

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

 А.А. Тарасенко

2021

Регистрационный № 001-0421

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОЛИМИКСИНАМ
У ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская,
Е. В. Тимошкова, О. В. Осипкина

Гомель 2021

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А. А. Тарасенко

21.05.2021

Регистрационный № 001-0421

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОЛИМИКСИНАМ
У ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская,
Е. В. Тимошкова, О. В. Осипкина

Гомель 2021

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен микробиологический метод выявления устойчивости к полимиксинам у энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями с экстремальной устойчивостью к антибиотикам.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей — клинических фармакологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающих инфекциями, вызванными грамотрицательными бактериями с экстремальной устойчивостью к антибиотикам.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Медицинские изделия

1. Стерилизатор паровой.
2. Стерилизатор воздушный.
3. Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с ГОСТ 6709-72.
4. Холодильник бытовой.
5. Облучатель бактерицидный.
6. Весы электронные (предел измерений 200 г, погрешность $\pm 0,001$ г) или торсионные.
7. Вортекс орбитальный.
8. Денситометр (измеритель оптической плотности суспензий).
9. Механические дозаторы лабораторные одноканальные переменного объема: 2–20; 20–200; 200–1000 мкл.
10. Механические дозаторы лабораторные 8-канальные переменного объема: 5–50; 30–300 мкл.
11. Посуда лабораторная стеклянная (колбы, пробирки) по ГОСТ 1770-74.
12. Емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала.
13. Штативы для пробирок.
14. Спиртовка.
15. Инструменты лабораторные (пинцеты, петли микробиологические, ножницы).

Реактивы, реагенты и питательные среды

1. Бульон Мюллера–Хинтона (МХБ);
2. Вода дистиллированная, стерилизованная автоклавированием.
3. Натрий хлористый, х.ч. по ГОСТ 4233-77.
4. Спирт этиловый технический ГОСТ 18300-87.

Расходные материалы

1. Тампоны хлопковые.
2. Наконечники для автоматических дозаторов в штативах, стерильные (2–20; 20–200; 200–1000 мкл).

3. Чашки Петри полистироловые, диаметр 90 мм, стерильные.
4. Пробирки полипропиленовые, объем 10–20 мл, с крышками, стерильные.
5. Планшеты полистироловые круглодонные 96-луночные с крышками, стерильные.

6. Крафт бумага или крафт-пакеты для стерилизации.

Субстанции антибиотиков

1. Колистина сульфат.
2. Полимиксин Б.

Контрольные культуры микроорганизмов

1. *Escherichia coli* ATCC 25922.
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты

1. Халат лабораторный.
2. Перчатки латексные или нитриловые.
3. Раствор антисептика, предназначенный для обработки рук персонала.
4. Раствор дезинфицирующий для инактивации биологического материала.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Выявление устойчивости к полимиксинам у клинических изолятов энтеробактерий (*Klebsiellapneumoniae*, *Klebsiellaoxytoca*, *Escherichiacoli*, *Enterobacterspp.*, *Citrobacterspp.*) и грамотрицательных неферментирующих бактерий (*Pseudomonasaeruginosa*, *Acinetobacterspp.*).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод не применяется в отношении микроорганизмов, имеющих природную (видовую) устойчивость к полимиксинам: все грамположительные бактерии, *Neisseriaspp.*, *Proteusspp.*, *Serratiaspp.*, *Edwardsiellaspp.*, *Providenciaspp.*, *Morganellaspp.*, *Pseudomonasmallei*, *Burkholderiacepacia*.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Приготовление основных и рабочих растворов антибиотиков

1.1. Чистые субстанции антибиотиков должны быть получены непосредственно от изготовителя или из надежных коммерческих источников, фармацевтические препараты для клинического применения неприемлемы. Колистин необходимо использовать в форме колистина сульфата. Колистиметат натрия является неактивным пролекарством и не должен использоваться для микробиологического тестирования. Субстанции антибиотиков следует хранить в плотно закрытых контейнерах в темноте при температуре 4–8 °С, если иное не рекомендовано изготовителем. Чтобы избежать конденсации водяных паров, следует выдержать контейнеры в течение 30 мин при комнатной температуре перед открытием.

1.2. Для приготовления основного раствора с концентрацией 10 000 мг/л 50 мг субстанции антибиотика внести в пробирку, содержащую 4,95 мл дистиллированной воды. Перемешивать на вортексе до полного растворения.

1.3. Приготовленные основные растворы можно хранить в замороженном состоянии при температуре ниже -60°C не более 6 мес. В этом случае растворы антибиотиков рекомендуется аликвотировать во избежание повторных циклов таяния-замораживания, так как повторные циклы таяния-замораживания ускоряют деградацию ряда антибиотиков.

1.4. Для приготовления рабочего раствора с концентрацией 128 мг/л внести 256 мкл основного раствора в пробирку с 19,7 мл МХБ.

Этап 2. Приготовление последовательных разведений антибиотика

Тестирование проводится в стерильных 96-луночных круглодонных полистироловых планшетах в диапазоне концентраций 0,12-128 мг/л, создаваемом в рядах лунок 1-11. Ряд лунок 12 не содержит антибиотик и используется в качестве положительного контроля (контроль роста культуры). На одном планшете в рядах А-Н можно определять минимальную подавляющую концентрацию (МПК) одновременно для 8 штаммов микроорганизмов.

В стерильную 90-миллиметровую чашку Петри или другую подходящую для пипетирования стерильную емкость внести 15-20 мл МХБ. С использованием 8-канального дозатора перенести по 100 мкл МХБ в ряды лунок 1-10 и 12 планшета.

В лунки ряда 11 внести по 200 мкл рабочего раствора антибиотика с концентрацией 128 мг/л.

С использованием 8-канального дозатора путем последовательного смешивания и переноса 100 мкл жидкости из ряда лунок ряда 11 до ряда 1 приготовить двукратные серийно убывающие разведения антибиотика: 64 мг/л (ряд 10), 32 мг/л (ряд 9), 16 мг/л (ряд 8), 8 мг/л (ряд 7), 4 мг/л (ряд 6), 2 мг/л (ряд 5), 1 мг/л (ряд 4), 0,5 мг/л (ряд 3), 0,25 мг/л (ряд 2), 0,12 мг/л (ряд 1). Удалить 100 мкл жидкости из лунок ряда 1.

Заполненные планшеты могут использоваться сразу после приготовления либо храниться в течение 3-х мес. Для хранения планшеты закрыть крышками, запечатать в полиэтиленовые пакеты и поместить в низкотемпературный морозильник при температуре ниже -60°C .

Этап 3. Приготовление инокулята

3.1. Для приготовления инокулята используется метод прямого суспендирования в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия колоний чистой 18–24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде. Стерильной бактериологической петлей или ватным тампоном необходимо собрать несколько морфологически схожих колоний и суспендировать полученный материал в стерильном изотоническом растворе. Довести бактериальную суспензию до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда (контроль денситометром), что приблизительно соответствует концентрации $1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл.

3.2. Развести полученную суспензию в 10 раз, для чего перенести 0,5 мл суспензии в пробирку с 4,5 мл стерильного изотонического раствора и перемешать на вортексе.

Этап 4. Инокуляция

Внести по 5 мкл полученной суспензии в ряд лунок А1...А12. Концентрация микробных клеток составит 5×10^5 КОЕ/мл. При необходимости тестирования большего количества штаммов последовательно инокулировать ряды В–Н соответствующими суспензиями. Время от приготовления микробных суспензий до инокуляции не должно превышать 30 мин.

Этап 5. Инкубация

Планшеты закрыть крышками и поместить в полиэтиленовые пакеты для предотвращения высыхания. Разместить планшеты в термостате в стопках не более 3 штук, чтобы избежать неравномерного нагревания. Инкубировать при 35 ± 1 °С в течение 18 ± 2 ч.

Этап 6. Учет и интерпретация результатов

После окончания инкубации планшеты поместить на темную матовую поверхность. Результаты следует учитывать только при наличии достаточного роста исследуемых микроорганизмов (т. е. при наличии явного пятна или помутнения в лунке с положительным контролем). Наличие и характер роста в каждой из лунок оценивают, сравнивая их с лункой положительного контроля. Самую низкую концентрацию антибиотика, которая полностью тормозит видимый рост микроорганизма, регистрируют как МПК.

Сведения о пограничных значениях МПК для определения клинических категорий чувствительности бактерий к полимиксинам представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Критерии интерпретации результатов определения чувствительности к полимиксинам: пограничные значения МПК (мг/л)

Группа микроорганизмов	Антибиотик	Критерии интерпретации и пограничные значения МПК		
		чувствительный (S)	умеренно-устойчивый (I)	устойчивый (R)
<i>Acinetobacter spp.</i>	колистин	≤ 2	-	≥ 4
	полимиксин Б	≤ 2	-	≥ 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	колистин	≤ 2	-	≥ 4
	полимиксин Б	≤ 2	4	≥ 8
Энтеробактерии	колистин	≤ 2	-	≥ 4
	полимиксин Б	-	-	-

Этап 7. Контроль качества

Для контроля качества определения чувствительности к полимиксинам используют штаммы, указанные в таблице 2. Контрольные штаммы могут быть получены из коллекций типовых культур или коммерческих источников. Оптимально выполнять определение МПК полимиксинов для контрольных штаммов при каждом исследовании клинических штаммов. При определении чувствительности контрольные штаммы обрабатывают таким же образом как и исследуемые штаммы. Значения МПК контрольных штаммов должны находиться в пределах диапазонов, указанных в таблице 2.

Таблица 2. — Диапазоны МПК полимиксинов для контрольных штаммов микроорганизмов

Антибиотик	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	целевое значение, мг/л	допустимый диапазон, мг/л	целевое значение, мг/л	допустимый диапазон, мг/л
Колистин	0,5-1	0,25-2	1-2	0,5-4
Полимиксин Б	-	0,25-2	-	0,5-2

Этап 8. Заключение

При получении значений МПК полимиксинов контрольных штаммов, соответствующих их целевым значениям или укладывающимся в допустимый диапазон значений, оформляется микробиологическое заключение для тестируемых клинических штаммов. В нем должны быть указаны полученные значения МПК полимиксинов и соответствующие им интерпретационные категории («чувствительный», «умеренно-устойчивый» либо «устойчивый»).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнения при применении данного метода отсутствуют.

Возможные ошибки при выполнении микробиологических исследований могут быть связаны с недостаточным контролем чистоты выделенной культуры и включением в исследование смешанных культур микроорганизмов; техническими ошибками при приготовлении основных и рабочих растворов антибиотиков; использованием вместо чистых субстанций антибиотиков их лекарственных форм; использованием в исследовании не стандартизованных по оптической плотности бактериальных суспензий.

Обоснование целесообразности практического использования метода

Широко распространенные в организациях здравоохранения Республики Беларусь карбапенеморезистентные энтеробактерии и грамотрицательные неферментирующие бактерии (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*), обладают ассоциированной устойчивостью к большинству не бета-лактамов антибиотиков. Сцепление генов карбапенемаз с другими детерминантами резистентности во многих случаях сопровождается развитием экстремальной антибиотикорезистентности. До настоящего времени только полимиксины (колистин, полимиксин Б) сохраняют приемлемую микробиологическую активность в отношении многих карбапенеморезистентных госпитальных изолятов грамотрицательных бактерий, для обозначения профиля резистентности которых введена аббревиатура «POS» (polymyxin-only-susceptible, чувствительные только к полимиксинам).

Распространение множественной и экстремальной антибиотикорезистентности среди энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий, связанное главным образом с продукцией карбапенемаз, привело к росту потребления полимиксинов, остающихся препаратами «последнего резерва». На этом фоне в Республике Беларусь отмечается появление отдельных колистинорезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *K. pneumoniae* со сформировавшимся состоянием панрезистентности к антибиотикам (PDR). По данным международных сетей по надзору за устойчивостью к противомикробным препаратам EARS-Net и CAESAR, уровень резистентности инвазивных изолятов *K. pneumoniae* к карбапенемам в 2018 г. в нашей стране был самым высоким среди европейских стран и составил 78 % нечувствительных штаммов. В ряде исследований было отмечено, что устойчивые к карбапенемам штаммы *K. pneumoniae* чаще имеют устойчивость к полимиксинам по сравнению с чувствительными штаммами. В отчете Европейской сети по надзору за устойчивостью к противомикробным препаратам (EARS-Net) за 2015 г. указано, что 29 % устойчивых к карбапенемам *K. pneumoniae* имели устойчивость к колистину, среди карбапенемочувствительных штаммов устойчивость к колистину отмечена только у 3 %. По данным российского многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016», устойчивость к колистину выявлена у 9,4 % штаммов *K. pneumoniae*.

В условиях глобального распространения грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью точный количественный результат определения чувствительности к колистину является критически важным при тестировании антибиотикорезистентности XDR-изолятов. Вместе с тем, определение чувствительности к колистину сопряжено с рядом трудностей, связанных с большой молекулярной массой, наличием катионных свойств и плохой диффузией в агаре. В предупреждении Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам указано, что при определении чувствительности к колистину только метод микроразведений в бульоне дает корректные значения, как для чувствительных, так и для

резистентных изолятов грамотрицательных бактерий. Диско-диффузионный метод неприменим вследствие плохой диффузии колистина. Метод градиентной диффузии дает несогласованные результаты даже в случае получения адекватных значений МПК для контрольных штаммов, и не должен использоваться. Определение чувствительности к колистину автоматизированными системами также не позволяет получать надежные результаты. В интерпретационных таблицах EUCAST отсутствуют пограничные значения диаметров зон подавления роста (ввиду неприменимости диско-диффузионного метода) для колистина в отношении энтеробактерий, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*

Метод последовательных микроразведений в бульоне является референтным фенотипическим методом определения антибиотикочувствительности микроорганизмов. В силу целого ряда объективных причин большинство микробиологических лабораторий не проводят определение истинных значений МПК, ограничиваясь диско-диффузионным методом или автоматизированным тестированием чувствительности к пограничным и близким к ним концентрациям антибиотиков.