

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь



Н.П. Жукова
Н.П. Жукова

27 августа
2017

Регистрационный № 001-0517

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ КАРБАПЕНЕМАЗ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ (инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Д.В. Тапальский, А.И. Козлова

Гомель, 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен универсальный фенотипический микробиологический метод выявления карбапенемаз (ферментов, инактивирующих антибиотики группы карбапенемов) у энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и вторичную медицинскую профилактику заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями с экстремальной и полной устойчивостью к антибиотикам.

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

Карбапенемазы грамотрицательных бактерий (металло- β -лактамазы VIM, IMP, NDM, сериновые карбапенемазы KPC, OXA-карбапенемазы) обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, направленным практически все классы β -лактамных антибиотиков, включая карбапенемы. Большинство из них не чувствительны к ингибиторам β -лактамаз, используемым в современной медицине. Гены карбапенемаз часто сцеплены с другими детерминантами антибиотикорезистентности и включены в состав высоко мобильных интегронов, способных быстро распространяться между бактериями с помощью плазмид и транспозонов. В результате приобретения генов карбапенемаз формируются отдельные эпидемиологически значимые клоны экстремально- и панрезистентных микроорганизмов, способные быстро распространяться на обширных территориях и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии. Детекция механизма устойчивости к карбапенемным антибиотикам, связанного с продукцией карбапенемаз, важна как для назначения оптимальной этиотропной терапии пациенту, так и для эпидемиологического контроля

распространения экстремально-антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов и разработки мероприятий инфекционного контроля.

В связи с опасностью широкого распространения устойчивости к карбапенемам среди госпитальных экovarов грамотрицательных микроорганизмов требуется внедрение в практику микробиологических лабораторий простого, надежного и экономически эффективного фенотипического метода выявления карбапенемаз.

Показания к применению

Выявление карбапенемаз у клинических изолятов энтеробактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Providencia spp.*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Salmonella enterica*) и грамотрицательных неферментирующих бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter spp.*), устойчивых или умеренно устойчивых к антибиотикам группы карбапенемов.

Противопоказания к применению

Противопоказаний нет.

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и расходных материалов

1. Медицинские изделия:
 - стерилизатор паровой;
 - стерилизатор воздушный;
 - дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с ГОСТ 6709-72;
 - холодильник бытовой;
 - облучатель бактерицидный;
 - вортекс орбитальный;
 - денситометр (измеритель оптической плотности суспензий);
 - автоматический дозатор лабораторный одноканальный переменного объема 200–1000 мкл;
 - посуда лабораторная стеклянная (колбы, пробирки) по ГОСТ 1770-74;

- емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала;
- штативы для пробирок;
- спиртовка;
- инструменты лабораторные (пинцеты, петли микробиологические).

2. Реактивы, реагенты и питательные среды:

- агар Мюллера-Хинтона;
- диски с антибиотиками для определения чувствительности микроорганизмов: меропенем 10 мкг;
- вода дистиллированная, стерилизованная автоклавированием.
- натрий хлористый, х.ч. по ГОСТ 4233-77;
- спирт этиловый технический ГОСТ 18300-87;

3. Расходные материалы:

- тампоны хлопковые стерильные;
- наконечники для автоматических дозаторов в штативах, стерильные (200–1000 мкл);
- чашки Петри полистироловые, диаметр 90 мм, стерильные;
- пробирки эппендорф, объем 1,5-2,0 мл, стерильные.

4. Контрольные культуры микроорганизмов:

- *Escherichia coli* ATCC 25922

5. Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

- халат лабораторный;
- перчатки латексные или нитриловые;
- раствор антисептика, предназначенный для обработки рук персонала;
- раствор дезинфицирующий для инактивации биологического материала.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

1 Отбор микроорганизмов, подлежащих исследованию на карбапенемазную активность

Исследованию подлежат все клинические изоляты энтеробактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Providencia spp.*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Salmonella enterica*) и грамотрицательных неферментирующих бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter spp.*) у которых диско-диффузионным методом или с использованием автоматического микробиологического анализатора обнаружена нечувствительность (устойчивость или умеренная устойчивость) хотя бы к одному из карбапенемов. В таблице приведены пограничные значения диаметров зон подавления роста для результатов, полученных диско-диффузионным методом.

Таблица. Пограничные значения диаметров зон подавления роста для штаммов, нечувствительных к карбапенемам (EUCAST v.6.0, 2016)

Антибиотик	Содержание в диске, мкг	Пограничные значения диаметров зон подавления роста, мм		
		<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
Дорипинем	10	< 24	< 25	< 23
Эртапенем	10	< 25	-	-
Имипенем	10	< 22	< 20	< 23
Меропенем	10	< 22	< 24	< 21

2 Постановка теста

В стерильную пробирку эппендорф внести 200 мкл стерильной дистиллированной воды и приготовить в ней густую суспензию из суточной культуры исследуемого штамма. Оптимально использовать культуру с агара Мюллера-Хинтона, на котором определялась чувствительность исследуемого микроорганизма к антибиотикам, или со скошенного питательного агара. Для получения достаточной концентрации бактериальных клеток требуется суспендирование полной 5-мм петли (объем 10 мкл) исследуемой культуры и тщательное перемешивание полученной суспензии (например, при помощи вортекса или пипетированием). В качестве контроля используется пробирка с 200 мкл стерильной дистиллированной воды.

В опытную и контрольную пробирки пинцетом внести по 1 диску, содержащему 10 мкг меропенема. Используются те же диски, что и для определения чувствительности диско-диффузионным методом. Пробирки инкубировать 2 ч при 35°C.

Из суточной культуры контрольного штамма *Escherichia coli* ATCC25922 в стерильном физиологическом растворе приготовить бактериальную суспензию с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. При помощи хлопкового тампона инокулировать полученной суспензией чашку с агаром Мюллера-Хинтона для получения сплошного равномерного газона (штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°).

После инкубации пинцетом или одноразовой пластиковой петлей извлечь диски с меропенемом из пробирки с бактериальной суспензией (опыт) и дистиллированной водой (контроль), и перенести их на чашку с Мюллер-Хинтон агаром, инокулированную культурой *E.coli* ATCC25922 (расстояние между дисками не менее 40 мм). Маркировать чашку. Инкубировать 18-24 ч при 35°C.

3 Учет результатов

После окончания инкубации чашки поместить вверх дном на темную матовую поверхность. Измерить диаметры зон задержки роста вокруг дисков с меропенемом.

4 Интерпретация результатов

Контрольная культура *E.coli* ATCC25922 является чувствительной к карбапенемам, паспортное значение диаметра зоны подавления роста для диска с меропенемом (10 мкг) 28-34 мм (может незначительно уменьшаться за счет диффузии части антибиотика в воду при 2-часовой инкубации). При инкубации диска с меропенемом в суспензии микроорганизма, продуцирующего карбапенемазу, происходит ферментативный гидролиз и инактивация антибиотика. При последующем переносе диска на чашку с антибиотикочувствительным штаммом *E.coli* ATCC 25922 и инкубации зона подавления роста вокруг диска не формируется.

Результат считается **положительным** в случае отсутствия зоны подавления роста вокруг диска, предварительного инкубированного с бактериальной суспензией, и наличием зоны подавления роста (25 мм или более) вокруг контрольного диска, предварительно инкубированного с дистиллированной водой. Штамм расценивается как продуцент карбапенемазы и подлежит передаче в референсную лабораторию для проведения молекулярно-генетических исследований. В микробиологическом заключении делается отметка «Выявлена продукция карбапенемазы».

Результат считается **отрицательным** при наличии зон подавления роста (25 мм или более) как вокруг диска, предварительного инкубированного с бактериальной суспензией, так и вокруг контрольного диска, предварительно инкубированного с дистиллированной водой.

Результат считается **сомнительным** при наличии зоны подавления роста (25 мм или более) вокруг контрольного диска, инкубированного с дистиллированной водой, и наличии зоны подавления роста меньшего диаметра вокруг диска, предварительного инкубированного с бактериальной суспензией. В этом случае рекомендуется повторная постановка теста с внесением большего количества исследуемой культуры в суспензию.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано. Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения исследования. Возможно получение сомнительных результатов теста в случае использования некачественных дисков с антибиотиками (инактивация антибиотика вследствие неправильного хранения, различное количество антибиотика в дисках). Для устранения ошибки требуется проведение контроля качества дисков с антибиотиками путем определения чувствительности контрольных штаммов микроорганизмов и сопоставление полученных результатов с соответствующими референтными значениями, приведенными в паспортной характеристике контрольных штаммов.

Обоснование целесообразности практического использования метода выявления продукции карбапенемаз грамотрицательными бактериями

Карбапенемазы грамотрицательных бактерий (металло- β -лактамазы VIM, IMP, NDM, сериновые карбапенемазы KPC, OXA-карбапенемазы) обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, направленным практически все классы β -лактамных антибиотиков, включая карбапенемы. Большинство из них не чувствительны к ингибиторам β -лактамаз, используемым в современной медицине. Гены карбапенемаз часто сцеплены с другими детерминантами антибиотикорезистентности и включены в состав высоко мобильных интегронов, способных быстро распространяться между бактериями с помощью плазмид и транспозонов. В результате приобретения генов карбапенемаз формируются отдельные эпидемиологически значимые клоны экстремально- и панрезистентных микроорганизмов, способные быстро распространяться на обширных территориях и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии.

В 2008 году в стационарах республики впервые выделены МБЛ-продуцирующие штаммы синегнойной палочки, принадлежащие к международному комплексу ST235. На протяжении последующих лет отмечено широкое распространение данного клона во многих лечебных учреждениях четырех регионов республики и практически на всей территории Российской Федерации. Все выявленные на территории республики МБЛ-продуцирующие штаммы синегнойной палочки ST 235 являются экстремально-антибиотикорезистентными, сохраняющими чувствительность только к полимиксинам.

Наблюдаемое с середины 2000-х годов распространение на территории Беларуси экстремально-резистентных клонов *Acinetobacter spp.* приняло характер аллодемии (быстрое распространение резистентных микроорганизмов, связанное с наличием множества

различных генетических источников - генов, мобильных элементов и клонов, формирующих общий пул). Важными детерминантами антибиотикорезистентности у ацинетобактеров, циркулирующих в Беларуси, являются карбапенемазы ОХА-23, ОХА-40, ОХА-58, продукция которых ассоциирована с устойчивостью к антибактериальным препаратам различных групп – цефалоспорином, фторхинолоном, аминогликозидам.

В 2013-2014 гг у экстремально-антибиотикорезистентных клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в трех регионах республики, выявлено наличие МБЛ NDM-1. Для раннего выявления возбудителей инфекционных заболеваний, несущих ген NDM-1, и контроля за распространением штаммов патогенных микроорганизмов секретирующих этот фермент, требуется разработка высокочувствительных диагностических тест-систем, позволяющих быстро и эффективно провести определение МБЛ NDM-1 в образцах из окружающей среды и в клиническом материале.

Эпидемиологическая ситуация с карбапенемазо-продуцирующими энтеробактериями (особенно с NDM-1 МБЛ) в стационарах Республики Беларусь в настоящее время может быть ассоциирована с рядом негативных моментов:

1) крайне скудными возможностями системной антибактериальной терапии (колистин, в меньшей степени тигециклин);

2) риском появления и распространения панрезистентных штаммов, нечувствительных абсолютно ко всем имеющимся в клинической практике антибиотикам, в том числе к тигециклину и колистину;

3) возрастанием числа летальных исходов и осложнений вследствие неадекватной стартовой антибактериальной терапии ИСМП, вызванных экстремально-резистентными энтеробактериями;

4) дальнейшим усугублением ситуации по распространению карбапенеморезистентных энтеробактерий при отсутствии адекватных мер инфекционного контроля.

Изданное в 2012 году Центром по контролю и профилактике заболеваний «Руководство по контролю за распространением карбапенеморезистентных энтеробактерий» («2012 CRE Toolkit - Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae») регламентирует проведение мероприятий, направленных на ограничение циркуляции экстремально-антибиотикорезистентных бактерий в стационарах (гигиена рук, ограничение контактов, когортизация пациентов и персонала, минимизация инвазивных процедур, рациональное использование антибиотиков). Ключевым аспектом инфекционного контроля, позволяющим сдерживать распространение карбапенеморезистентных энтеробактерий в стационаре, является микробиологический скрининг.

В настоящее время в масштабах Республики Беларусь остро назрела необходимость проведения в рамках программы микробиологического мониторинга систематических микробиологических исследований, направленных на выявление экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий и

грамотрицательных неферментирующих бактерий, относящихся к клонам высокого риска, и разработки противоэпидемических мероприятий для ограничения их распространения в госпитальной среде.

Литература:

1. Тапальский Д.В., Мозгова А.В., Козлова А.И. Эффективность комбинаций антибиотиков в отношении карбапенемрезистентных госпитальных изолятов *Acinetobacter baumannii* // Клиническая инфектология и паразитология. Спецвыпуск в Беларуси. – 2014. – С. 95-103.

2. Осипов В.А., Тапальский Д.В., Склеенова Е.Ю., Романов А.В., Жаворонок С.В. Клональное распространение штаммов *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентов металло-бета-лактамаз на территории Беларуси // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – №4. – С. 92-97.

3. Металло-бета-лактамазы и другие карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси / Тапальский Д.В., Осипов В.А., Евсеенко Е.О., Савельева А.К., Козловская И.В., Козик А.П., Левшина Н.Н., Осипкина О.В., Соловей Н.В., Карпов И.А. // Здоровоохранение. – 2017. - №3. – С. 40-47.

4. Zavascki A.P., Bulitta J.B., Landersdorfer C.B. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11: 1333–53. Lim T.P., Lee W., Tan T.Y., et al. Effective antibiotics in combination against extreme drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with decreased susceptibility to polymyxin B. *PloS One* 2011; 6(12): E28177.

5. Rahal J.J. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 2006; 43(Suppl. 2): S95–S99.

6. Ly N., Bulitta J.B., Rao G.G., et al. Colistin and doripenem combinations against *Pseudomonas aeruginosa*: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1434-42.

7. Urban C., Mariano N., Rahal J.J. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2732–4.

8. Zusman O., Avni T., Leibovici L., et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 5104–11.

9. White R.L., Burgess D.S., Manduru M., Bosso J.A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1914–8.

10. Doern C.D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy Testing // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol. 52. – P. 4124–4128.