

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



**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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
22.04.2013  
Регистрационный № 251-1212

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ  
УСТОЙЧИВОСТИ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Гомельский государственный  
медицинский университет», УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»

АВТОРЫ: В.А. Осипов, канд. мед. наук Д.В. Тапальский, д-р мед. наук, проф.  
С.В. Жаворонок

Гомель 2012

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод выявления штаммов синегнойной палочки (далее — *P. aeruginosa*) с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), который 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, ассоциированные с чувствительными к антибактериальным лекарственным средствам (АЛС) штаммами. МЛУ является отличительной чертой клонального комплекса *P. aeruginosa* 235 (CC235) и его центрального сиквеса-типа ST235 — международного эпидемического клона, известного своим глобальным распространением.

Маркером клона *P. aeruginosa* ST235 VIM-2 является продукция металло- $\beta$ -лактамаз (МБЛ) типа VIM-2, класса B.

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  $\beta$ -лактамных антибиотиков, включая пенициллины и цефалоспорины. Кроме того, МБЛ нечувствительны к ингибиторам сериновых  $\beta$ -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,  $\beta$ -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  $\beta$ -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 палочкой с МЛУ.

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

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **Материально-техническое обеспечение**

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) — 0,5 М водный раствор.

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

### **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 и использования лекарственных средств группы карбапенемов.

2. Метод может быть применен также для выявления продукции МБЛ у некоторых других видов циркулирующих во внутрибольничной среде грамотрицательных бактерий, устойчивых к карбапенемам (приложение 1).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Фенотипическое выявление продукции МБЛ у бактерий основано на способности ЭДТА подавлять гидролитическую активность МБЛ в отношении

бета-лактамов субстратов. При определении чувствительности МБЛ продуцентов диско-диффузионным методом в присутствии ЭДТА наблюдается расширение зон подавления роста вокруг дисков с  $\beta$ -лактамовыми 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. Полученного 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 мес.

#### **Постановка теста**

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

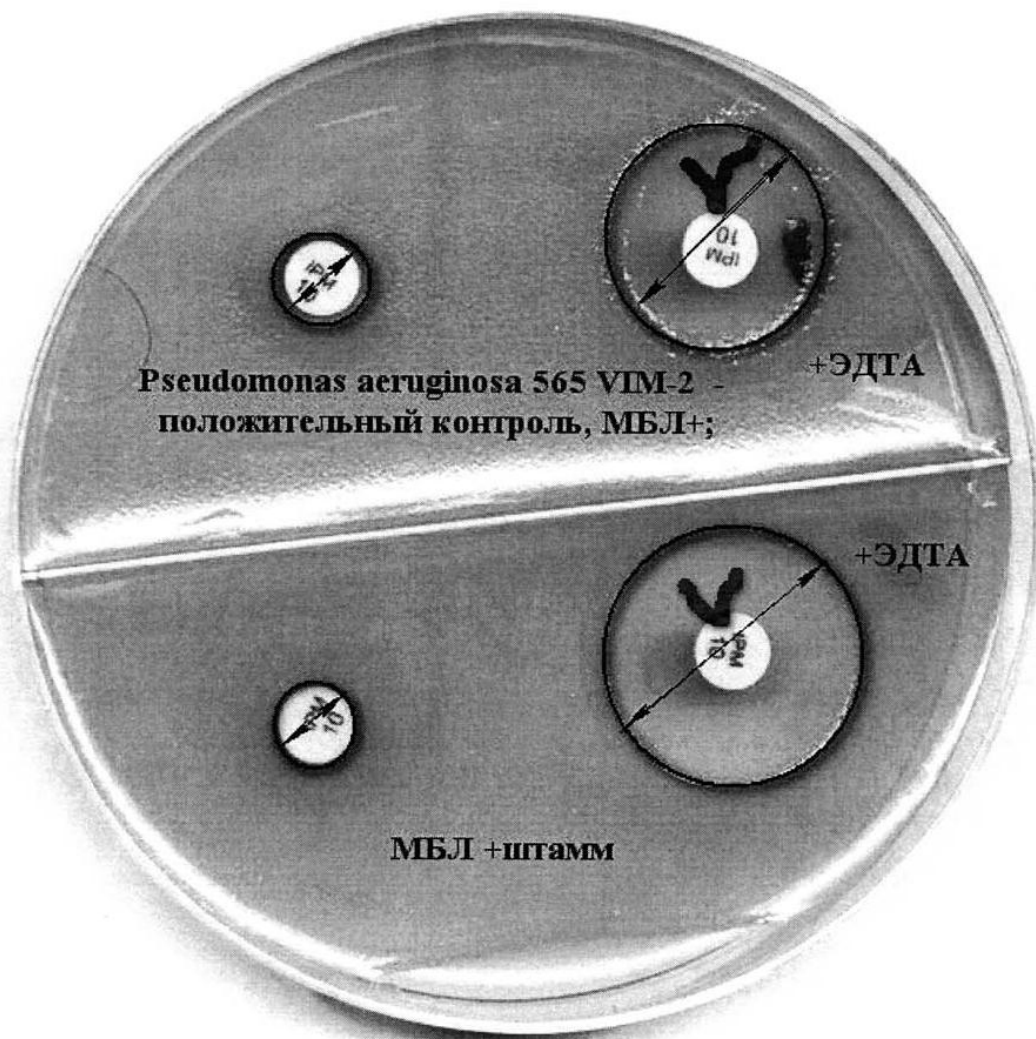
1. Для приготовления инокулюма используют чистую суточную культуру исследуемого микроорганизма, выращенную на простом питательном агаре. Несколько колоний стерильным тампоном или петлей переносят в пробирку с 3 мл стерильного физиологического раствора. Взвесь бактериальных клеток доводят до мутности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

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 ч.

#### **Учет и интерпретация результатов**

Расширение зоны подавления роста ( $\geq 3$  мм) вокруг диска с ИЭДТА (имипенем 10 мкг + ЭДТА 1500 мкг) по сравнению с зоной задержки роста у стандартного диска имипенема (10 мкг) указывает на продукцию МБЛ тестируемым штаммом микроорганизма (рисунок 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 (10 мкг) 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  $\leq 17$  мм, а у МБЛ-положительных штаммов зоны задержки роста вокруг диска с ИЭДТА всегда  $\geq 20$  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 ЛС 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 удастся выявить основные механизмы резистентности *P. aeruginosa* и подобрать лекарственные средства для лечения, поместив на одну чашку диаметром 90 мм 9 дисков с АБП, рекомендованным EUCAST для определения чувствительности *P. aeruginosa* (приложение 2).

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

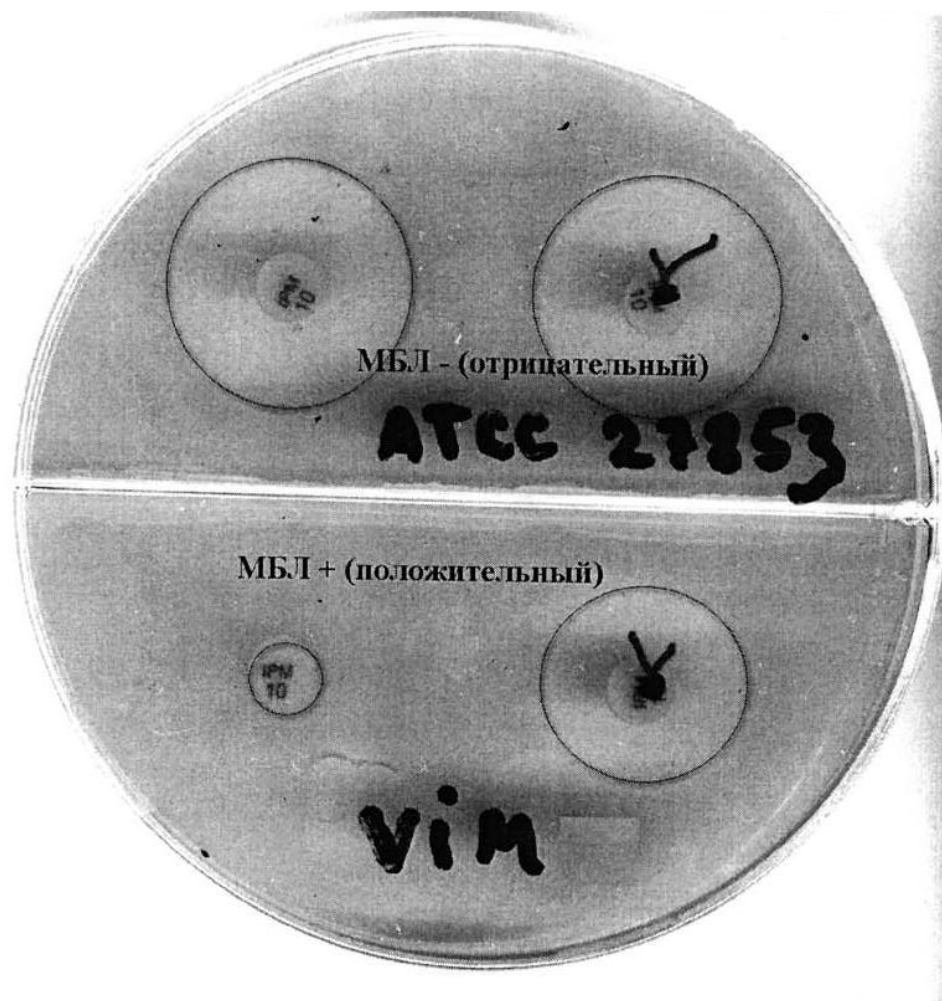


Рисунок 2. — Результаты тестирования контрольных штаммов *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* 565 VIM-2

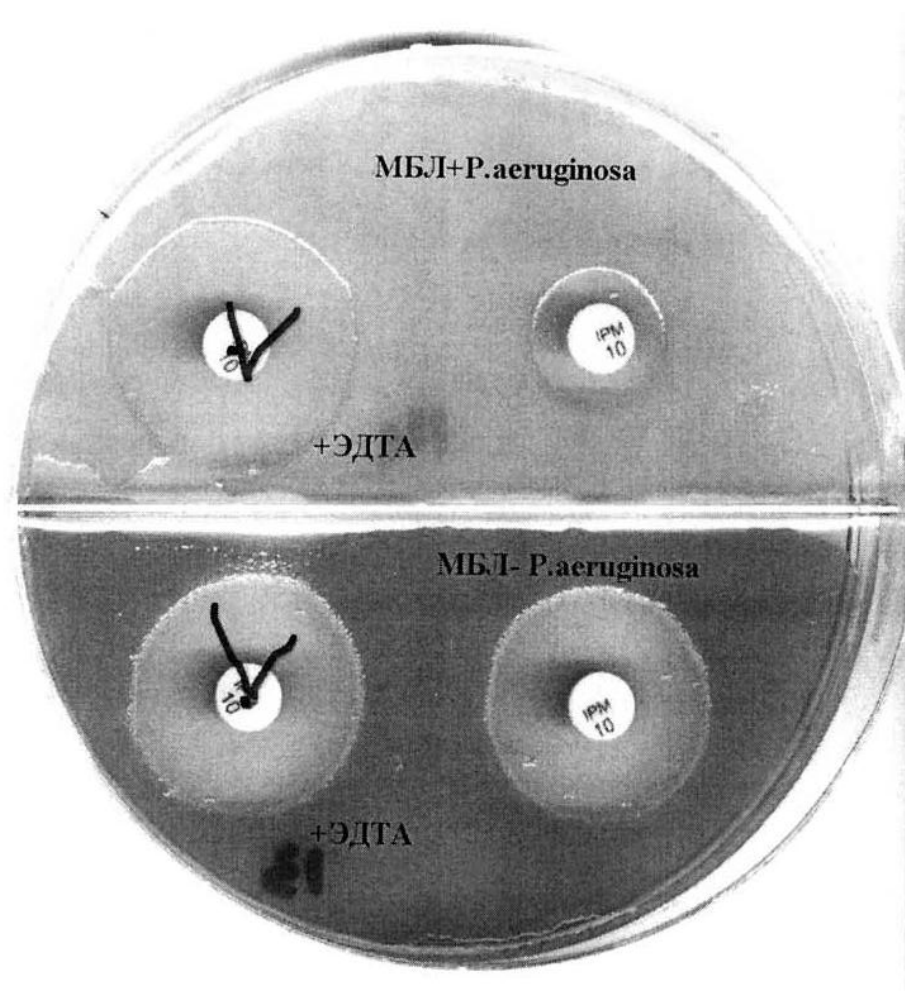


Рисунок 3. — Результаты тестирования МБЛ-положительного и МБЛ-негативного изолятов *P. aeruginosa*



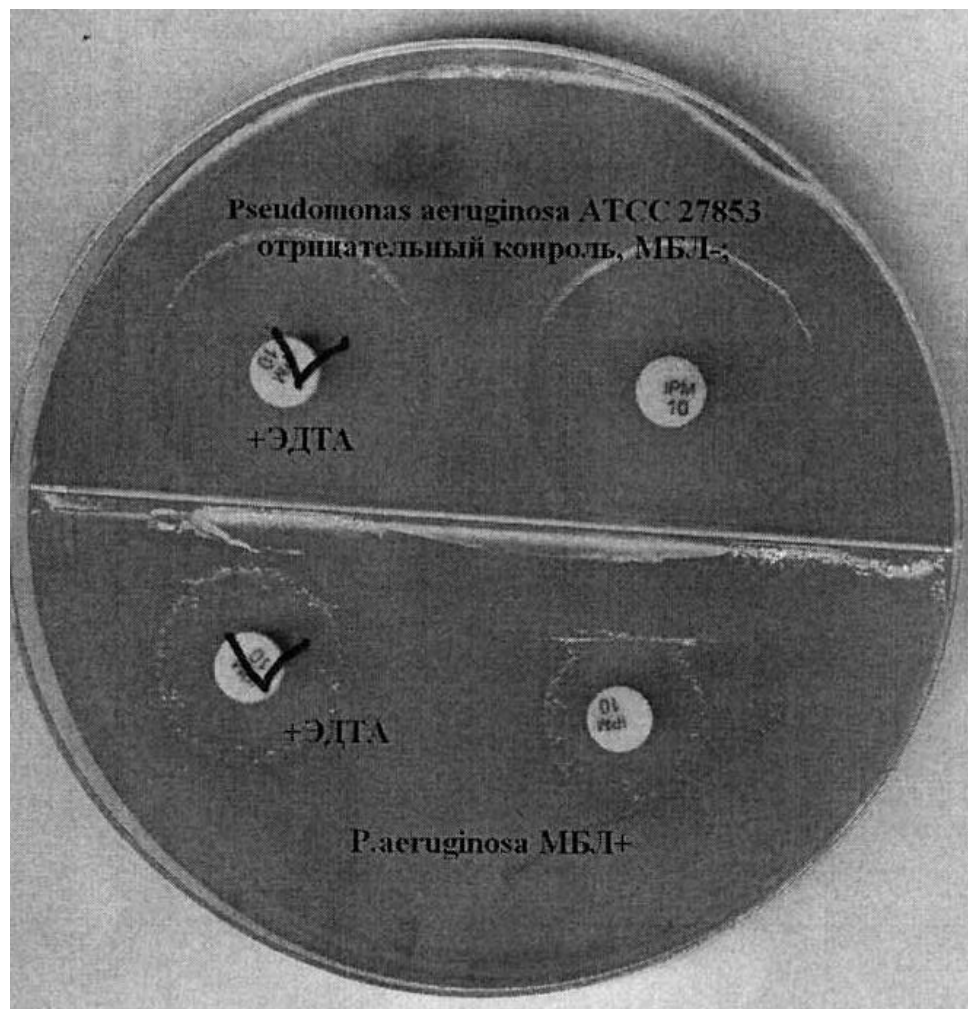


Рисунок 4. — Результаты тестирования МБЛ-негативного контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 и МБЛ-положительного изолятора *P. aeruginosa*

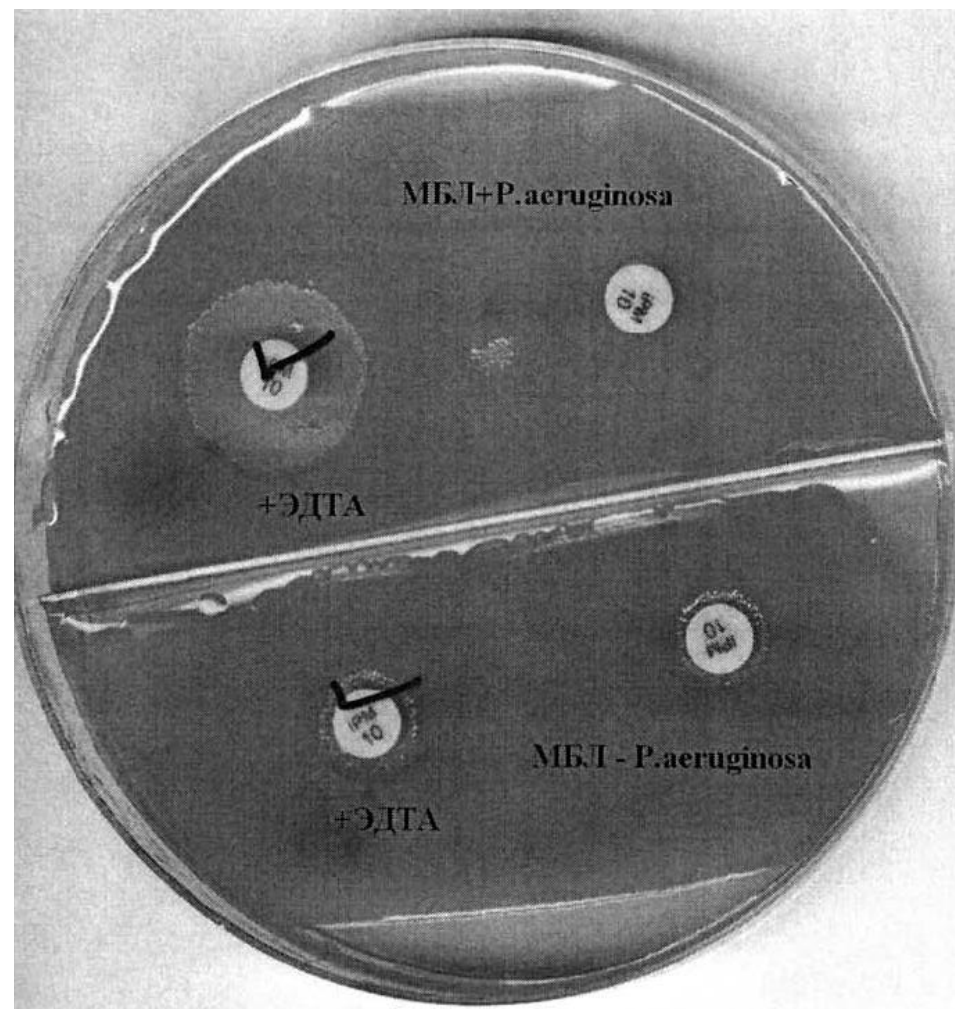


Рисунок 5. — Результаты тестирования МБЛ-положительного *P. aeruginosa* и карбапенемрезистентного МБЛ-негативного изолятора *P. aeruginosa* с иным механизмом устойчивости к имипенему

Расположение дисков с антибактериальным лекарственным средством на 90 мм чашке			
Антибактериальный препарат	Содержание в диске, мкг	Диаметр зоны задержки роста, мм	
		S <sub>≥</sub>	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 (1500 мкг)			

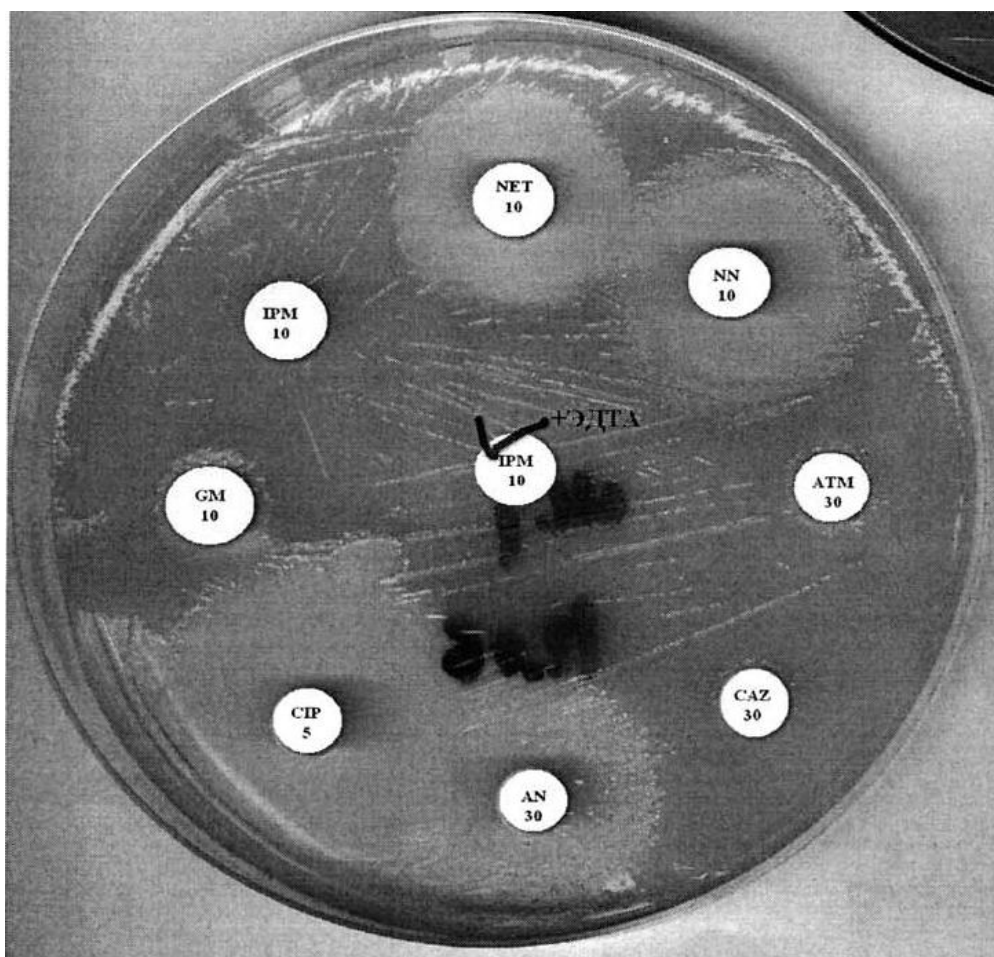


Рисунок 6. — Выявление резистентности *P. aeruginosa* к основным противосинегнойным антибактериальным лекарственным средствам

**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)
<b>Неферментеры</b>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+ <sup>a</sup>		++
<i>Acinetobacter spp.</i>	+	+	+
<b>Энтеробактерии</b>			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+ <sup>a</sup>	++	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+		+
<i>Providencia spp.</i>	+		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	
<i>Serratia marcescens</i>	+ <sup>a</sup>	+	
<i>Enterobacter spp.</i>	+ <sup>a</sup>	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	
<i>Morganella morganii</i>	+		
<i>Salmonella enterica</i>		+	
<i>Raoultella spp.</i>		+	
<p>++ — широко распространенные ферменты среди штаммов данного вида;  + — встречаются единичные штаммы, имеющие данный фермент;  +<sup>a</sup> — эндемик в некоторых регионах.  <b>Кресты</b>, 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 Clinica 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 <sub>≤</sub>	R <sub>&gt;</sub>		S <sub>≥</sub>	<R	
<b>Пенициллины</b>						
Пиперациллин <sup>1</sup>	16	16	30	19	19	1. МИК рассчитана на высокие дозы терапии (с или без тазобактама 4 г × 4)
Пиперациллин – тазобактам <sup>1</sup>	16 <sup>2</sup>	16 <sup>2</sup>	30-6	19	19	2. Для определения чувствительности установлена концентрация ингибитора β-лактамазы 4 мг/л
Тикарциллин <sup>3</sup>	16	16	75	17	17	3. МИК рассчитана на высокие дозы терапии (с или без клавуланата 3 г × 4)
Тикарциллин-клавуланат <sup>3</sup>	16 <sup>2</sup>	16 <sup>2</sup>	75-10	17	17	
<b>Цефалоспорины</b>						
Цефепим	8 <sup>1</sup>	8	30	18	18	1. МИК рассчитана на высокие дозы терапии (2 г × 3)
Цефтазидим	8 <sup>1</sup>	8	10	16	16	
<b>Карбапенемы</b>						
Дорипенем	1	4	10	25	19	
Имипенем	4 <sup>1</sup>	8	10	20	17	1. МИК рассчитана на высокие дозы терапии (1 × 4)
Меропенем	2	8	10	24	18	
<b>Монобактамы</b>						
Азтреонам	1	16 <sup>1</sup>	30	50	16	1. МИК рассчитана на высокие дозы терапии. Чувствительны или умеренно- и устойчивы только дикие

						штаммы
<b>Фторхинолоны</b>						
Ципрофлоксацин	0,5	1	5	25	22	
Левифлоксацин	1	2	5	20	17	
<b>Аминогликозиды<sup>1</sup></b>						1. МИК рассчитана на терапию высокими суточными дозами. Чаще всего аминогликозиды назначают в комбинации с β-лактамами
Амикацин	8	16	30	18	15	
Гентамицин	4	4	10	15	12	
Нетилмицин	4	4	10	12	12	
Тобрамицин	4	4	10	16	16	
<b>Разных групп</b>						
Колистин	4	4		A	A	A используют только метод разведений

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