

Тестирование к антибиотикам возбудителей инфекций — необходимое условие адекватной антибактериальной терапии

Л. Г. Боронина, С. М. Блинова

Кафедра клинической лабораторной и микробиологической диагностики ФУВ и ПП.
Уральской государственной медицинской академии, Екатеринбург

На современном этапе развития доказательной медицины одной из приоритетных задач, решаемых лабораториями клинической микробиологии ЛПУ, является тестирование выделенных культур микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Именно определение чувствительности к антибиотикам этиологически значимых микроорганизмов позволяет назначить этиотропную терапию в стационаре. Необходимым условием целенаправленного назначения антибактериальной терапии является точное определение антибиотикорезистентности выделенных в лабораториях ЛПУ культур микроорганизмов. Поэтому правильное выполнение этой задачи лежит в основе адекватной антибиотикотерапии.

Основой для выбора антибактериальных препаратов, подлежащих включению в тестирование, являются данные о природной резистентности или чувствительности отдельных микроорганизмов или их групп, о распространенности среди них приобретенной резистентности и ее механизмах, а также о клинической эффективности антибиотиков.

Правильность выполнения тестирования микроорганизмов на чувствительность к антибиотикам зависит от ряда условий.

Стандартизация методов определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам включает адекватный выбор сред; в настоящее время для определения чувствительности к антибиотикам в соответствии с МУК 4.2.1890-04 должна использоваться среда Мюллера-Хинтона, а не АГВ; дисков, применяемых для диско-диффузионного метода (ДДМ), которые должны быть произведены лицензированными производителями; не допускается применение дисков и субстанций (применительно к методам разведений), производимых в лабораториях, а также методик тестирования. Кроме того, соблюдение стандартов при проведении тестирования подразумевает и воспроизводимость результатов.

Цель исследования

Выявление наиболее часто встречающихся лабораторных ошибок при тестировании микроорганизмов на чувствительность к антибиотикам.

Материалы и методы исследования

Проанализированы годовые отчеты лабораторий клинической микробиологии ЛПУ Свердловской области, отчеты специалистов-бактериологов при сдаче квалификационных тестов, решения ситуационных задач курсантами кафедры по разделу тестирования микроорганизмов на чувствительность к антибиотикам за пятилетний период. Анализ отчетов проводился в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», введенными взамен «Методических указаний по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков» № 2675-83 [4].

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования было выявлено, что не все лаборатории ЛПУ придерживаются МУК 4.2.1890-04: для тестирования применяется среда АГВ, а не Мюллера-Хинтона. Однако сравнительное тестирование на чувствительность к антибиотикам на среде АГВ и Мюллера-Хинтона демонстрирует непригодность для тестирования среды АГВ. Например, при определении чувствительности к антибиотикам *S. pyogenes* тестирование к линкомицину и ванкомицину дает ложноотрицательные результаты при использовании среды АГВ (табл. 1); при определении чувствительности к антибиотикам *P. aeruginosa* тестирование к гентамицину и цефтазидиму также дает ложные, отличные от использования среды Мюллера-Хинтона, результаты (табл. 2). Результаты тестирования на агаре Мюллера-Хинтона совпадают с результатами

Таблица 1. Результаты сравнительного тестирования *S. pyogenes* на чувствительность к антибиотикам на среде АГВ и агаре Мюллера-Хинтона (АМХ)

Антибиотик	АГВ	АМХ
Хлорамфеникол	R	R
Амикацин	R	R
Азитромицин	R	R
Ципрофлоксацин	R	R
Линкомицин	R	S
Ванкомицин	R	S

Таблица 2. Результаты сравнительного тестирования *P. aeruginosa* на чувствительность к антибиотикам на среде АГВ и агаре Мюллера-Хинтона (АМХ)

Антибиотик	АГВ	АМХ
Гентамицин	S	R
Цефтазидим	I	S
Амикацин	S	S
Ципрофлоксацин	S	S
Цефтриаксон	I	I
Имипенем	S	S

тестирования методами разведений, поэтому являются достоверными.

Для проведения внутреннего контроля качества всех параметров, применяемых для тестирования, необходимо использование соответствующих контрольных штаммов АТСС и регулярное проведение внутреннего контроля качества. При анализе отчетов обнаружено, что лаборатории часто не имеют в своих музеях необходимых контрольных штаммов АТСС для проведения регулярного контроля качества. Список необходимых контрольных штаммов в соответствии с МУК 4.2.1890-04 приведен в табл. 3.

В связи с тем, что ряд микроорганизмов и ряд антибиотиков для тестирования имеют определенные особенности, приводим примеры

наиболее часто встречающихся ошибок при тестировании. Важно также помнить о том, что тестированию подлежат только чистые культуры выделенных микроорганизмов.

Стафилококки. Для определения чувствительности к β -лактамам ДДМ используют тестирование к пенициллину, а также к оксациллину с применением скрининговой методики или модификации ДДМ с диском оксацилина с нагрузкой 1 мкг; использование других β -лактамов для тестирования нецелесообразно, поскольку тестирование к пенициллину и оксациллину дает возможность экстраполяции результатов на остальные β -лактамы антибиотиков. При обнаружении пограничных значений зон ингибиции роста или резистентных результатов при тестировании к оксациллину

Таблица 3. Контрольные штаммы микроорганизмов, необходимые для тестирования на чувствительность к антибиотикам

Вид микроорганизма контрольного штамма	АТСС	Назначение
<i>E. coli</i>	25 922	для тестирования энтеробактерий; отрицательный контроль ESBL (-)
<i>E. coli</i>	35 218	для тестирования энтеробактерий к ингибитор-защищенным β -лактамам; отрицательный контроль при тестировании гемофил
<i>K. pneumoniae</i>	700 603	положительный контроль ESBL (+)
<i>P. aeruginosa</i>	27 853	для тестирования псевдомонад и других НФГОБ
<i>H. influenzae</i>	49 247	для тестирования <i>H. influenzae</i>
<i>H. influenzae</i>	10 211	для тестирования пригодности ростовых свойств агара НТМ; отрицательный контроль в нитроцефиновом тесте
<i>H. influenzae</i>	49 766	для тестирования к карбапенемам
<i>N. gonorrhoeae</i>	49 226	для тестирования гонококков
<i>S. aureus</i>	29 213	для тестирования стафилококков методом серийных разведений; положительный контроль в нитроцефиновом тесте; отрицательный контроль при скрининге на агаре на метициллинорезистентность
<i>S. aureus</i>	25 923	для тестирования стафилококков ДДМ
<i>S. aureus</i>	38 591	положительный контроль при скрининге на агаре на метициллинорезистентность
<i>S. pneumoniae</i>	49 619	для тестирования пневмококков и других стрептококков
<i>E. faecalis</i>	29 212	для тестирования энтерококков

необходимо проверить результат любым методом с определением МПК, а тестирование к пенициллину целесообразно заменить нитроцефиновым (или аналогичным) тестом.

При выявлении метициллинорезистентных стафилококков (MRSA/MRSE) препаратами выбора для лечения таких инфекций являются гликопептиды (ванкомицин). На сегодня в нашей стране ванкомицинорезистентных штаммов золотистого стафилококка не выявлено; поэтому при обнаружении таких штаммов необходимо проверить все — и результаты тестирования на чувствительность к антибиотикам и идентификации, и чистоту культуры. Необходимо помнить, что молекула ванкомицина — крупная, с большим весом и плохо диффундирует в агаровую среду, поэтому не нужно ожидать «больших» зон ингибиции роста. Такие результаты не должны выдаваться необдуманно, как рутинная практика; в случае **достоверных** сомнений штамм передается в референс-лабораторию [4, 5, 6].

Энтерококки имеют природную резистентность ко многим антибиотикам, поэтому выбор препаратов для тестирования ограничен, однако обязательными к тестированию являются ампициллин, ванкомицин, линезолид, высокая резистентность к гентамицину и стрептомицину.

Особую озабоченность вызывает определение чувствительности к ванкомицину ДДМ. Молекула ванкомицина имеет большой вес и плохо диффундирует в агаровую среду, поэтому не нужно ожидать «больших» зон ингибиции роста. В настоящее время выделены штаммы ванкомицинорезистентных энтерококков и в нашей стране, чаще всего это штаммы *E. faecium*; поэтому при выдаче ответа «ванкомицинорезистентный *E. faecalis*», нужно быть абсолютно уверенным в правильности идентификации культуры и правильности проведенного тестирования к ванкомицину.

Есть ошибки и при тестировании энтерококков для выявления высокого уровня резистентности к гентамицину и стрептомицину. В случае тестирования ДДМ диски с антибиотиками должны иметь **повышенную нагрузку** — 120 мкг для гентамицина и 300 мкг для стрептомицина, а не 10 мкг (стандартная нагрузка) [4, 5, 6].

Стрептококки. Особенностью тестирования стрептококков ДДМ является требование к среде — это должен быть агар Мюллера-Хинтона с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови. При проведении тестирования стрептококки можно условно разделить на 3 группы: β -гемолитические стрептококки (группы А и В); стрептококки группы «*viridans*»; пневмококки.

1) **β -гемолитические стрептококки.** На сегодня штаммов *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, устойчивых к пенициллину и ванкомицину не описано, поэтому тестирование к этим антибиотикам нецелесообразно; тем не менее, если лаборатория выдает ответ о резистентности испытуемого штамма, то он вызывает законные сомнения. Необходимо перепроверять весь ход исследования, включая постановку теста чувствительности.

2) **Стрептококки группы «*viridans*».** Тестирование на чувствительность к антибиотикам стрептококков группы «*viridans*» из нестерильных в норме люков не проводится. При тестировании стрептококков группы «*viridans*», выделенных из крови или ликвора, должен использоваться только **метод серийных разведений в бульоне**, для которого разработаны критерии оценки.

3) **Пневмококки.** В первую очередь необходимо тестировать пневмококки на чувствительность к пенициллину. Однако, ДДМ можно провести только **скрининг на пенициллинорезистентность с применением диска с оксациллином с нагрузкой 1 мкг**; при получении пограничных значений или результатов о резистентности штамма необходимо подтвердить полученные данные путем определения МПК пенициллина методом разведений в бульоне или с помощью Е-тестов. В этом случае также проводится определение МПК и для других β -лактамов антибиотиков методом разведений в бульоне или с помощью Е-тестов. Главное, о чем следует помнить — это невозможность определения чувствительности к β -лактамам препаратам ДДМ; а также невозможность определения чувствительности методом разведений в агаре [4, 5, 6].

Haemophilus influenzae. Выделение и тестирование гемофильных бактерий на чувствительность к антибиотикам сопряжено с определенными трудностями. Прежде всего — тестирование ДДМ должно осуществляться только на НТМ-агаре, а не на шоколадном или любом другом, которые не являются стандартизованными; при определении чувствительности к β -лактамам антибиотикам необходимо использовать нитроцефиновый (или аналогичный) тест, чего большинство лабораторий не делает. Поэтому и появляются сообщения о выделении «резистентных» штаммов этого возбудителя, т. е. регистрируется ложная резистентность [1, 2, 3, 4, 7].

Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ). При тестировании НГОБ необходимо помнить, что ДДМ стандартизован только для синегнойной палочки и ацинетобактеров, при тестировании других НГОБ нужно использовать методы серийных

разведений. При оценке результатов необходимо помнить, что определенные виды НГОБ имеют природную резистентность к ряду антибиотиков (например, *S. maltophilia* — ко многим β-лактамам, в т. ч. — имипенему, *V. serotia* — к имипенему и др.) [4, 5, 6].

Энтеробактерии. Крайне важной является проблема продукции β-лактамаз расширенного спектра (ESBL) энтеробактериями, и не только потому что это актуально для лечения конкретного больного, но и потому, что такие штаммы часто являются полирезистентными и могут выступать как внутрибольничные патогены. Однако далеко не во всех лабораториях занимаются диагностикой ESBL. Диагностика ESBL не вызывает больших сложностей — предложены методики, основанные на модификациях ДДМ (например, метод двойных дисков), что под силу любой лаборатории, занимающейся тестированием микроорганизмов на чувствительность к антибиотикам [4, 5, 6].

Литература

1. Борокина Л. Г. Антибиотикорезистентность возбудителей хронических бронхоструктурных инфекций у детей к β-лактамам и цефалоспорином [Текст] / Л. Г. Борокина, М. П. Кукушкина, С. М. Блинова // Человек и лекарство: материалы XI Всероссийского конгресса. — Москва, 2004. — С. 426.
2. Борокина Л. Г. Антибиотикорезистентность штаммов *Haemophilus influenzae*, выделенных от детей с хроническими воспалительными заболеваниями бронхов и легких [Текст] / Л. Г. Борокина, С. М. Блинова // Клини. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. — 2005. — Т. 7, №2. — С. 15.
3. Борокина Л. Г. Лабораторные методы обнаружения и идентификации *Haemophilus influenzae* [Текст]: методические рекомендации / Л. Г. Борокина; УГМА Екатеринбург, 1999. — 17 с.
4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Текст]: методические указания 4.2.1890-04. — М.: Федеральный центр госстандартнадзора Минздрава России, 2004. — 91 с.
5. Практические аспекты современной клинической микробиологии [Текст] / Л. З. Скала, С. В. Сидоренко, А. Г. Нехорошева, И. И. Лукин, С. А. Грудинина. — Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2004. — 312 с.
6. Страчунский Л. С. Современные методы клинической микробиологии [Текст] / Л. С. Страчунский, Р. С. Коалов. — Смоленск: МАКМАХ, 2003. — Вып. 1. — 104 с.
7. Boronina L. G. Resistance of bacteria isolated from children with chronic bronchopulmonary disease: abstract 2nd the International «Resistant gram-positive infection». Berlin. 10–12 december, 2004 year. [Text]. — Berlin. — 2004. — 208 p.

Выводы

Проведенный анализ свидетельствует о значительном количестве (до 20%) ошибок по определению чувствительности микроорганизмов, которые встречаются на всех этапах тестирования — при выборе среды для тестирования, дисков для ДДМ, выборе и правильности постановки методик, интерпретации полученных результатов.

Тестирование микроорганизмов на чувствительность к антибиотикам в большинстве лабораторий ЛПУ проводится не в соответствии с НТД — МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Исходя из важности проводимого тестирования для антибиотикотерапии и невозможности по каким-либо причинам обеспечения правильного определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам правильнее, на наш взгляд, было бы отказаться от таких исследований, чем выдавать ложные результаты.