

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

Р.А. Часнойть

11 июня 2009 г.

Регистрационный № 036-0409

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ДВОЙНЫХ ДИСКОВ
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ШТАММОВ
S. TYPHIMURIUM, ПРОДУЦИРУЮЩИХ В-ЛАКТАМАЗЫ
РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т.И. Дмитраченко, д-р мед. наук, проф.
В.М. Семенов, канд. мед. наук, доц. И.В. Жильцов, С.К. Зенькова, Е.В. Крылова

Витебск 2009

Сегодня наибольшая сложность с выбором эффективного антибактериального препарата возникает при лечении больных сальмонеллезом, обусловленным госпитальными штаммами *S. typhimurium*, который имеет тенденцию к тяжелому течению и генерализации процесса. Кроме того, при госпитальном сальмонеллезе, обусловленном *S. typhimurium*, для клиницистов очень важным биологическим свойством является резистентность к антибактериальной терапии. В отличие от *S. enteritidis*, устойчивость к антибактериальным препаратам *S. typhimurium* имеет более выраженную тенденцию к росту (Дмитраченко Т.И., 2003).

Особое значение имеет резистентность *S. typhimurium* к β -лактамам, особенно цефалоспорином 3 поколения. Впервые штаммы, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), были описаны во Франции в 1984–1987 гг. среди серовара *S. typhimurium*. В последующем сальмонеллы других сероваров, продуцирующие ESBL, были выделены в других странах: *S. wien* — в Тунисе (1988); *S. mbandaca* — в Алжире (1990); *S. typhimurium* — в Аргентине (1991) Турции (1996), Марокко (1996), Латвии (1998); *S. enteritidis* — в Словакии (1997) и некоторых других странах (Гропе И., 2000; Bonnet R., 2000; Vahaboglu H., 2001; Simarro E., 2003). В настоящее время энтеробактерии, продуцирующие БЛРС, описаны в большинстве стран мира.

Известно, что продукция БЛРС приводит к формированию устойчивости ко всем пенициллинам, цефалоспорином и монобактамам и практически всегда сочетается с резистентностью к препаратам других групп антибиотиков (Страчунский Л.С., 2002). Как правило, штаммы, продуцирующие БЛРС, имеют госпитальное происхождение. Исследования, проведенные сотрудниками кафедры инфекционных болезней ВГМУ, позволили доказать, что продукция БЛРС характерна только для госпитальных штаммов *S. typhimurium*, являющихся представителями одного клона, циркулирующих на территории Республики Беларусь, и служащих причиной вспышек внутрибольничного сальмонеллеза на всей территории Республики Беларусь. Для *S. typhimurium*, в отличие от внебольничных штаммов характерна резистентность к другим антибактериальным препаратам, включая левомецетин, тетрациклин, бисептол, гентамицин, фуразолидон (Дмитраченко Т.И., Семенов В.М., 2001).

В УО ВГМУ разработана простая и доступная методика выявления определенного фенотипа госпитальных штаммов *S. typhimurium*, продуцирующих β -лактамазы расширенного спектра.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Весы лабораторные.
2. Термостат (37 °С).
3. Колбы стеклянные мерные.
4. Стерильные чашки Петри.

5. Стерильные пипетки.
6. Агар Мюллера-Хинтон.
7. Стерильный 0,9% раствор натрия хлорида.
8. Стандарт мутности 0,5 по МакФарланду ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл).
9. Референтные штаммы *E.coli* ATCC 25922; *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853.
10. Стандартные диски с антибиотиками: амоксициллин/клавуланат (20/10 мкг), цефтазидим (30 мкг), цефотаксим (30 мкг).
11. Суточные культуры исследуемых микроорганизмов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод не может быть использован при тестировании *S. typhimurium*, подвергшихся множественным пересевам.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

В основе метода «двойных дисков» лежит модификация распространенного в клинической практике диско-диффузионного метода определения чувствительности к антибиотикам. Использование дисков с цефалоспоридами III поколения / монобактамами и клавулановой кислотой позволяет выявить синергизм в месте пересечения зон диффузии, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга, что указывает на продукцию бактериями β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС).

Приготовление питательной среды

Приготовить питательную среду из коммерческого сухого порошка агаризованной питательной среды Мюллера-Хинтона Becton Dickinson (США) согласно инструкции изготовителя. После приготовления разлить расплавленную среду в чашки Петри.

Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри установить на строго горизонтальную поверхность. В чашку Петри внести 25–30 мл расплавленного агара — для чашки диаметром 100 мм или 60–70 мл — для чашки диаметром 150 мм. После заполнения чашки оставить при комнатной температуре для застывания. Возможно хранение приготовленных чашек со средой до 10 сут при температуре +4–8 °С. В этом случае чашки помещают в плотно закрытые полиэтиленовые пакеты. При использовании свежеприготовленных или хранившихся чашек перед инокуляцией их необходимо подсушить путем инкубации при 37 °С с приоткрытой крышкой в течение 10–20 мин.

Приготовление инокулюма и инокуляция чашек с агаром

Для приготовления инокулюма используются чистые суточные культуры исследуемых и референтных штаммов микроорганизмов, выращенных на агаризованной среде. В качестве контрольных штаммов используется *E. coli*

ATCC 25922 — отрицательный контроль (БЛРС–) и *K. pneumoniae* ATCC 700603 — положительный контроль (БЛРС+). В пробирку с 3 мл стерильного физиологического раствора перенести несколько колоний стерильным тампоном или петлей. Взвесь бактериальных клеток довести до мутности 0,5 по McFarland и нанести стерильным ватным тампоном на поверхность агара Мюллера–Хинтона в трех различных направлениях.

Нанесение дисков с антибиотиками

Спустя 5–10 мин после инокулирования на подсохшую поверхность агара нанести диски с антибиотиками: в центр — диск содержащий амоксициллин/клавуланат (20/10 мкг), по бокам от него на расстоянии 20 и 30 мм между центрами дисков — диски с цефтазидимом (30 мкг) и цефотаксимом (30 мкг). При этом используются по два диска каждого антибиотика, расположенных на разном расстоянии от диска с клавулановой кислотой. Чашки поместить в термостат на 18–20 ч при температуре 35 °С. Одновременно с испытываемыми культурами исследуются контрольные штаммы.

Учет и интерпретация результатов

Продукция β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) определяется по обнаружению расширения зоны подавления роста между одним или несколькими дисками с оксиимино- β -лактамами и диском, содержащим клавулановую кислоту (рис.).

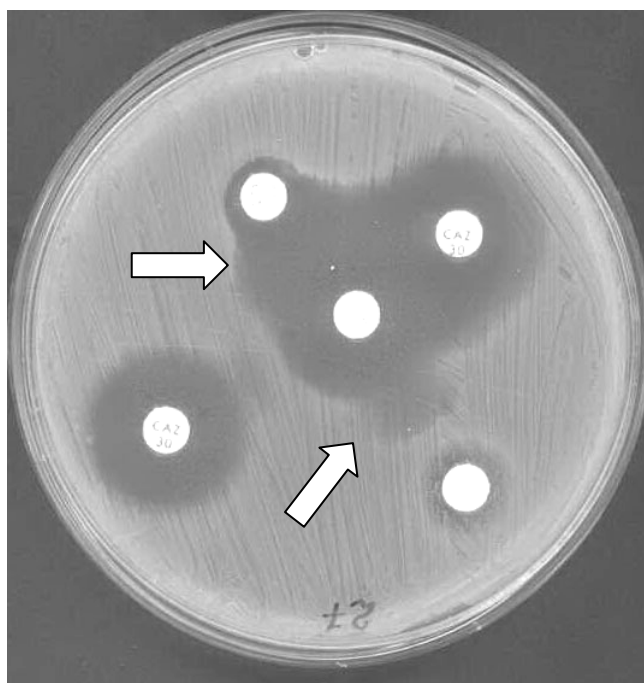


Рис. Положительный результат тестирования штамма *S. typhimurium* на предмет наличия БЛРС (расширение зоны подавления роста обозначено стрелками)

При этом учитывается только наличие или отсутствие расширения зоны подавления роста без учета ее диаметра. Дополнительно можно учитывать чувствительность исследуемого штамма микроорганизма к цефалоспорином III поколения, содержащимся в дисках. Учет результатов проводится путем измерения диаметра зоны подавления роста. Чувствительными штаммами считаются микроорганизмы с диаметром зоны подавления роста для цефотаксима ≥ 23 мм, цефтазидима ≥ 18 мм.

Выявленная продукция β -лактамаз расширенного спектра исследуемым штаммом *S. typhimurium* служит указанием на наличие резистентности к группе β -лактамных антибиотиков (за исключением цефамицинов и карбапенемов); кроме того, позволяет считать выявленный штамм полирезистентным к целому ряду антибактериальных препаратов (хлорамфеникол, ко-тримоксазол, тетрациклин, гентамицин) и может указывать на его внутрибольничное происхождение.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. При приготовлении чашек с агаром важно соблюдать определенные параметры, включающие толщину ($4,5 \pm 0,5$ мм) и равномерность слоя агара в чашке Петри. При увеличении толщины слоя агара уменьшаются зоны подавления роста, что может привести к ложноотрицательному результату. Еще более существенным является недостаток толщины агара; в этом случае может происходить отраженная диффузия антибиотика от дна чашки Петри с формированием больших зон подавления роста, указывающих на высокую чувствительность к антибиотику, что также не позволяет выявить продукцию β -лактамаз расширенного спектра.

2. Диски с антибиотиками, используемые для постановки метода, необходимо хранить в морозильных камерах при -20 °С, кроме того, они должны быть защищены от влаги. Нарушение указанных условий приводит к снижению активности содержащихся в дисках антибиотиков и неправильным результатам учета чувствительности.

3. Плотность инокулюма должна быть эквивалентна стандарту мутности 0,5 по McFarland. При использовании более плотной бактериальной суспензии можно получить ложную резистентность. При недостаточной плотности суспензии может быть отмечена ложная чувствительность тестируемого микроорганизма.