



ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ МЕЖДУНАРОДНЫХ И РОССИЙСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Бисенова Неля Михайловна-
д.б.н., профессор,
Руководитель микробиологической лабораторией
АО «Национальный научный медицинский центр»**

Общие положения

- Основной целью определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам является прогнозирование их эффективности при лечении инфекций у конкретных пациентов.
- Определение чувствительности также проводят при наблюдении за распространением резистентности среди микроорганизмов и в процессе изучения новых препаратов.

Показания для проведения антибиотикочувствительности



- Все м/о, выделенные из стерильных локусов



- Если уровень резистентности патогена не может быть предсказан на основании данных идентификации



- Если выделенный м/о относится к таксономической группе, для которой характерна высокая частота распространения приобретенной резистентности

Этапы проведения антибиотикочувствительности

Оценка целесообразности определения а/чув-ти
выделенного м/о

- Выбор антибактериальных препаратов,
подлежащих исследованию

Выбор методов определения антибиотикочувствительности
и контроля качества

- Интерпретация проведенных исследований и
выдача рекомендаций по лечению

Выбор антибактериальных препаратов, подлежащих включению в исследование



На основе данных о природной резистентности м/о и клинической эффективности антибиотиков



С учетом фармакинетических, токсикологических параметров препарата



С учетом локализации и тяжести инфекции

Методы оценки чувствительности

Метод	Значение
Диффузионные	
диско-диффузионный метод (ДДМ)	Диаметр подавления роста, мм
градиентной диффузии (Е-тесты и др.)	МПК, мкг/мл
Последовательных разведений	
разведений в агаре	МПК, мкг/мл
разведений в бульоне	МПК, мкг/мл
микроразведений в бульоне	МПК, мкг/мл
Автоматизированные системы	
модификация метода микроразведений в бульоне	МПК, категория S, I, R
Дополнительные методы выявления механизмов резистентности	Наличие отдельных факторов резистентности

Диско-диффузионный метод

Стандартизированное in vitro тестирование

Агар инокулируется взвесью тестируемого микроорганизма

Непрямой качественный метод. Критерии интерпретации – диаметр зоны подавления роста мм - S, I, R

Чувствительность определяется измерением диаметра зоны подавления роста (мм) вокруг диска, содержащего антибиотик

В качестве носителя АМП – бумажный диск.

В результате диффузии АМП в среду – образование зоны подавления роста.

В определенных пределах величина диаметра – обратно пропорциональна МПК. Однако ДДМ позволяет лишь косвенно судить о величине МПК.

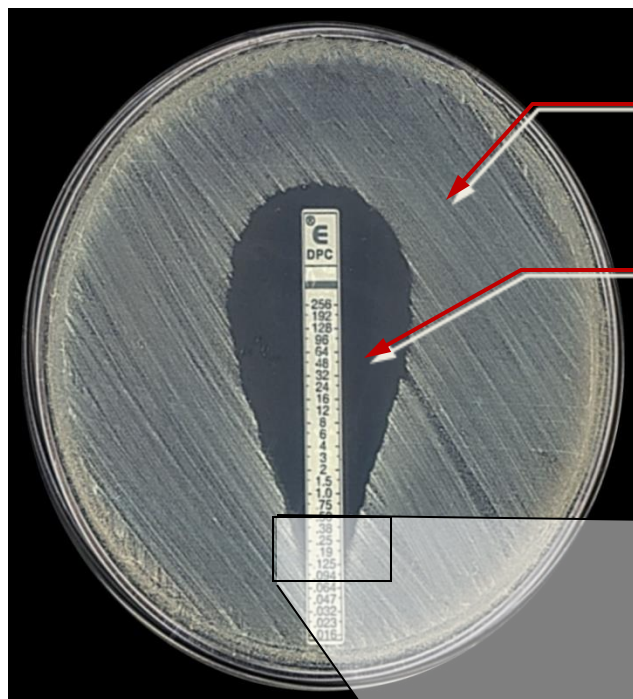
Результат – отнесение МО к одной из качественных категорий чувствительности.

МЕТОД ГРАДИЕНТНОЙ ДИФФУЗИИ



Представляет собой полосу полимера (или бумаги, картона), на которую нанесен градиент концентраций АМП. Подавление роста происходит только в той зоне, где концентрация АМП, диффундировавшего из носителя, превышает МПК. Образуется зона подавления роста эллипсовидной формы. Соответствующие значения концентрации нанесены в каждом участке носителя типографским способом на наружной (обращенной к исследователю) поверхности полоски.

Е-ТЕСТ: УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА

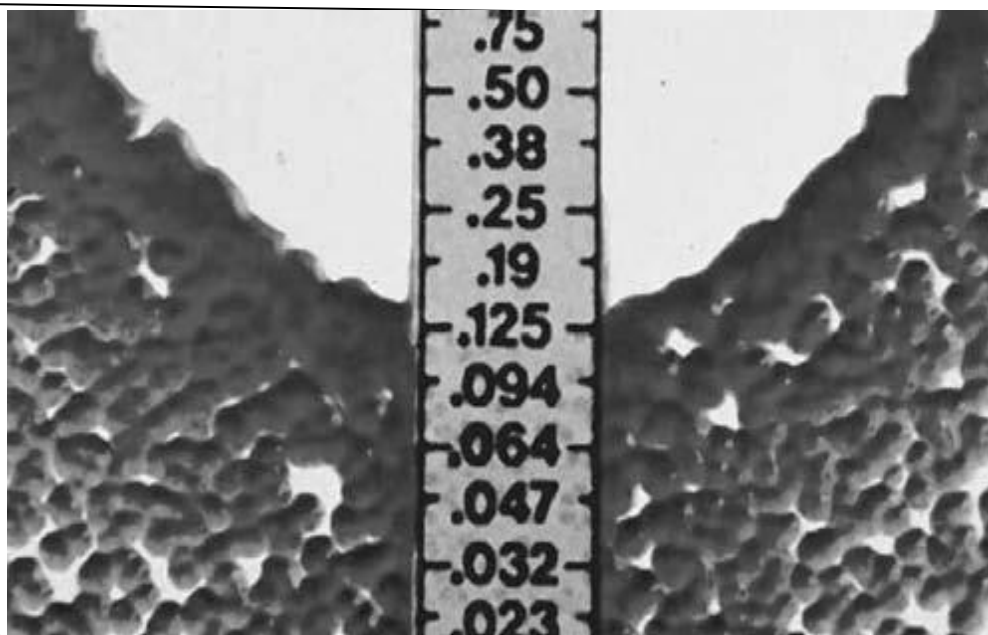


Рост бактерий

Эллипсовидная зона
подавления роста

МПК 0,125

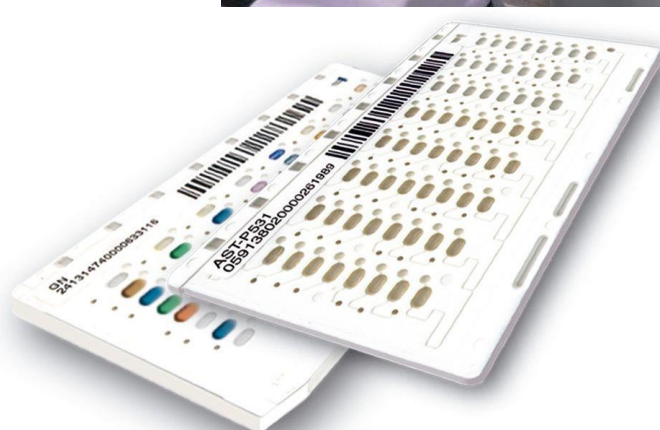
Величину МПК
учитывают в том месте,
где граница зоны
подавления роста
подходит вплотную
(пересекает) к носителю



Автоматизированные системы

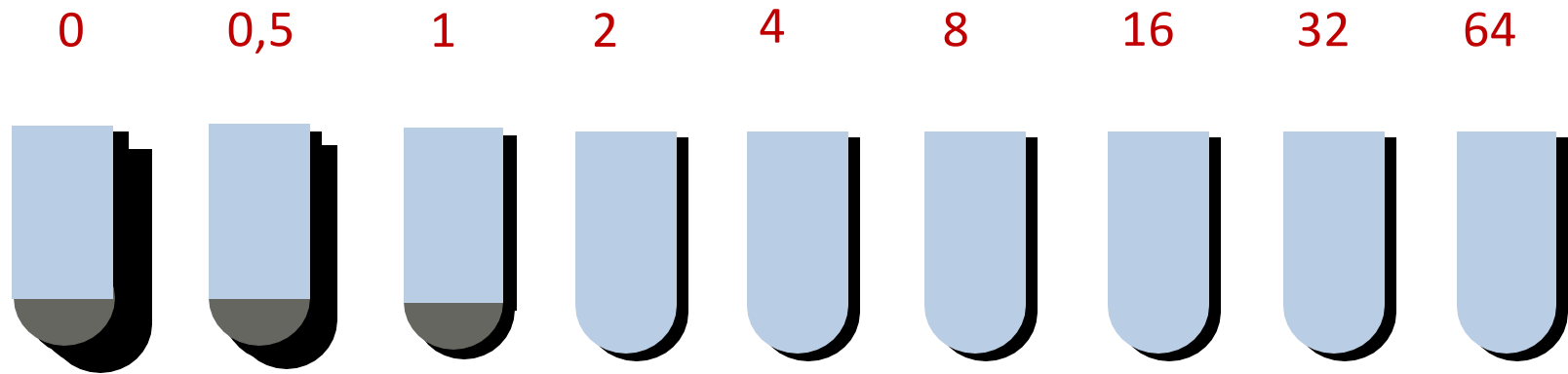
Модифицированный метод микроразведений в бульоне

Принцип – рост исследуемого микроорганизма в присутствии отдельных концентраций АБ



АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ

Концентрация антибиотика (мг/л)



Рост микроорганизма

Интерпретация

–

–

Чувствительный

+

–

Умеренно
резистентный

+

+

Резистентный

~ 2 – 5 разведений для каждого антибиотика в области пограничных концентраций

Международные рекомендации по определению чувствительности

Российская Федерация

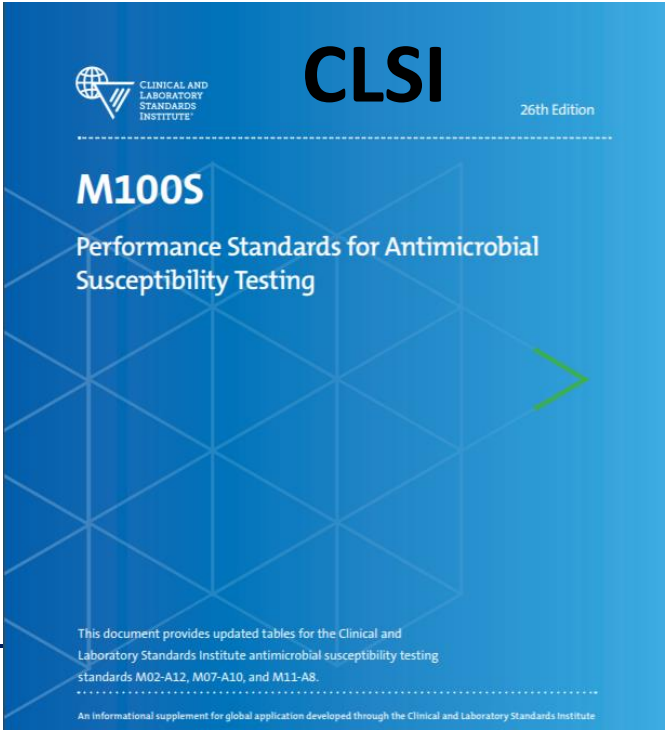


Клинические рекомендации

Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Версия-2018-03

Тип клинических рекомендаций: Интерпретация и правила проведения клинических лабораторных исследований



Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST)

Пограничные значения минимальных подавляющих концентраций и диаметров зон подавления роста для интерпретации результатов определения чувствительности

Версия 8.0, действует с 01.01.2018

Правила цитирования:

"Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста. Версия 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>."

Содержание	Страница	Дополнительная информация
Примечания и пояснения	1	
Рекомендации по использованию таблиц пограничных значений EUCAST	2	
Изменения	3	
Enterobacteriaceae (new taxonomy: Enterobacterales)	5	Включает все Enterobacterales
Pseudomonas spp.	11	
Stenotrophomonas maltophilia	15	Ссылка на пояснительный документ EUCAST по определению чувствительности Stenotrophomonas maltophilia
Burkholderia cepacia		Ссылка на пояснительный документ EUCAST по определению чувствительности Burkholderia cepacia



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

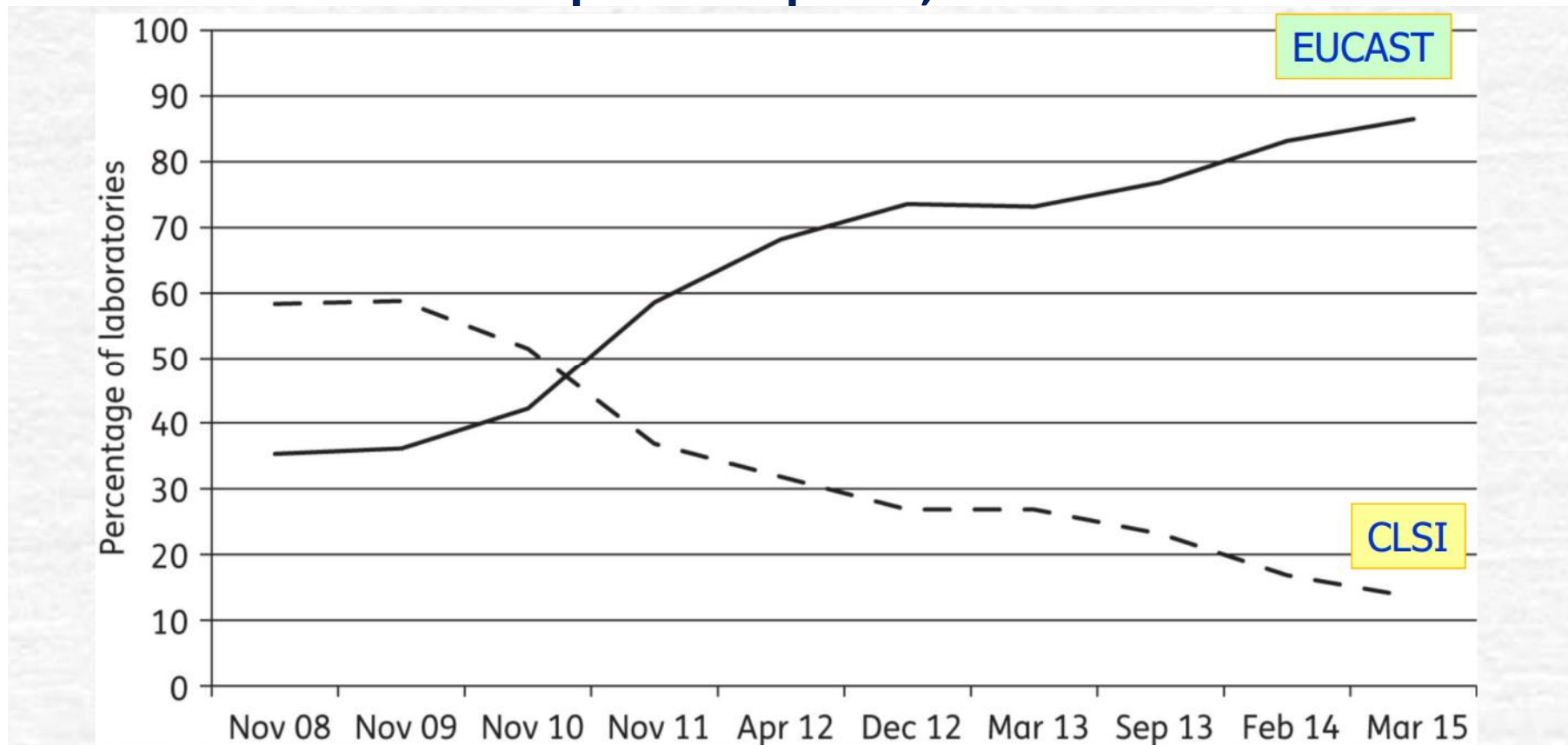
European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

- В настоящее время теоретически наиболее обоснованным представляется комплекс подходов к оценке чувствительности и интерпретации результатов, предлагаемый Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST).

ДДМ определения чувствительности к антибиотикам по EUCAST, апрель 2016



Широкое внедрение критериев EUCAST при определении чувствительности к антимикробным препаратам в странах Европы, 2015



Использование критериев EUCAST и CLSI в Европе участниками UKNEQAS
(630-750 лабораторий в год из 40 стран)



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

- Гистограммы и таблицы распределения МПК основных антибиотиков в отношении значительной части возбудителей инфекционных заболеваний человека доступны на веб-сайте EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website. <http://www.eucast.org>).
- На веб-сайте EUCAST также доступны гистограммы и таблицы распределения диаметров зон подавления роста, полученных с использованием диско-диффузионного метода EUCAST.

Различия критерий оценки чувствительности

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *Enterobacteriaceae* К КАРБАПЕНЕМАМ

Пограничные значения МПК, мг/л

Антибиотик	Россия (МУК 4.2-2004)		США (CLSI-2014)		Европа (EUCAST-2014)	
	S	R	S	R	S	R
Имипенем	≤4	≥16	≤1	≥4	≤2	>8
Меропенем	≤4	≥16	≤1	≥4	≤2	>8
Эртапенем	≤2	≥8	≤0,5	≥2	≤0,5	>1

Полная ясность?

Основные отличия CLSI и EUCAST

- Формат предоставления пограничных концентраций

	CLSI	EUCAST
МПК, мг/л	$\leq$	$\leq$
	$\geq$	$>$
Диаметр зоны подавления роста, мм	$\geq$	$\geq$
	$\leq$	$<$

- Содержание некоторых антибиотиков в дисках

Антибиотик	Содержание в диске, мкг	
	CLSI	EUCAST
Пенициллин	10 ЕД	1 ЕД
Пиперациллин	100	30
Пиперациллин-тазобактам	100-10	30-6
Цефотаксим	30	5
Цефтазидим	30	10
Цефтаролин	30	5
Нетилмицин	30	10
Ампициллин (<i>Enterococcus</i> spp., <i>H. influenzae</i> , <i>L. monocytogenes</i>)	10	2
Гентамицин (<i>Enterococcus</i> spp.)	120	30

- Использование контрольных штаммов и контрольных диапазонов значений для них (диаметры зон подавления роста и МПК)

Основные отличия CLSI и EUCAST

Пограничные концентрации для отдельных комбинаций микроорганизм/антибиотик

- **В двух стандартах совпадают всего 30-40% контрольных точек**
- **Стандарт EUCAST более консервативен – более 50% контрольных точек для МПК ниже в сравнении с стандартом CLSI**

Диско - диффузионный метод оценки чувствительности бактерий к АМП

- Диско - диффузионный метод, будучи одним из старейших, остается наиболее распространенным методом оценки антибиотико чувствительности в практических бактериологических лабораториях. Этот метод подходит для исследования большинства бактериальных патогенов, в том числе и для наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями.
- Метод является универсальным для широкого круга антимикробных препаратов и не требует обязательного использования специального оборудования. Предлагаемый вариант диско - диффузионного метода стандартизован EUCAST.
- Для получения достоверных результатов, необходимо четко следовать описанной методике без каких - либо отступлений.

Приготовление и хранение питательных сред

- Для оценки чувствительности бактерий с обычными питательными потребностями используют агар Мюллера - Хинтон (МХА) без дополнительных добавок.
- Для бактерий со сложными питательными потребностями используют агар Мюллера - Хинтон с добавлением 5% механически дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β - НАД (МХА-П).

Питательные среды для определения чувствительности бактерий к антибиотикам

Микроорганизм	Среда
Enterobacteriaceae	МХА
Pseudomonas spp.	МХА
Stenotrophomonas maltophilia	МХА
Acinetobacter spp.	МХА
Staphylococcus spp.	МХА
Enterococcus spp.	МХА
Стрептококки групп А, В, С и G	МХА-П
Streptococcus pneumoniae	МХА-П
Стрептококки группы viridans	МХА-П
Haemophilus influenzae	МХА-П
Moraxella catarrhalis	МХА-П
Listeria monocytogenes	МХА-П

МХА + 5% дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β - НАД

Факторы, влияющие на диаметр зоны подавления роста

1 Питательная среда	2 Антибиотики	3 Изолят	4 Условия инкубации	5 Метод учета результатов
состав	молекулярная масса	Вид м/о	атмосфера	интенсивность и угол освещения
рН	количество в диске	плотность инокулюма	температура	
влажность	скорость диффузии в агар	скорость роста	длительность	
плотность	стабильность			
содержание ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} и др. веществ	растворимость			
	наличие активных и неактивных примесей			

Условия инкубации при определении чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом

Микроорганизм	Условия инкубации
Enterobacteriaceae	35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Pseudomonas spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Stenotrophomonas maltophilia	35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Acinetobacter spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Staphylococcus spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч
Enterococcus spp.	35±1°C, обычная атмосфера, 16-20 ч (24 часа – для гликопептидов)
Стрептококки групп А, В, С и G	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов
Стрептококки группы viridans	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов
Haemophilus influenzae Moraxella catarrhalis	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов
Listeria monocytogenes	35±1°C, атмосфера с 4-6% CO ₂ , 16-20 часов

Контроль качества



**Европейский комитет
по определению чувствительности к антимикробным препаратам**
Повседневная и расширенная программы внутреннего контроля качества,
рекомендованные EUCAST

Версия 8.0, действует с 01.01.2018

- Для контроля качества выполнения методики определения чувствительности используют специальные штаммы.
- Основные рекомендованные контрольные штаммы характеризуются чувствительностью к антибиотикам; в то же время для подтверждения способности метода выявлять резистентность, опосредованную известными механизмами, необходимо использовать устойчивые штаммы. (Расширенный контроль качества).
- Контрольные штаммы могут быть получены из коллекций типовых культур или коммерческих источников.

Перечень контрольных штаммов микроорганизмов, рекомендуемых для использования в повседневной практике

- *Escherichia coli* ATCC 25922 - Чувствительный, дикий тип
- *Escherichia coli* ATCC 35218 - Продуцент TEM-1, устойчив к ампициллину (для контроля ингибирующего компонента дисков с комбинациями β -лактамов с ингибиторами β лактамаз).
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 - Продуцент ESBL (SHV-18) (для контроля ингибирующего компонента дисков с комбинациями β -лактамов с ингибиторами β лактамаз)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - Чувствительный, дикий тип
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 - Слабый продуцент β лактамаз

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 - Чувствительный, дикий тип
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 - Сниженная чувствительность к бензилпенициллину
- *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 - Чувствительный, дикий тип
- *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 - Чувствительный, дикий тип.
- Контрольные штаммы необходимо хранить в условиях, обеспечивающих их жизнеспособность и стабильность фенотипа. Наиболее удобный метод – хранение в среде с добавлением глицерина при температуре -70°C . Неприхотливые микроорганизмы могут храниться при -20°C . Каждый контрольный штамм должен храниться в двух экземплярах (пробирках), один для регулярного использования, а второй как резервный.

Дополнительный перечень контрольных штаммов для детекции специфических механизмов резистентности

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 - Продуцент ESBL (SHV-18)
- *Staphylococcus aureus* NCTC 12493 mecA-положительный, гетеро-резистентный MRSA
- *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 - Высокий уровень резистентности к аминогликозидам (HLAR) и резистентность к ванкомицину (vanB положительный)
- *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 - Сниженная чувствительность к β -лактамам за счет мутаций в генах ПСБ (β -лактамаза-отрицательный, ампициллин-резистентный (BLNAR)).

Контроль качества

- Каждую неделю следует субкультивировать штамм из пробирки, предназначенной для регулярного использования на соответствующей неселективной среде.
- После контроля чистоты культуры этот рассев должен использоваться ежедневно для подготовки субкультуры контрольного штамма. Привередливые микроорганизмы, жизнеспособность которых не сохраняется при хранении на чашках в течение 5-6 дней, следует пересевать ежедневно, но не более чем в течение одной недели.
- Для субкультивирования контрольного штамма необходимо использовать несколько колоний, чтобы избежать селекции мутантных вариантов.
- Необходимо проверить соответствие полученных значений допустимым диапазонам значений для контрольных штаммов.
- При повторных исследованиях значения диаметров зоны подавления роста контрольных штаммов должны случайным образом распределяться внутри рекомендуемого диапазона, а при наличии результатов ≥ 10 исследований, среднее арифметическое должно быть близким к целевому значению (± 1 мм от целевого значения).

Контроль качества

- Для контроля качества определения чувствительности следует использовать рекомендованные контрольные штаммы для повседневного (рутинного) контроля.
- Контроль качества определения чувствительности с использованием набора рекомендованных контрольных штаммов следует проводить ежедневно, по крайней мере, для тех антибиотиков, которые включены в стандартные панели (наборы).
- Результаты каждого исследования контрольного штамма следует сравнивать с результатами последних 20 исследований этого же контрольного штамма для своевременного выявления тенденции увеличения или уменьшения зон подавления роста по сравнению с целевыми значениями.
- Результаты двух или более из 20 тестов, выходящие за рамки допустимого диапазона, требуют проведения мероприятий для выяснения причин получения нестабильных результатов.

Контроль качества

- В дополнение к повседневному контролю качества, контрольные исследования необходимо проводить перед началом использования каждой новой партий МХА.
- Несоответствие результатов исследования контрольных штаммов допустимым диапазонам по отдельным антибиотикам может свидетельствовать о ненадлежащем составе среды: аминогликозиды могут выявлять недопустимые вариации двухвалентных катионов, тигециклин – содержания магния, тремитоприм-сульфаметоксазол – тимина, эритромицин – ненадлежащее значение pH.
- Дополнительно к повседневному контролю качества EUCAST рекомендует использовать расширенный перечень контрольных штаммов для контроля качества выявления отдельных механизмов резистентности (ESBL, MRSA, VRE, HLAR и мутаций ПСБ).
- Эти штаммы используются для проверки того, что результаты рутинного определения чувствительности попадают в надлежащую клиническую категорию Ч, УР, Р.
- Контрольные исследования с использованием дополнительного перечня контрольных штаммов следует выполнять при изменениях любых параметров тестирования (новая партия дисков или среды) и/или ежемесячно.

Рекомендации по использованию таблиц пограничных значений

Рекомендации по использованию таблиц пограничных значений

Пограничные значения EUCAST, версия 7.1, действует с 10.03.2017

Если в строке содержится название вида, пограничные значения, указанные в ней, применимы только для представителей этого вида (в данном примере - для *S. aureus*)

Значения для категории "умеренно-резистентный" не указаны. К категории УР относятся значения, находящиеся в интервале между пограничными значениями категорий Ч и Р. Если пограничные значения категорий Ч и Р равны, то категории УР не существует.
Антибиотик А: нет категории УР
Антибиотик В: УР 4 мг/л, 23-25 мм
Антибиотик П: УР: 1-2 мг/л, 24-29 мм

Диско-диффузионный метод (стандартизованный диско-диффузионный метод EUCAST)

Питательная среда:

Инокулюм:

Инкубация:

Учет результатов:

Контроль качества:

Параметры диско-диффузионного метода для определения чувствительности и рекомендации по проведению контроля качества

Антимикробный препарат	Пограничные значения МПК (мг/л)		Содержание в диске (мкг)	Пограничные значения диаметра зон подавления роста (мм)		Примечание
	Ч ≤	Р >		Ч ≥	Р <	
Антимикробный препарат А	1 ¹	1 ¹	X	20 ^A	20 ^A	1. Примечание, являющееся общим комментарием и/или относящееся к пограничным значениям МПК.
Антимикробный препарат В, <i>S. aureus</i>	2	4	Y	26	23	2. Новый комментарий
Антимикробный препарат С	НД	НД		НД	НД	Удаленный комментарий
Антимикробный препарат D	-	-		-	-	А. Комментарии для пограничных значений ддм
Антимикробный препарат E	Вa	Вa		Вa	Вa	
Антимикробный препарат F (скрининг)	НП	НП	Y	25	25	
Антимикробный препарат G	0,5	2	Z	30	24	

Пограничные значения для скрининга - т.е. для дифференциации изолятов, имеющих и не имеющих механизмы резистентности

Гиперссылки на сайт, содержащий данные по распределению значений МПК, выделены синим цветом

Не применимо

В процессе валидации

Изменения по сравнению с предыдущей версией выделены

Пограничные значения не определены. Определение чувствительности проводить не рекомендуется

Гиперссылки на пояснительные документы EUCAST

Не получено убедительных доказательств эффективности терапии инфекции, вызванной данным микроорганизмом или группой микроорганизмов

Гиперссылки на сайт, содержащий данные по распределению значений диаметров зон подавления роста, выделены синим цветом

Экспертные правила оценки чувствительности к антимикробным препаратам

- Это описание действий, которые должны быть предприняты микробиологом на основании полученных результатов определения чувствительности и специальных методов выделения механизмов резистентности



Руководство EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение

Редакция 1.0
Декабрь 2013 г.

Состав Подкомитета EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, обладающих особым клиническим и/или эпидемиологическим значением, входят:

Кристиан Г. Гиске (Christian G. Giske) (Швеция, председатель Руководящего комитета и Координационной группы EUCAST), Луис Мартинес-Мартинес (Luis Martinez-Martinez) (Испания, член Руководящего комитета EUCAST), Рафаэль Кантон (Rafael Cantón) (Испания, председатель EUCAST), Стефания Стефани (Stefania Stefani) (Италия), Роберт Скв (Robert Skov) (Дания, член Руководящего комитета EUCAST), Юрий Глупшинский (Youri Glupczynski) (Бельгия), Патрис Нордман (Patrice Nordmann) (Франция), Мэнди Вуттон (Mandy Wootton) (Великобритания), Виви Мирьягу (Vivi Miriagou) (Греция), Гуннар Скв Симонсен (Gunnar Skov Simonsen) (Норвегия, член Координационной группы Европейской сети по наблюдению за антимикробной устойчивостью - EARS-Net), Хелена Земликова (Helena Zemlickova) (Чехия, член Координационной группы EARS-Net), Джеймс Коэн-Стьюарт (James Cohen-Stuart) (Нидерланды) и Марек Гнядковский (Marek Gniadkowski) (Польша).



Экспертные правила EUCAST Версия 3.1

Природная резистентность и редкие фенотипы

Таблицы

Экспертные правила EUCAST, версия 2.0 были опубликованы 29 октября 2011 года (http://www.eucast.org/expert_rules). В течение прошедшего года эти правила были пересмотрены, в результате чего в таблицы фенотипов природной резистентности и редких фенотипов были внесены изменения, согласованные в процессе консультаций с широким кругом экспертов с последующим обсуждением руководящим комитетом EUCAST (октябрь-декабрь 2015). Новая версия правил о природной резистентности и редких фенотипах (таблицы 1-7, версия 3.0) с описанием изменений по сравнению с версией 2.0 были опубликованы 9 сентября 2016 года. Версия 3.1 включает исправленные типографские опечатки, допущенные в версии 3.0.

Что нужно для перехода на стандарт EUCAST

- Оценить необходимость перехода на стандарт EUCAST
- Изучить стандарт EUCAST, оценить преимущества и недостатки, определить основные отличия от действующих ранее документов
- Определить возможность применения EUCAST для всех методов определения чувствительности в лаборатории
- Составить список всех необходимых материалов и определить возможность их приобретения
- Определить/обеспечить готовность систем поддержки (ЛИС, СОП и т.д.)
- Разработать программу обучения персонала
- Определить круг заинтересованных лиц (организаций) и информировать их о переходе на стандарт EUCAST (поставщики, заказчики и т.д.)
- При возникновении вопросов консультироваться с лабораториями, успешно внедрившим стандарт EUCAST

Заключение

- **Регулярный пересмотр стандартов – объективная необходимость, в связи с накоплением новых клинических и лабораторных данных**
- **Методы определения чувствительности (ДДМ, методы разведений) остаются неизменными**
- **Необходимо строгое соответствие методики и рекомендаций по интерпретации результатов**



**БЛАГОДАРЮ
ЗА
ВНИМАНИЕ**