактериальный препарат	Содержание в диске, мкг	Диаметр зоны задержки роста, мм	
		S \geq	R<
1. Имипенем (IMP)	10	20	17
2. Нетилмицин (NET)	10	12	12
3. Тобрамицин (NN)	10	16	16
4. Гентамицин (GM)	10	15	12
5. Цефтазидим (CAZ)	10	16	16
6. Амикацин (AN)	30	18	15
7. Ципрофлоксацин (CIP)	5	25	22
8. Азтреонам (ATM)	30	50	16
9. Имипенем (10 мкг) +ЭДТА (1500мкг)			

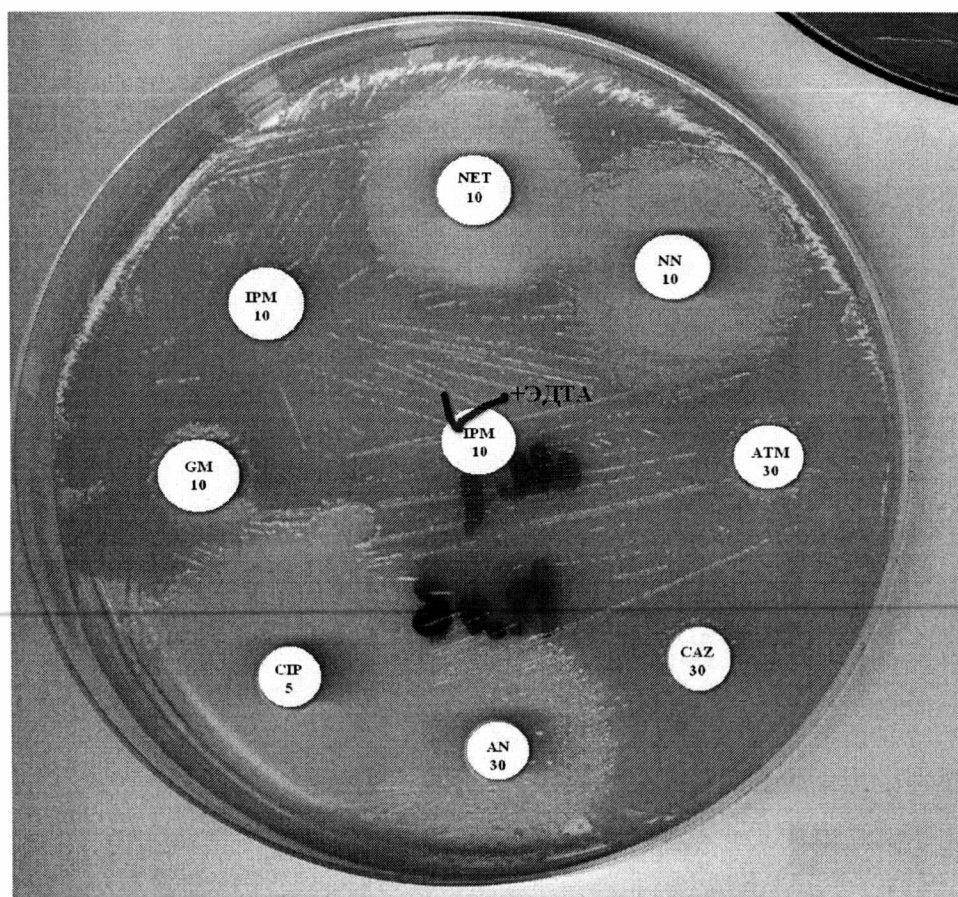


Рисунок 6. Выявление резистентности *P. aeruginosa* к основным противосинегнойным антибактериальным лекарственным средствам

**Распространение приобретенных карбапенемаз
среди клинически значимых видов грамотрицательных бактерий**
(Miriagou et al. , Clin Microbiol Infect 2010; 16: 112–122)

Organism	МБЛ (Класс В)	КРС (GES) (Класс А)	ОХА (Класс D)
Неферментеры			
Pseudomonas aeruginosa	+++	+	+
Pseudomonas putida	+	+	
Acinetobacter baumannii	+ ^a		++
Acinetobacter spp.	+	+	+
Энтеробактерии			
Klebsiella pneumoniae	+ ^a	++	+
Escherichia coli	+	+	+
Proteus mirabilis	+		+
Providencia spp.	+		
Klebsiella oxytoca	+	+	
Serratia marcescens	+ ^a	+	
Enterobacter spp.	+ ^a	+	
Citrobacter freundii	+	+	
Morganella morganii	+		
Salmonella enterica		+	
Raoultella spp.		+	
<p>++ широко распространенные ферменты среди штаммов данного вида; + встречаются единичные штаммы, имеющие данный фермент; +^a эндемик в некоторых регионах. Кресты, выделенные жирным шрифтом, обозначают более высокую распространенность среди соответствующих видов.</p>			

Рекомендации EUCAST (Европейский комитет по определению чувствительности к антибактериальным лекарственным средствам) для тестирования антибиотикочувствительности штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 2.0, valid from 2012-01-01)

АБП	МИК (мг/л)		Содержание в диске (мкг)	Диаметр зоны задержки роста (мм)		Примечания
	S≤	R>		S≥	<R	
Пенициллины						
Пиперациллин ¹	16	16	30	19	19	1. МИК рассчитана на высокие дозы терапии (с или без тазобактама 4 г х 4)
Пиперациллин – тазобактам ¹	16 ²	16 ²	30-6	19	19	2. Для определения чувствительности установлена концентрация ингибитора бета-лактамазы 4 мг/л
Тикарциллин ³	16	16	75	17	17	3. МИК рассчитана на высокие дозы терапии (с или без клавуланата 3 г х 4)
Тикарциллин-клавуланат ³	16 ²	16 ²	75-10	17	17	
Цефалоспорины						
Цефепим	8 ¹	8	30	18	18	1. МИК рассчитана на высокие дозы терапии (2 г х 3)
Цефтазидим	8 ¹	8	10	16	16	
Карбапенемы						
Дорипенем	1	4	10	25	19	
Имипенем	4 ¹	8	10	20	17	1. МИК рассчитана на высокие дозы терапии (1 г х 4)
Меропенем	2	8	10	24	18	
Монобактамы						
Азтреонам	1	16 ¹	30	50	16	1. МИК рассчитана на высокие дозы терапии. Чувствительны или умеренно - устойчивы только дикие штаммы
Фторхинолоны						
Ципрофлоксацин	0,5	1	5	25	22	
Левифлоксацин	1	2	5	20	17	
Аминогликозиды¹						
Амикацин	8	16	30	18	15	1.МИК рассчитана на терапию высокими суточными дозами. Чаще всего аминогликозиды назначают в комбинации с бета-лактамами.
Гентамицин	4	4	10	15	12	
Нетилмицин	4	4	10	12	12	
Тобрамицин	4	4	10	16	16	
Разных групп						
Колистин	4	4		Λ	Λ	Λ используют только метод разведений.

Общие требования EUCAST: среда тестирования: Мюллер-Хинтон агар; **инокулят:** 0,5 McFarland; **инкубация:** +35 ± 1°C, 18 ± 2 часа; **учет результатов:** измерение зоны задержки зоны со стороны задней стенки чашки на черном фоне с подсветкой; **контроль качества:** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853