

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь



Н.П. Жукова

2017

Регистрационный № 002 - 0517

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К
КОМБИНАЦИЯМ АНТИБИОТИКОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
БАКТЕРИЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ И ПОЛНОЙ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Д.В. Тапальский, к.м.н., доцент Л.В. Лагун

Гомель, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
30.08.2017
Регистрационный № 002-0517

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
К КОМБИНАЦИЯМ АНТИБИОТИКОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
БАКТЕРИЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ И ПОЛНОЙ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Д.В. Тапальский, канд. мед. наук, доц. Л.В. Лагун

Гомель 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы определения чувствительности грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью к комбинациям из двух антибиотиков, направленные на выявление аддитивного и синергидного эффектов при сочетанном воздействии антибиотиков на бактериальную клетку. Может быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и лечение заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями с экстремальной и полной устойчивостью к антибиотикам.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-клинических фармакологов, врачей-инфекционистов, врачей анестезиологов-реаниматологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим инфекциями, вызванными грамотрицательными бактериями с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Медицинские изделия:

- стерилизатор паровой;
 - стерилизатор воздушный;
 - дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с ГОСТ 6709-72;
 - холодильник бытовой;
 - облучатель бактерицидный;
 - весы электронные (предел измерений 200 г, погрешность $\pm 0,001$ г) или торсионные;
 - вихревой орбитальный;
 - денситометр (измеритель оптической плотности суспензий);
 - автоматические дозаторы лабораторные одноканальные переменного объема: 2–20; 20–200; 200–1000 мкл;
 - автоматические дозаторы лабораторные 8-канальные переменного объема: 5–50; 30–300 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, ножницы);
 - тefлоновая платформа и аппликаторы для размещения и переноса полосок (MTS Crossing Set).
2. Реактивы, реагенты и питательные среды:
- агар Мюллера–Хинтона;
 - бульон Мюллера–Хинтона;

- вода дистиллированная, стерилизованная автоклавированием;
- натрий хлористый, х.ч. по ГОСТ 4233-77;
- спирт этиловый технический ГОСТ 18300-87.

3. Расходные материалы:

- тампоны хлопковые;
- наконечники для автоматических дозаторов в штативах, стерильные (2–20; 20–200; 200–1000 мкл);
- чашки Петри полистироловые, диаметр 90 мм, стерильные;
- пробирки полипропиленовые, объем 10-20 мл, с крышками, стерильные;
- планшеты полистироловые 96-луночные с крышками, стерильные;
- крафт-бумага или крафт-пакеты для стерилизации.

4. Субстанции антибиотиков:

- азтреонам;
- амикацин;
- имипенем;
- колистин;
- левофлоксацин;
- меропенем;
- сульбактам;
- тигециклин;
- фосфомицин;
- цефтазидим.

5. Тест-полоски с антибиотиками для метода градиентной диффузии (E-тесты, MIC-тесты, M.I.C.E.-тесты):

- азтреонам 0,016 — 256 мкг;
- амикацин 0,016 — 256 мкг;
- имипенем 0,002 — 32 мкг;
- колистин 0,064 — 1024 мкг;
- левофлоксацин 0,002 — 32 мкг;
- меропенем 0,002 — 32 мкг;
- сульбактам 0,016 — 256 мкг;
- тигециклин 0,016 — 256 мкг;
- фосфомицин 0,064 — 1024 мкг;
- цефтазидим 0,016 — 256 мкг.

6. 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

Инфекции, вызванные энтеробактериями или грамотрицательными неферментирующими бактериями, нечувствительными к антибиотикам всех классов или сохраняющими чувствительность только к полимиксинам и/или тигециклину.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ

1. Приготовление основных растворов антибиотиков

1.1. Для приготовления раствора с концентрацией 10000 мкг/мл 100 мг субстанции антибиотика внести в пробирку, содержащую 9,9 мл дистиллированной воды или другого растворителя в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. — Растворители и разбавители для приготовления основных растворов антибиотиков

Антибиотик	Растворитель	Разбавитель
Меропенем	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, рН 7,2	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, рН 7,2
Имипенем	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, рН 7,2	Фосфатный буфер 0,01 моль/л, рН 7,2
Цефтазидим	Насыщенный раствор бикарбоната натрия	Вода
Азтреонам	Насыщенный раствор бикарбоната натрия	Вода
Амикацин	Вода	
Левофлоксацин	Половина объема воды, минимальный объем 0,1 моль/л NaOH до растворения, затем довести водой до полного объема	Вода
Тигециклин	Вода	
Фосфомицин	Вода	
Колистин	Вода	
Сульбактам	Вода	

1.2. При необходимости после полного растворения антибиотика выполнить стерилизующую фильтрацию раствора (использовать фильтры с диаметром пор 0,22 мкм).

1.3. Приготовленные основные растворы можно хранить в замороженном состоянии при температуре ниже -60°C не более 6 мес. Растворы антибиотиков нельзя повторно замораживать, так как повторные циклы таяния — замораживания ускоряют деградацию ряда антибиотиков.

2. Тестирование комбинаций из двух антибиотиков методом «шахматной доски»

Тестирование проводится в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах в формате 8×8 лунок (луночки А1...А8 — Н1...Н8) для культуры микроорганизма с предварительно установленными значениями минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков в диапазоне концентраций для каждого антибиотика от 0 до 4*МПК (рисунок 1).

2.1. Методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона определить индивидуальные значения МПК для каждого из антибиотиков в отношении исследуемого штамма микроорганизма.

2.2. Из основных растворов антибиотиков приготовить по 3–5 мл рабочих растворов с концентрацией 16*МПК. В качестве растворителя использовать бульон Мюллера–Хинтона.

2.3. В ряд лунок А1...А8 планшета 1 внести по 100 мкл рабочего раствора антибиотика А, в ряды лунок В1...В8 — Н1...Н8 внести по 50 мкл бульона Мюллера–Хинтона.

2.4. С использованием 8-канального дозатора путем последовательного смешивания и переноса 50 мкл жидкости из ряда лунок А1...А8 до ряда G1...G8 приготовить двукратные серийно убывающие разведения антибиотика А 16хМПК (ряд А), 8хМПК (ряд В), 4хМПК (ряд С), 2хМПК (ряд D), 1хМПК (ряд Е), 0,5хМПК (ряд F), 0,25хМПК (ряд G). Удалить 50 мкл жидкости из ряда лунок G1...G8. Лунки ряда Н антибиотика А не содержат (рисунок 2).

2.5. В вертикальный ряд лунок А8...Н8 планшета 2 внести по 120 мкл рабочего раствора антибиотика Б, в вертикальные ряды лунок А1...Н1 — А7...Н7 внести по 60 мкл бульона Мюллера–Хинтона. Планшет 2 используется только как вспомогательный для приготовления серийных разведений антибиотика Б.

2.6. С использованием 8-канального дозатора путем последовательного смешивания и переноса 60 мкл жидкости из вертикального ряда лунок А8...Н8 до вертикального ряда А2...Н2 приготовить двукратные серийно убывающие разведения антибиотика Б 16хМПК (ряд 8), 8хМПК (ряд 7), 4хМПК (ряд 6), 2хМПК (ряд 5), 1хМПК (ряд 4), 0,5хМПК (ряд 3), 0,25хМПК (ряд 2). Удалить 60 мкл жидкости из ряда лунок А2...Н2. Лунки ряда 1 антибиотика Б не содержат (рисунок 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	x МПК А
A	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
D	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
E	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
F	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
G	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	
x МПК Б	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	

Антибиотик Б

Антибиотик А

Рисунок 1. — Метод «шахматной доски». Финальные концентрации антибиотиков А и Б в лунках планшета

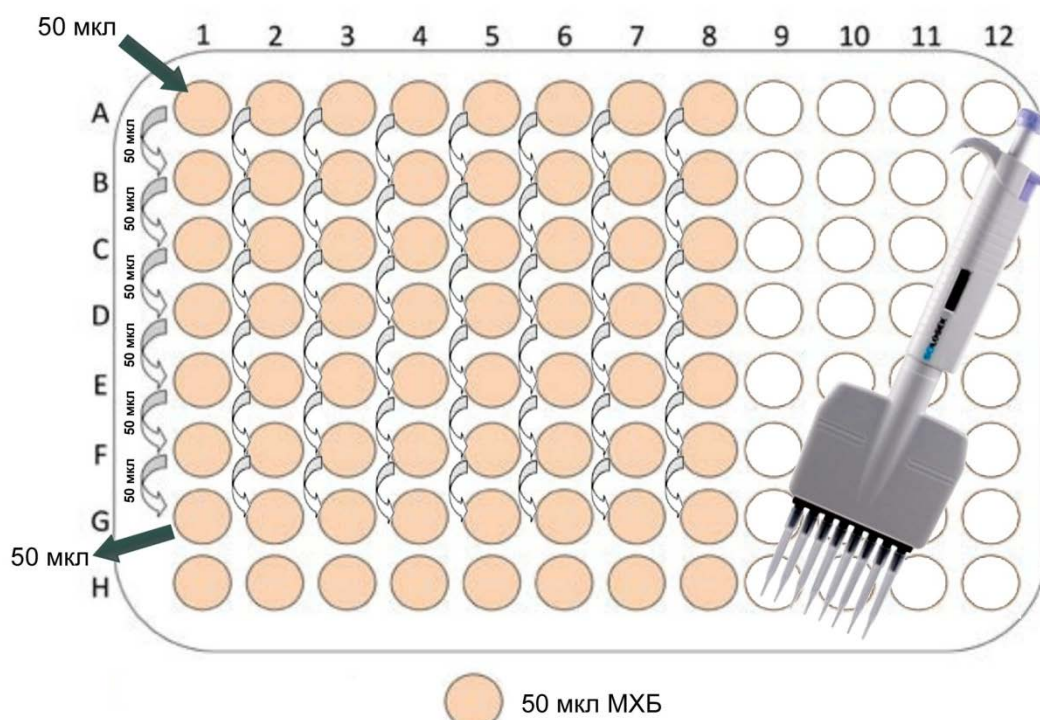


Рисунок 2. — Схема приготовления двукратных серийных разведений антибиотика А в планшете 1. В ряд лунок А1...А8 вносится по 50 мкл раствора антибиотика А с концентрацией 16*МПК

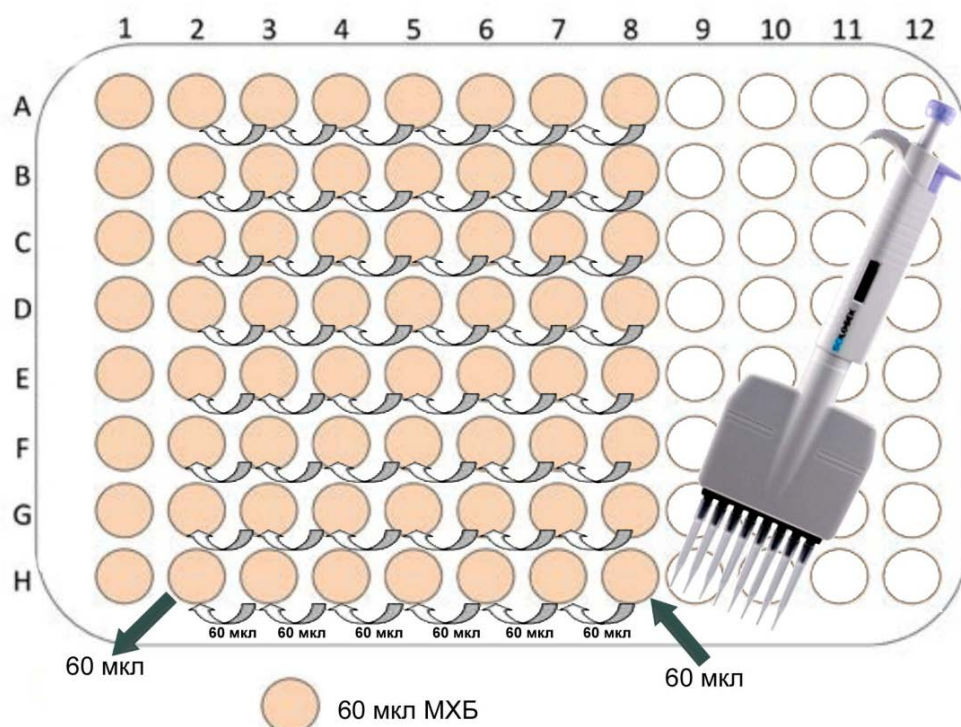


Рисунок 3. — Схема приготовления двукратных серийных разведений антибиотика Б в планшете 2. В ряд лунок А8...А14 вносится по 60 мкл раствора антибиотика Б с концентрацией 16*МПК

2.7. С использованием 8-канального дозатора перенести по 50 мкл из 64 лунок (А1...Н8) планшета 2 в одноименные лунки планшета 1.

2.8. В лунки А1...Н8 планшета 1 внести по 100 мкл бульона Мюллера–Хинтона, предварительно инокулированного суспензией 0,5 МакФарланд исследуемого штамма (100 мкл суспензии 0,5 МакФарланд на 9,9 мл бульона Мюллера–Хинтона, концентрация микробных клеток 10^6 КОЕ*мл⁻¹). Общий объем в каждой из 64 лунок составит 200 мкл (50 мкл разведения антибиотика А + 50 мкл разведения антибиотика Б + 100 мкл бульона Мюллера-Хинтона, содержащего 10^6 КОЕ*мл⁻¹ культуры исследуемого микроорганизма).

2.9. Планшет закрыть крышкой и поместить в герметичный пакет из полиэтилена для предотвращения высыхания. Инкубировать 18–24 ч при температуре $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.10. Учет результатов проводится только при наличии достаточного роста исследуемой культуры в лунке, не содержащей антибиотиков (Н1). Интенсивность микробного роста сравнить визуально с интенсивностью роста в положительном контроле (лунка Н1). На карте учета результатов (рисунок 4) отметить лунки с наличием признаков видимого роста.

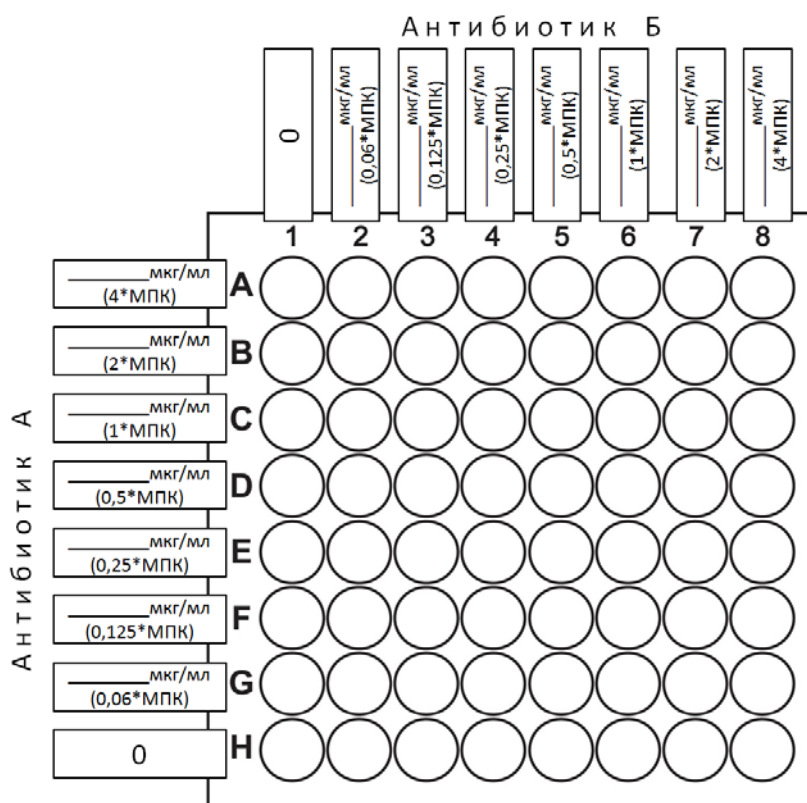
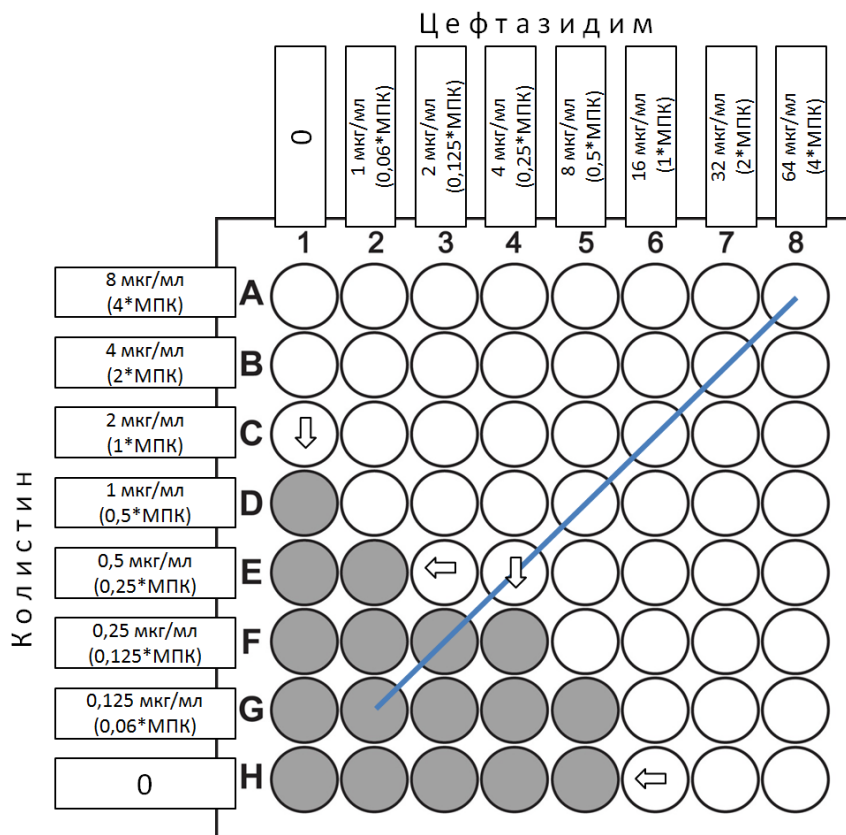


Рисунок 4. — Карта учета результатов определения чувствительности к комбинации из двух антибиотиков методом «шахматной доски»

2.11. В ряду лунок А1...Н1 определить индивидуальную МПК антибиотика А, в ряду лунок Н1...Н8 — индивидуальную МПК антибиотика Б.

2.12. Зарегистрировать значения МПК антибиотика А в присутствии антибиотика Б и МПК антибиотика Б в присутствии антибиотика А. Учет проводить по первой прозрачной лунке ряда, входящей в диагональ А8-В7-С6-Д5-

Е4-Е3, или находящейся непосредственно возле одной из лунок этой диагонали (рисунок 5).



Лунки с наличием роста отмечены серым цветом. Лунки для определения значений МПК обозначены стрелками (МПК колистина 2 мкг/мл, МПК цефтазида 16 мкг/мл, МПК колистина в присутствии цефтазида 0,5 мкг/мл, МПК цефтазида в присутствии колистина 2 мкг/мл, Σ ФПК = 0,375, синергизм)

Рисунок 5. — Пример определения чувствительности к комбинации колистина и цефтазида методом «шахматной доски»

2.13. Рассчитать индекс фракционной подавляющей концентрации по формуле:

$$\Sigma\text{ФПК} = \text{МПК}_{\text{АБ}} / \text{МПК}_{\text{А}} + \text{МПК}_{\text{БА}} / \text{МПК}_{\text{Б}},$$

где $\text{МПК}_{\text{А}}$ — МПК антибиотика А;

$\text{МПК}_{\text{Б}}$ — МПК антибиотика Б;

$\text{МПК}_{\text{АБ}}$ — МПК антибиотика А в присутствии антибиотика Б;

$\text{МПК}_{\text{БА}}$ — МПК антибиотика Б в присутствии антибиотика А;

ФПК — фракционная подавляющая концентрация;

$\Sigma\text{ФПК}$ — индекс фракционной подавляющей концентрации).

2.14. Интерпретировать результаты в соответствии с таблицей 2.

2.15. Оформить микробиологическое заключение с указанием индивидуальных значений МПК антибиотиков, значения индекса фракционной подавляющей концентрации, интерпретации результата взаимодействия для комбинации антибиотиков (синергизм, аддитивный эффект, нейтральный эффект или антагонизм).

Таблица 2. — Интерпретация результатов определения чувствительности к комбинации из двух антибиотиков

	Интерпретация
$\leq 0,5$	Синергизм
$> 0,5$ и $\leq 1,0$	Аддитивный эффект
$> 1,0$ и $\leq 4,0$	Нейтральный эффект
$> 4,0$	Антагонизм

3. Метод тестирования бактерицидности различных комбинаций

3.1. Приготовить основные растворы антибиотиков в соответствии с пп. 1.1–1.2.

3.2. Из основных растворов антибиотиков приготовить рабочие растворы (из расчета не менее 10 мкл рабочего раствора на тестирование каждой комбинации, включающей данный антибиотик), содержащие тестируемые пороговые фармакокинетические/фармакодинамические концентрации (ФК/ФД концентрации) антибиотика (таблица 3), увеличенные в 10 раз. При необходимости тестирования в составе комбинаций антибиотиков, не включенных в таблицу 3, использовать пограничные ФК/ФД концентрации антибиотиков, рекомендованные Европейским комитетом по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST). В качестве разбавителя использовать бульон Мюллера–Хинтона.

Таблица 3. — Концентрации антибиотиков для тестирования в составе комбинаций

Антибиотик	Краткое обозначение	Тестируемая концентрация (ФК/ФД), мкг/мл	Концентрация в рабочем растворе, мкг/мл
Меропенем	МЕР	8	80
Имипенем	ИМП	8	80
Цефтазидим	ЦЕФ	8	80
Азтреонам	АЗТ	8	80
Амикацин	АМК	16	160
Левифлоксацин	ЛЕВ	1	10
Тигециклин	ТИГ	0,5	5
Фосфомицин	ФОС	32	320
Колистин	КОЛ	2	20
Сульбактам	СУЛ	4	40
Иные антибиотики		ФК/ФД пороговые значения (EUCAST) http://www.eucast.org	x10

3.3. Приготовление бульонных культур исследуемых микроорганизмов, содержащих бактериальные клетки в логарифмической стадии роста.

3.3.1. В стеклянную пробирку, содержащую 4–5 мл триптон-соевого бульона, внести одну полную (1 мкл) петлю исследуемой суточной культуры, выращенной на плотной питательной среде.

3.3.2. Инкубировать на шейкере-инкубаторе при 35°C и 100–150 об./мин в течение 3–6 ч до достижения оптической плотности 0,3–0,4 МакФарланд (контроль денситометром).

3.3.3. В пробирку с 5 мл бульона Мюллера–Хинтона внести 50 мкл полученной бульонной культуры с оптической плотностью 0,3–0,4 по МакФарланд. Перемешать пипетированием. Концентрация бактериальных клеток в среде $6 \div 8 \times 10^5$ КОЕ*мл⁻¹.

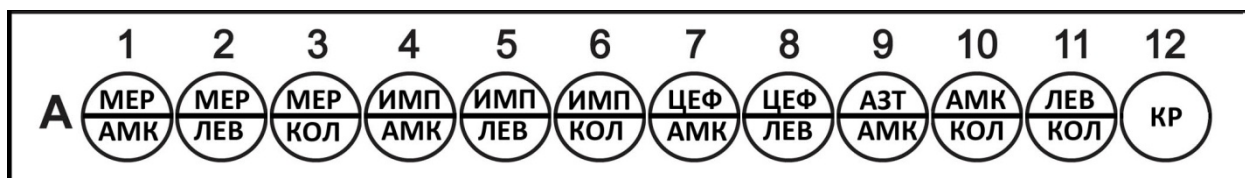
3.4. Приготовление комбинаций антибиотиков и инокуляция планшетов. Тестирование проводится в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах. Для тестирования одной культуры используется горизонтальный ряд из 12 лунок, при этом в лунках 1-11 содержатся различные комбинации из двух антибиотиков; лунка 12 без антибиотиков служит контролем роста культуры. На одном планшете в горизонтальных рядах А...Н возможно определение чувствительности к 11 комбинациям антибиотиков одновременно для 8 различных бактериальных культур. Допускается хранение планшетов, содержащих комбинации антибиотиков, в замороженном состоянии при температуре ниже -60°C не более 3 мес. Повторное замораживание оттаявших планшетов не допускается.

3.4.1. Внести по 10 мкл рабочих растворов антибиотиков в лунки планшета А1...А11 в соответствии с шаблонами, представленными на рисунке 6 (по 2

антибиотика в каждую лунку). При необходимости тестирования большого количества бактериальных культур, принадлежащих к одному виду (*A.baumannii*, *P.aeruginosa*) или семейству (*Enterobacteriaceae*), рабочие растворы антибиотиков предварительно внести во вспомогательный 96-луночный планшет в соответствии с шаблоном (рисунок 7) по 150–250 мкл в каждую лунку. Заполнение вертикальных рядов 1–11 рабочего планшета растворами антибиотиков в объеме 10 мкл проводить при помощи 8-канального дозатора в соответствии с одним из шаблонов, представленным на рисунке 6.



Enterobacteriaceae



P.aeruginosa



A.baumannii

МЕР — меропенем; ИМП — имипенем; ЦЕФ — цефтазидим; АЗТ — азтреонам;
АМК — амикацин; ЛЕВ — левофлоксацин; ТИГ — тигециклин; ФОС —
фосфомицин; КОЛ — колистин; СУЛ — сульбактам; КР — контроль роста

Рисунок 6. — Шаблоны для внесения рабочих растворов антибиотиков при тестировании бактерицидности различных комбинаций антибиотиков в отношении энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	МЕР	ИМП	ЦЕФ	АЗТ	АМК	ЛЕВ	ТИГ	ФОС	КОЛ	СУЛ		
B	МЕР	ИМП	ЦЕФ	АЗТ	АМК	ЛЕВ	ТИГ	ФОС	КОЛ	СУЛ		
C	МЕР	ИМП	ЦЕФ	АЗТ	АМК	ЛЕВ	ТИГ	ФОС	КОЛ	СУЛ		
D	МЕР	ИМП	ЦЕФ	АЗТ	АМК	ЛЕВ	ТИГ	ФОС	КОЛ	СУЛ		
E	МЕР	ИМП	ЦЕФ	АЗТ	АМК	ЛЕВ	ТИГ	ФОС	КОЛ	СУЛ		
F	МЕР	ИМП	ЦЕФ	АЗТ	АМК	ЛЕВ	ТИГ	ФОС	КОЛ	СУЛ		
G	МЕР	ИМП	ЦЕФ	АЗТ	АМК	ЛЕВ	ТИГ	ФОС	КОЛ	СУЛ		
H	МЕР	ИМП	ЦЕФ	АЗТ	АМК	ЛЕВ	ТИГ	ФОС	КОЛ	СУЛ		

МЕР — меропенем; **ИМП** — имипенем; **ЦЕФ** — цефтазидим; **АЗТ** — азтреонам; **АМК** — амикацин; **ТОБ** — тобрамицин; **ЛЕВ** — левофлоксацин; **ТИГ** — тигециклин; **ФОС** — фосфомицин; **КОЛ** — колистин; **СУЛ** — сульбактам

Рисунок 7. — Шаблон для внесения рабочих растворов антибиотиков в лунки вспомогательного планшета

3.4.2. Внести по 80 мкл бульонной культуры, содержащей $6 \div 8 \times 10^5$ КОЕ*мл⁻¹ микробных клеток, в лунки планшета А1...А11. Суммарный объем в каждой лунке составит 100 мкл. Внести 100 мкл бульонной культуры в лунку планшета А12 (контроль роста). При необходимости тестирования большого количества культур аналогичным образом инокулировать лунки 1...11 и 12 (контроль роста) в горизонтальных рядах В–Н.

3.5. Планшет закрыть крышкой и поместить в герметичный пакет из полиэтилена для предотвращения высыхания. Инкубировать 48 ч при температуре $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.6. Перенести 10 мкл содержимого из каждой лунки (А1...А12) на сектор плотной питательной среды (питательный агар, триптон-соевый агар или агар Мюллера–Хинтона), поместив шаблон для нанесения (рисунок 8) под чашку Петри. Использовать индивидуальный наконечник для каждой лунки. Предварительно чашку подсушить в течение 15–20 мин в термостате и маркировать ее, обозначив точку совмещения с шаблоном (обозначена стрелкой

на рисунке 8). При тестировании большого количества культур аналогичным образом провести высев на чашки с плотной питательной средой из лунок 1...12 горизонтальных рядов В–Н.

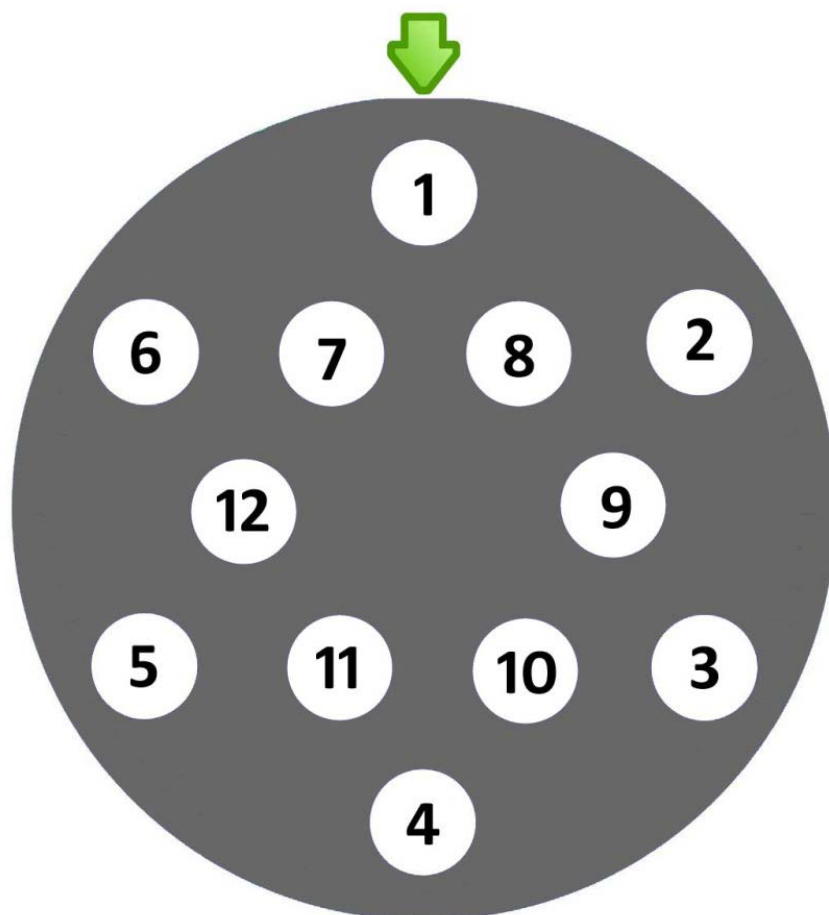


Рисунок 8. — Шаблон для высева содержимого лунок планшета на плотную питательную среду при тестировании бактерицидности различных комбинаций антибиотиков

3.7. Чашки выдержать на рабочем столе 20–30 мин до полного впитывания нанесенных капель в питательную среду, после чего перевернуть кверху дном и инкубировать 18–24 ч при $35\pm 2^\circ\text{C}$.

3.8. Пользуясь шаблоном (рисунок 8), оценить микробиологическую эффективность каждой из 11 тестируемых комбинаций антибиотиков. Положительный результат (бактерицидный эффект комбинации) указывается при отсутствии микробного роста в соответствующем секторе либо при наличии роста в нем не более 1 колонии микроорганизмов.

3.9. Оформить микробиологическое заключение с указанием всех комбинаций, для которых выявлен бактерицидный эффект в отношении исследуемого штамма микроорганизма.

4. Определение чувствительности к комбинациям антибиотиков модифицированным методом градиентной диффузии (кросс-тест)

4.1. Определение индивидуальных минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков.

4.1.1. Для тестирования используются 18–24-часовые культуры микроорганизмов.

4.1.2. Приготовить гомогенную суспензию бактериальных клеток в физиологическом растворе, соответствующую стандарту 0,5 ЕД мутности по МакФарланду.

4.1.3. Бактериальную взвесь нанести стерильным тампоном на поверхность агара Мюллера–Хинтона в трех различных направлениях.

4.1.4. С помощью пинцета поместить тест-полоску антибиотиком (Е-тест, МИС-тест, М.І.С.Е.-тест) на поверхность среды. Допускается нанесение 2 полосок на одну 90-миллиметровую чашку.

4.1.5. Чашки инкубировать 18-24 ч при $35\pm 2^\circ\text{C}$.

4.1.6. Учесть МПК для каждого антибиотика в месте пересечения эллипсоидной зоны подавления роста с тест-полоской.

4.2. Определение антибактериальной активности комбинаций из двух антибиотиков.

4.2.1. Приготовление бактериальных суспензий и инокуляция чашек с агаром Мюллера–Хинтона проводится так же, как и для определении индивидуальных МПК.

4.2.2. С помощью пинцета расположить две тест-полоски с антибиотиками на тефлоновой платформе таким образом, чтобы место их пересечения приходилось на предварительно установленные значения МПК каждого из антибиотиков в отношении исследуемого изолята. С помощью аппликатора перенести перекрещенные в соответствующем положении полоски на поверхность агара Мюллера–Хинтона, предварительно инокулированного суспензией исследуемой культуры (рисунок 9).

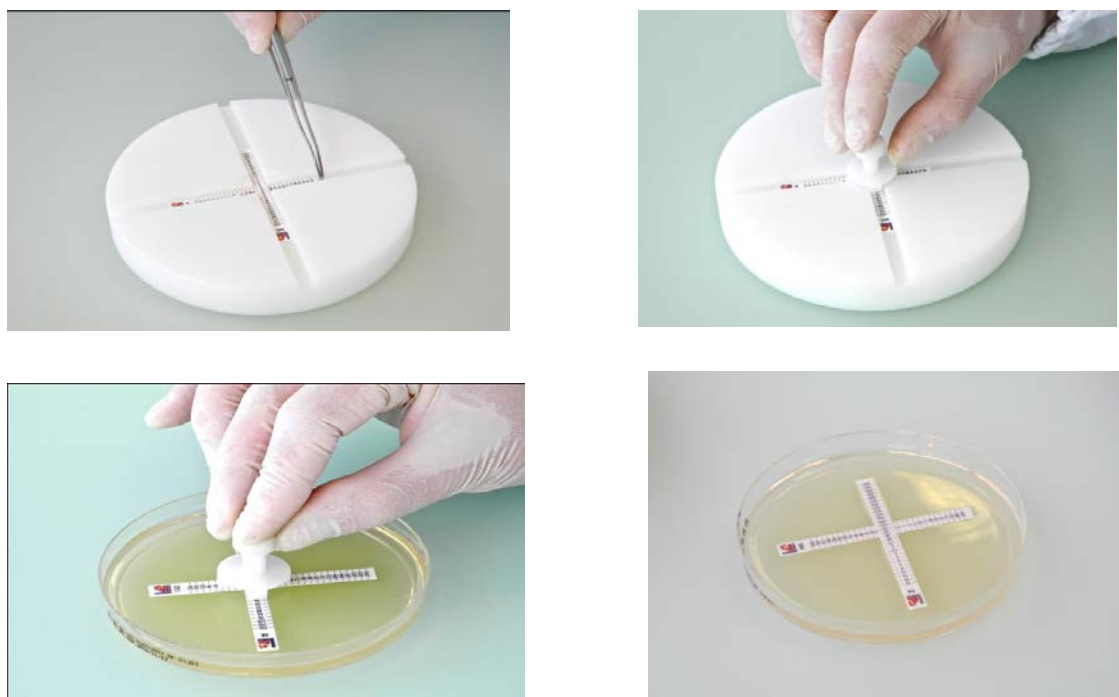


Рисунок 9. — Постановка кросс-теста при помощи платформы и аппликатора тест-полосок

4.2.3. При отсутствии платформы и аппликаторов возможно совмещение двух полосок с антибиотиками под углом 90° непосредственно на предварительно инокулированной чашке с агаром Мюллера–Хинтона, при этом не допускается перемещение уже наложенных полосок по поверхности среды.

4.2.4. Чашки инкубировать 18–24 ч при $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Зарегистрировать значения МПК антибиотика А в присутствии антибиотика Б и МПК антибиотика Б в присутствии антибиотика А (рисунки 10, 11).

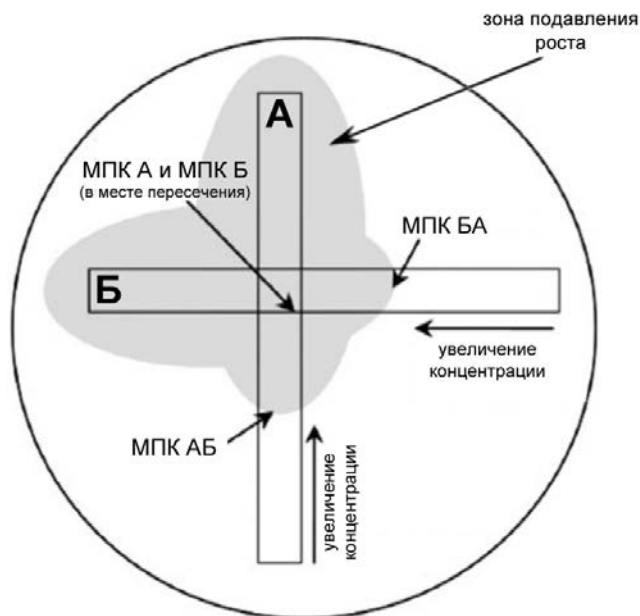


Рисунок 10. — Схема постановки и учета результатов кросс-теста

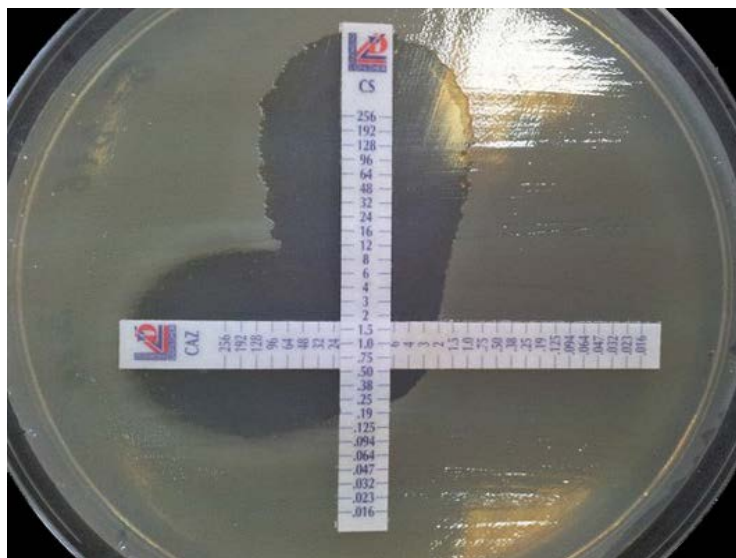


Рисунок 11. — Пример учета результатов кросс-теста

$$\begin{aligned} \text{МПК}_{\text{CAZ}} &= 6 \text{ мкг/мл}; \text{МПК}_{\text{CAZ/CS}} = 3 \text{ мкг/мл}; \text{МПК}_{\text{CS}} = 0,5 \text{ мкг/мл}; \\ \text{МПК}_{\text{CS/CAZ}} &= 0,25 \text{ мкг/мл}; \text{ФПК}_{\text{CAZ}} = 3/6 = 0,5; \text{ФПК}_{\text{CS}} = 0,25/0,5 = 0,5; \\ \Sigma\text{ФПК} &= 0,5 + 0,5 = 1 \text{ (аддитивный эффект)} \end{aligned}$$

4.2.5. Рассчитать индекс фракционной подавляющей концентрации по формуле:

$$\Sigma\text{ФПК} = \text{МПК}_{\text{АБ}} / \text{МПК}_{\text{А}} + \text{МПК}_{\text{БА}} / \text{МПК}_{\text{Б}},$$

где $\text{МПК}_{\text{А}}$ — МПК антибиотика А, установленная предварительно;
 $\text{МПК}_{\text{Б}}$ — МПК антибиотика Б, установленная предварительно;
 $\text{МПК}_{\text{АБ}}$ — МПК антибиотика А в присутствии антибиотика Б;
 $\text{МПК}_{\text{БА}}$ — МПК антибиотика Б в присутствии антибиотика А;
ФПК — фракционная подавляющая концентрация;
 $\Sigma\text{ФПК}$ — индекс фракционной подавляющей концентрации.

4.2.6. Интерпретировать результаты в соответствии с таблицей 2.

4.2.7. Оформить микробиологическое заключение с указанием индивидуальных значений МПК антибиотиков, индекса фракционной подавляющей концентрации, интерпретации результата взаимодействия для комбинации (синергизм, аддитивный эффект, нейтральный эффект или антагонизм).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано. Возможные ошибки при выполнении микробиологических исследований могут быть связаны с недостаточным контролем чистоты выделенной культуры и включением в исследование смешанных культур микроорганизмов, методическими и техническими ошибками при приготовлении основных и рабочих растворов антибиотиков, использованием вместо чистых субстанций антибиотиков их лекарственных форм для клинического применения, нарушением условий и сроков хранения диагностических препаратов, использованием в исследовании не стандартизованных по оптической плотности бактериальных суспензий.

Обоснование целесообразности практического использования методов определения чувствительности к комбинациям антибиотиков грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью

Появление и распространение среди энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий резистентности к большинству используемых в современной клинической практике антибиотиков значительно осложняет антибактериальную терапию вызываемых ими инфекций. Современный арсенал антибактериальных средств, эффективных в отношении возбудителей грамотрицательных инфекций, является крайне ограниченным, при этом в ближайшем будущем ожидается появление лишь нескольких перспективных антибиотиков с достаточно ограниченным спектром активности.

В настоящее время инфекции, вызываемые полирезистентными штаммами энтеробактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и др.) и неферментирующих бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) представляют серьезную угрозу для госпитализированных пациентов, непосредственно приводя к неблагоприятному исходу в 30–70 % случаев. Большинство грамотрицательных возбудителей внутрибольничного происхождения характеризуется множественной, экстремальной или даже панрезистентностью к антибактериальным препаратам.

До настоящего времени только полимиксины сохраняют приемлемую микробиологическую активность в отношении многих карбапенемрезистентных госпитальных изолятов энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий, для обозначения профиля резистентности которых введена аббревиатура «POS» (polymyxin-only-susceptible, чувствительные только к полимиксину). Несмотря на высокую микробиологическую эффективность *in vitro* применение полимиксинов для терапии госпитальных инфекций, вызванных POS-грамотрицательными патогенами, сопряжено с рядом проблем. Среди них недостаточное поступление антибиотика в легочную ткань при парентеральном введении и отсутствие эффективных бактерицидных концентраций в очаге инфекции, селекция резистентности к полимиксинам вследствие гетерогенности бактериальной популяции. Имеется ряд сообщений о панрезистентных штаммах *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, устойчивых к колистину, описаны вспышки внутрибольничных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии, вызванные такими штаммами. В проведенном нами исследовании было показано, что среди 296 клинических изолятов *A. baumannii*, выделенных в течение 2013 г. от пациентов отделения интенсивной терапии и реанимации Гомельской областной клинической больницы, 25,3 % были устойчивыми ко всем антибактериальным препаратам, за исключением полимиксина [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Среди госпитальных изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в лечебных учреждениях г. Гомеля, преобладают изоляты с устойчивостью к карбапенемам, часть из них является продуцентами металло-β-лактамаз с экстремальной антибиотикорезистентностью. В 2015 г. от

госпитализированных пациентов в г. Гомеле впервые были выделены изоляты *K. pneumoniae* с продукцией металло- β -лактамазы NDM-1 и с полной устойчивостью к антибиотикам.

Перспективным направлением антибактериальной терапии бактериальных инфекций, вызванных экстремально-антибиотикорезистентными бактериями, является использование комбинаций антибиотиков. Основная цель комбинированной антибиотикотерапии — достижение синергидного эффекта и расширение спектра антибактериальной активности в отношении множественно устойчивых патогенов. Комбинированная терапия широко используется для лечения инфекций, вызванных панрезистентными грамотрицательными возбудителями, или возбудителями, сохраняющими чувствительность только к одному из антибиотиков. Описаны различные комбинации антибиотиков, *in vitro* обладающие синергическим действием в отношении экстремально-антибиотикорезистентных штаммов грамотрицательных бактерий. Большинство из них предполагает использование колистина (полимиксина E) в качестве «ключевого» препарата с включением в комбинацию аминогликозидов, фторхинолонов, фосфомицина. Микробиологическая эффективность комбинаций антибиотиков трудно прогнозируема в связи с возможным присутствием у микроорганизма разнообразных механизмов резистентности даже к препаратам из одной группы. Поэтому для подбора эффективных комбинаций антибиотиков требуется проводить микробиологическое тестирование изолятов, выделенных от конкретного пациента. С исследовательской целью для определения антимикробного эффекта комбинаций антибиотиков *in vitro* используются различные методы — метод «шахматной доски», модифицированный метод E-тестов, time-kill тест. Большинство из них является дорогостоящими и трудозатратными.

В США и Канаде накоплен 15-летний опыт использования метода МСВТ (Multiple combination bactericidal testing, тестирование бактерицидности различных комбинаций) для прогнозирования эффективности комбинаций из 2 или 3 антибактериальных препаратов при лечении хронических бактериальных инфекций, вызванных экстремально-антибиотикорезистентными и панрезистентными грамотрицательными бактериями. По результатам рандомизированных клинических исследований показана большая эффективность комбинированной антибактериальной терапии, назначенной по результатам МСВТ, по сравнению с терапией, назначаемой эмпирически. В настоящее время МСВТ-центры, организованные в крупных госпиталях стран Северной Америки, ежегодно исследуют несколько десятков тысяч экстремально-антибиотикорезистентных клинических изолятов.

В странах СНГ тестирование комбинаций антибиотиков в микробиологических лабораториях до настоящего времени не проводится, что связано с техническими трудностями процедуры тестирования, отсутствием доступных нормативно-технических документов, регламентирующих процесс тестирования, а также подготовленных кадров. Назначение комбинированной антибиотикотерапии проводится эмпирически, в случае ее клинической неэффективности происходит замена препаратов.

В Беларуси доступны питательные среды и диагностические материалы, необходимые для микробиологического тестирования чувствительности к комбинациям антибиотиков, однако отсутствие нормативно-технических документов ограничивает использование методов оценки комбинаций антибиотиков в локальных микробиологических лабораториях.