

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь



Н.П. Жукова Н.П. Жукова

17 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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н.П. Жукова
31.08.2017
Регистрационный № 001-0517

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ
КАРБАПЕНЕМАЗ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. 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 на все классы β -лактамных антибиотиков, включая карбапенемы. Большинство из них не чувствительно 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 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Медицинские изделия:

- стерилизатор паровой;
- стерилизатор воздушный;
- дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с ГОСТ 6709-72;
- холодильник бытовой;

- облучатель бактерицидный;
 - вихревой 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.

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 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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>
Дорипенем	10	<24	<25	<23
Эртапенем	10	<25	–	–
Имипенем	10	<22	<20	<23
Меропенем	10	<22	<24	<21

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-миллиметровой 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 агаром Мюллера–Хинтона, инокулированную культурой *E. coli* ATCC25922 (расстояние между дисками не менее 40 мм). Маркировать чашку. Инкубировать 18–24 ч при 35°C.

Учет результатов

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

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, предварительно инкубированного с бактериальной суспензией, и наличия 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 зоны подавления роста (25 мм или более) вокруг диска, предварительно инкубированного с бактериальной суспензией, 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, а также меньшего диаметра вокруг диска, предварительно 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 контроль 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 на все классы β -лактамных антибиотиков, включая карбапенемы. Большинство из них не чувствительно 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 г. в стационарах Республики Беларусь 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 Беларусь МБЛ-продуцирующие штаммы синегнойной палочки ST 235 являются экстремально-антибиотикорезистентными, сохраняющими чувствительность только к полимиксидам.

Наблюдаемое с середины 2000-х гг. 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 OXA-23, OXA-40, OXA-58, продукция которых ассоциирована с устойчивостью к антибактериальным препаратам различных групп — цефалоспоридам, фторхинолонам, аминогликозидам.

В 2013–2014 гг. у экстремально-антибиотикорезистентных клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в трех регионах Беларуси, обнаружено наличие МБЛ NDM-1. Для раннего выявления возбудителей инфекционных заболеваний, несущих ген NDM-1, и контроля распространения 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 клиническом материале.

Эпидемиологическая ситуация с карбапенемазо-продуцирующими энтеробактериями (особенно с NDM-1 МБЛ) в стационарах Беларуси 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, не чувствительных абсолютно ко всем имеющимся в клинической практике антибиотикам, в т. ч. тигециклину и колистину;

3) увеличением 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 г. 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 граммотрицательных неферментирующих бактерий, относящихся к клонам высокого риска, и разработку противоэпидемических мероприятий для ограничения их распространения в госпитальной среде.