

## **ЧАСТЬ 2**

### **СПЕЦИАЛЬНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

## ГЛАВА 2.1.

### **ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДОЛОГИИ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

#### **РЕЗЮМЕ**

*Исторически, при выборе антимикробных препаратов для лечения инфекционных заболеваний, вызванных бактериями, врачи и ветеринары руководствовались, прежде всего, клиническим опытом из прошлого. Однако, по мере увеличения резистентности бактерий к традиционно применяемым антимикробным препаратам, клиницистам стало труднее подбирать подходящие антимикробные средства эмпирически. В результате тестирование важных патогенных бактерий *in vitro* на чувствительность к антимикробным препаратам (ГЧАП), проводимое на правильно собранных образцах, должно основываться на хорошо проверенных и аттестованных («валидированных») методах. Таким образом, ГЧАП представляет собой важный компонент рациональных рекомендаций по использованию антимикробных препаратов в животноводстве во всемирном масштабе, и такие данные должны быть доступными для ветеринаров во всех странах, чтобы они могли принимать обоснованные решения на основе полной информации.*

*Хотя и существует множество методов, цель тестирования на чувствительность к антимикробным препаратам *in vitro* заключается в том, чтобы обеспечить надежные предикторы (прогностические факторы) для предварительной оценки возможной реакции микроорганизма на антимикробную терапию для инфицированного хозяина. Информация такого рода помогает клиницистам выбирать подходящие антимикробные средства, помогает развивать стратегию использования антимикробных препаратов, а также обеспечивает надежные данные для эпидемиологического мониторинга. Такие данные эпидемиологического мониторинга создают основу для адекватного выбора эмпирического лечения (терапия первой линии), а также для того, чтобы обнаруживать появление и/или распространение резистентных бактериальных штаммов или детерминант резистентности у разных видов бактерий. Выбор конкретного метода ГЧАП основан на оценке многих факторов, таких как аттестация («валидация») метода, его практичность, гибкость, автоматизация, стоимость, воспроизводимость, точность и индивидуальные предпочтения пользователя.*

*Дополнительным способом для увеличения скорости и точности тестирования на чувствительность стало развитие генотипических подходов к выявлению генов резистентности к антимикробным препаратам. Для выявления резистентности бактерий к антибиотикам на генетическом уровне разработаны и продолжают появляться многочисленные анализы на основе ДНК. Эти методы, особенно в комбинации с фенотипическим анализом, открывают хорошие перспективы для увеличения чувствительности, специфичности и скорости обнаружения конкретных генов резистентности, причем их можно использовать в тандеме с традиционными лабораторными методами ГЧАП.*

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Международным эпизоотическим бюро (МЭБ), продовольственно-сельскохозяйственной организацией ООН (ФАО) и всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) было признано, что распространение патогенных бактерий, обладающих резистентностью ко

многим антимикробным препаратам, представляет серьезную глобальную проблему для здоровья человека и животных. Развитие резистентности бактерий к антимикробным препаратам не является ни неожиданным, ни новым феноменом. Однако эта ситуация становится все более и более неприятной из-за высокой частоты появления новых резистентных фенотипов среди многих патогенных бактерий и даже условно-патогенных микроорганизмов.

Исторически, многие инфекции можно было успешно лечить, исходя из прошлого клинического опыта врачей и ветеринаров (эмпирическая терапия), однако сейчас такой подход становится скорее исключением, чем правилом (Walker, 2007). Резистентность наблюдалась, по существу, ко всем антимикробным средствам, которые в настоящее время официально разрешены для применения в клинической и ветеринарной медицине. Учитывая большое разнообразие современных антимикробных средств, выбор подходящего препарата в каждом конкретном случае становится все более сложной задачей. Эта ситуация привела к растущей зависимости клиницистов от результатов тестирования патогенных возбудителей инфекций *in vitro* на чувствительность к антимикробным препаратам, что лишней раз подчеркивает важность диагностических лабораторий в клинической практике.

В настоящее время доступны многие методы тестирования на чувствительность к антимикробным препаратам (ТЧАП), позволяющие определить, насколько бактерии восприимчивы или, наоборот, резистентны к лечению антимикробными препаратами. Выбор метода основан на оценке многих факторов, таких как его практичность, гибкость, автоматизация, стоимость, воспроизводимость, точность и индивидуальные предпочтения пользователя. Поскольку необходимо проводить сравнение данных, полученных в национальных или международных программах наблюдения/мониторинга членов МЭБ, стандартизация и гармонизация методологий ТЧАП, используемых в эпидемиологическом мониторинге резистентности к антимикробным препаратам представляются очень важной задачей. Очень важно, чтобы методы ТЧАП при повседневном использовании в лабораториях обеспечивали воспроизводимые результаты, а полученные данные были сопоставимы с результатами эталонных методов «золотого стандарта». При отсутствии стандартизированных методов или эталонных процедур результаты тестирования на чувствительность, полученные в разных лабораториях, невозможно сравнивать с достаточной степенью уверенности. Способ выбора образцов для включения в программы мониторинга резистентности к антимикробным препаратам, а также методы первичного выделения бактериальных культур являются важными факторами, подлежащими стандартизации и/или согласованию в целях прямого сравнения данных, полученных в разных регионах. Рассмотрение этих проблем описано в специальном документе МЭБ (Dehaumont, 2004).

По мере развития научной основы ТЧАП стала более ясной необходимость лучшего понимания сложного комплекса факторов, способных повлиять на общие результаты такого тестирования. В данном документе представлены руководящие принципы и стандартизация методологий ТЧАП, а также интерпретация результатов такого тестирования.

## **1. Требования к тестам**

Для стандартизации методов и получения сопоставимых результатов ТЧАП применимы следующие требования:

- i) использование стандартизированных методов ТЧАП и гармонизация параметров ТЧАП (включая выбор антимикробных средств и последующих критериев интерпретации),

- ii) стандартизированные методы ТЧАП, включая все критические спецификации и критерии интерпретации, должны быть четко определены, подробно документированы и обязательны для всех участвующих лабораторий,
- iii) все методы ТЧАП должны давать точные и воспроизводимые результаты,
- iv) все данные должны быть представлены в количественном измерении,
- v) для координации методологий ТЧАП, интерпретации данных и адекватных приемов, используемых для обеспечения точности и воспроизводимости (например, в контроле качества), важно создание национальных или региональных лабораторий,
- vi) микробиологические лаборатории должны внедрять и поддерживать формальную программу управления качеством (см. главу 1.1.5 *Управление качеством в лабораториях ветеринарного тестирования*),
- vii) лаборатории должны получить стороннюю аккредитацию, включая методологии ТЧАП, используемые в рамках этой аккредитации. Сертификационная организация должна соответствовать принятым стандартам международной ассоциации по аккредитации лабораторий [ILAC]), и соблюдать требования в отношении стандартов, используемых в процессе аккредитации. Используемые стандарты аккредитации должны включать требование по участию лаборатории в программах проверки квалификации,
- viii) для внутри- и межлабораторного контроля качества, получения гарантий качества и проверки квалификации важны специфичные стандартные/контрольные штаммы бактерий.

## **2. Выбор антимикробных средств для исследования и отчетности**

Выбор подходящих антимикробных препаратов для тестирования на чувствительность может быть трудным, учитывая великое множество доступных средств. Необходимо отметить следующие руководящие принципы:

- i) семинар экспертов ФАО/МЭБ/ВОЗ по использованию антимикробных средств для других биологических видов (кроме человека) и резистентности к антимикробным препаратам рекомендует создать список критически важных антимикробных средств для клинической и ветеринарной практики в целях тестирования на чувствительность и отчетности,
- ii) выбор наиболее подходящих антимикробных препаратов представляет собой решение каждого члена МЭБ, которое лучше всего принимать после консультаций с соответствующими структурами и организациями,
- iii) антимикробные препараты в пределах одного класса могут проявлять сходную активность *in vitro* против избранных патогенных бактерий. В таких случаях необходимо подобрать репрезентативный антимикробный препарат, по которому можно предсказать чувствительность к другим членам того же класса,
- iv) некоторые микроорганизмы могут иметь природную резистентность к определенным классам антимикробных средств, поэтому было бы ошибочно и неразумно проверять такие средства на активность *in vitro*. Тип природной резистентности этих микроорганизмов надо определять либо через научную литературу, либо посредством тестирования,
- v) Для того, чтобы проведение ТЧАП было обоснованным и практичным, число проверяемых антимикробных препаратов необходимо ограничивать.

Для того, чтобы своевременно выявлять неожиданное возникновение резистентности, рекомендуется периодически проводить обзорный анализ микроорганизмов, которые в настоящее время считаются заведомо чувствительными к определенным антимикробным средствам. Вновь возникшую резистентность также можно заподозрить после плохой реакции больного на стандартный режим антимикробного лечения.

### **3. Методологии исследования на чувствительность к антимикробным средствам**

Необходимо соблюдать следующие требования:

- i) бактерии, проходящие ТЧАП, должны быть выделены из представленного образца в чистой культуре,
- ii) для идентификации необходимо использовать стандартные эталонные методы, чтобы подлежащие анализу бактерии были последовательно и правильно идентифицированы на уровне рода и/или вида,
- iii) бактериальные культуры, которые рассматриваются как наиболее важные, а также образцы других культур надо сохранять для последующего анализа (лиофилизация или криогенное хранение при температуре от  $-70^{\circ}\text{C}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

В подробном описании стандартной рабочей процедуры должны быть определены, оптимизированы и документированы следующие факторы, влияющие на методы ТЧАП:

- i) после выделения бактерии в чистой культуре необходимо определить оптимальную концентрацию посевного материала для получения точных результатов анализа на чувствительность. Бактерии или другие микроорганизмы, используемые для ТЧАП, должны быть взяты из свежей культуры,
- ii) состав и приготовление используемых агаровых и бульонных сред (например, pH, катионы, тимидин или тимин, использование сред с добавками). В дополнение к используемым процедурам должны быть определены и документированы параметры тестирования партий сред на эксплуатационные качества и стерильность,
- iii) содержание антимикробного препарата в носителе (антибиотики, используемые в микротитрационных планшетах, дисках, полосках, таблетках),
- iv) состав растворителей и разбавителей для приготовления исходных растворов антимикробных средств,
- v) условия роста и инкубации (время, температура, атмосфера, например, содержание  $\text{CO}_2$ ),
- vi) глубина агара,
- vii) число концентраций, проверенных в разведениях бульона и агара,
- viii) используемые в тесте средства контроля, включая эталонные микроорганизмы,
- ix) критерии последующей интерпретации (границы резистентности микроорганизмов, эпидемиологические пороговые значения).

По этим соображениям необходимо уделить особое внимание использованию документированных процедур и аттестованных, хорошо документированных методов, ибо только с помощью такой методологии может быть достигнута достаточная воспроизводимость.

### **4. Выбор методологии исследования на чувствительность к антимикробным средствам**

Выбор методологии ТЧАП может быть основан на следующих факторах:

- i) простота выполнения,
- ii) гибкость,
- iii) возможность адаптации к автоматическим или полуавтоматическим системам,
- iv) стоимость,
- v) воспроизводимость,
- vi) надежность,
- vii) точность,
- viii) микроорганизмы и антимикробные средства, представляющие интерес для конкретного члена МЭБ,
- ix) доступность подходящих контрольных данных о ряде микроорганизмов, подлежащих тестированию на чувствительность.

## **5. Методы исследования на чувствительность к антимикробным средствам**

Было показано, что три следующих метода постоянно обеспечивают воспроизводимые результаты с высокой точностью повторения при их правильном выполнении (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2008; Walker, 2007):

- i) дисковая диффузия,
- ii) разведение бульона,
- iii) разведение агара.

### **5.1. Дискодиффузионный метод**

Понятие дисковая диффузия означает распространение антимикробного средства определенной концентрации с дисков, таблеток или полосок, в твердую культуральную среду, которая была засеяна отобраным прививочным материалом, выделенным в чистой культуре (см. раздел 3). Дисковая диффузия основана на определении зоны подавления роста бактерий, которая пропорциональна их чувствительности к антимикробному препарату, представленному в диске.

Диффузия антимикробного средства в засеянную культуральную среду создает градиент концентрации антимикробного препарата. Когда концентрация антимикробного препарата снизится до такой степени разбавления, что рост тестируемой культуры бактерий уже не будет подавлен, появится видимая граница зоны ингибирования. Диаметр этой зоны ингибирования вокруг антимикробного диска соответствует минимальной ингибиторной концентрации (МИК) для данной конкретной комбинации бактерий и антимикробного препарата (зона ингибирования проявляет обратную корреляцию с МИК для тестируемой бактериальной культуры). В целом, чем больше зона ингибирования, тем ниже концентрация антимикробного препарата, достаточная для подавления роста микроорганизмов. Однако это также зависит от концентрации антибиотика в диске и его диффузионной способности.

Примечание: Тесты с дисковой диффузией основаны только на присутствии или отсутствии зоны ингибирования безотносительно к размеру этой зоны, оценка которого не считается приемлемой методологией ТЧАП.

#### **5.1.1. Соображения по поводу использования методологии дисковой диффузии**

Методика дисковой диффузии проста в применении, воспроизводима и не требует дорогостоящего оборудования. Ее главные преимущества таковы:

- i) небольшая стоимость,

- ii) простота модификации дисков с испытуемым антимикробным препаратом (при необходимости),
- iii) возможность использования для скрининга множества бактериальных культур,
- iv) возможность идентификации подмножества культур для дальнейшего анализа с применением других методов, таких как определение МИК.

Измерение зон ингибирования вручную может занять много времени. Доступны автоматические устройства для считывания таких зон, которые могут быть включены в лабораторные системы обработки данных и отчетности. Антимикробные диски надо распределять равномерно, чтобы зоны ингибирования вокруг них в тесте дисковой диффузии не перекрывали друг друга, делая невозможным точное распознавание. Обычно это достигается при расстоянии между центрами дисков не менее 24 мм, хотя также зависит от концентрации антимикробного препарата в диске и его способности диффундировать в агаре.

## **5.2. Методы разведения бульона и агара**

Целевое назначение методов разведения бульона и агара состоит в том, чтобы определить минимальную концентрацию данного антимикробного препарата, угнетающую видимый рост анализируемой бактериальной культуры (МИК), которая обычно выражается в мкг/мл или мг/литр. Однако показатель МИК не всегда представлен абсолютной величиной. «Истинная» МИК – это точка между минимальной концентрацией антимикробного вещества, которая подавляет рост бактерий, и следующей за ней низкой концентрацией. Таким образом, определение МИК с использованием серии разведений можно рассматривать как изначальную вариацию одного разведения.

Диапазон оценки антимикробного эффекта должен охватывать как критерии интерпретации для определенной комбинации бактерии и антибиотика (чувствительность, промежуточная реакция и резистентность), так и соответствующие эталонные микроорганизмы для контроля качества.

Методы разведения для оценки чувствительности к антимикробным препаратам, по-видимому, более воспроизводимы и в большей степени позволяют получить количественную оценку, чем дисковая диффузия на агаре. Однако антибиотики обычно анализируют в дублированных разведениях, что может привести к неточной оценке показателей МИК.

Любая лаборатория, намеревающаяся использовать метод разведения, а также подобрать для этого собственные реактивы и разведения антибиотиков, должна получать, готовить и поддерживать соответствующие маточные растворы антимикробных препаратов по классу реактивов и создавать их рабочие разведения на регулярной основе. Кроме того, важно, чтобы такие лаборатории использовали микроорганизмы для контроля качества (см. ниже) для обеспечения точности и стандартизации своих процедур.

### **5.2.1. Разведение бульона**

Разведение бульона представляет собой методику, в которой бактериальная суспензия в предварительно определенной оптимальной или адекватной концентрации тестируется на панели изменяющихся концентраций антимикробного средства (обычно серийные разведения в два раза) в жидкой питательной среде с предварительно определенным и документированным составом. Процедуры по методу разведения бульона можно выполнять или в пробирках, содержащих минимальный объем 2 мл (макроразведение) или в меньших объемах с применением микротитрационных планшетов (микроразведение). Процедуры по

методу разведения бульона можно выполнять или в пробирках, содержащих минимальный объем 2 мл (макроразведение) или в меньших объемах с применением микротитрационных планшетов (микроразведение). В продаже имеются многочисленные микротитрационные планшеты, в лунках которых содержатся лиофилизаты предварительно разбавленных антибиотиков. Использование идентичных производственных партий лекарств в микротитрационных планшетах помогает свести к минимуму вариабельность, которая может возникать при подготовке и разведении антимикробных препаратов из разных лабораторий. Применение этих планшетов в документированном протоколе тестирования, включая спецификацию соответствующих эталонных микроорганизмов, облегчает сравнение результатов, полученных в разных лабораториях.

Вследствие того, что большинство панелей с микроразведениями бульона для тестирования на чувствительность к антимикробным препаратам являются рыночными продуктами, этот метод, менее гибок по сравнению с разведением агара или дисковой диффузией в аспекте приспособления к изменяющимся потребностям программ наблюдения/мониторинга.

Поскольку закупка антимикробных планшетов и вспомогательного оборудования может быть весьма дорогостоящей, эта методология может оказаться недоступной для некоторых лабораторий.

### **5.2.2. Разведение агара**

Метод разведения агара подразумевает включение в агаровую среду различных концентраций антимикробного средства, обычно с использованием серии двукратных разведений и последующим внесением определенной бактериальной прививки на поверхность агара в чашке Петри или планшете. Эти результаты часто считают самыми надежными для определения МИК применительно к анализируемой комбинации бактерии и антимикробного препарата.

Преимущества методов разведения агара включают:

- i) возможность анализировать множество других бактерий кроме тех, которые скапливаются на одном наборе чашек с агаром в то же самое время,
- ii) потенциал для улучшения идентификации конечных точек МИК и расширения диапазона концентраций антибиотиков,
- iii) возможность сделать метод полуавтоматическим при помощи устройства, впечатывающего прививочный материал. На коммерческой основе доступны репликаторы для тиражирования прививочного материала, при помощи которых можно переносить в каждую чашку/планшет с агаром от 32 до 60 различных бактериальных прививок.

Для методов разведения агара также характерны некоторые недостатки, например:

- i) при отсутствии автоматизации они очень трудоемки и требовательны к экономическим и техническим ресурсам,
- ii) обычно после подготовки чашек/планшетов их необходимо использовать в течение недели или менее (в зависимости от испытуемых антимикробных препаратов),
- iii) конечные точки анализа не всегда легко считывать, а чистоту посевного материала не всегда легко проверять.



Метод разведения агара часто рекомендуется как стандартизированный метод ТЧАП для прихотливых микроорганизмов (CLSI, 2006c), таких как анаэробы и виды *Helicobacter*.

### **5.3. Другие методы ТЧАП для бактерий и тесты на специфическую антимикробную резистентность**

Показатели МИК антимикробных препаратов для бактерий также можно получить, используя поступающие в продажу градиентные полоски, которые создают постепенное уменьшение предварительно определенной концентрации антибиотиков. Однако использование градиентных полосок может быть очень дорогостоящим, кроме того возможны расхождения оценок МИК для некоторых комбинаций бактерий и антимикробных препаратов, полученных таким способом, по сравнению с методом разведения агара (Ge *et al.*, 2002; Rathe *et al.*, 2009).

Независимо от используемого метода ТЧАП для обеспечения точных и воспроизводимых результатов все процедуры должны быть подробно документированы, а для получения точных и достоверных данных в анализе каждый раз должны быть использованы подходящие эталонные микроорганизмы.

В конечном итоге, выбор подходящего метода ТЧАП будет зависеть от ростовых характеристик анализируемой бактерии. В особых ситуациях для выявления редких резистентных фенотипов более адекватными могут оказаться новые методы тестирования и аналитические методики. Например, более надежные и быстрые результаты по определению бета-лактамазы у некоторых бактерий могут обеспечить хромогенные тесты на основе цефалоспоринов, например, нитроцефина (CLSI, 2008), тогда как индуцируемую резистентность к клиндамицину у видов *Staphylococcus* можно обнаружить дискодиффузионным методом, используя стандартные диски с эритромицином и клиндамицином в смежных положениях и измеряя появляющиеся в результате зоны ингибирования (например, D-зона или D-тест) (Zelazny *et al.*, 2005).

Точно так же, активность бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) (CLSI, 2008) у некоторых бактерий можно обнаружить, используя стандартные методы ТЧАП с дисковой диффузией, включающие специфические цефалоспорины (цефотаксин и цефтазидим) в комбинации с ингибитором бета-лактамазы (клавулановая кислота) и последующим измерением полученных в результате зон ингибирования. Кроме того, пенициллинсвязывающий белок 2a (ПСБ 2a) можно обнаруживать в резистентных к метициллину стафилококках при помощи реакции латекс-агглютинации (Stepanovic *et al.*, 2006). Важно, чтобы для обеспечения точных результатов параллельно с выделенными клиническими культурами в анализ были включены заведомо положительные и отрицательные контрольные штаммы.

### **5.4. Будущие направления развития методов выявления чувствительности/резистентности к антимикробным препаратам**

Новым и перспективным направлением исследований по увеличению скорости и точности тестирования на чувствительность стало развитие генотипических подходов к выявлению генов резистентности к противомикробным препаратам (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Для выявления резистентности бактерий к антибиотикам на генетическом уровне разработаны и продолжают появляться многочисленные анализы на основе ДНК. Новейшая и возможно бóльшая часть современного подхода заключается в предсказании фенотипов резистентности к антимикробным препаратам через идентификацию и характеризацию известных генов, кодирующих специфические механизмы резистентности.

Методы, основанные на использовании сравнительной геномики, генетических зондов, микроматриц, амплификации нуклеиновых кислот (например, полимеразная

цепная реакция [ПЦР]), и секвенировании ДНК, в перспективе сулят повысить чувствительность, специфичность и скорость выявления специфических генов природной резистентности (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Perreten *et al.*, 2005). Генотипические методы были успешно применены для подкрепления традиционных фенотипических методов ТЧАП применительно к ряду микроорганизмов, включая метицилин-резистентные стафилококки, ванкомицин-резистентные энтерококки, а также для выявления мутаций резистентности к фторхинолонам (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Perreten *et al.*, 2005). Методы ПЦР также описаны для бета-лактамаз, ферментов инактивации аминогликозидов и генов эффлюкса тетрациклинов (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Frye *et al.*, 2010; Perreten *et al.*, 2005).

Технологические инновации в ДНК-диагностике направлены на выявление генов и/или вариантов мультирезистентности в одном анализе. Разработка быстрых методов диагностической идентификации и генотипической резистентности должна ограничить роль новых мутаций в бактериальной резистентности к антимикробным препаратам, а также помочь в выборе наиболее эффективного антимикробного препарата на начальном этапе терапии. Однако, методики анализа ДНК должны демонстрировать комплементарность с методами и результатами традиционных методов ТЧАП.

Кроме того, новые технологические достижения направлены на быстрый и недорогой зондирующий скрининг биологических видов бактерий на большое количество генов резистентности к антимикробным препаратам, то есть, на обеспечение программ наблюдения и мониторинга важными дополнительными данными (Frye *et al.*, 2010). Однако, несмотря на появление новых генотипических тестов, в ближайшем будущем по-прежнему сохранится потребность в документированных и согласованных фенотипических методах ТЧАП для выявления возникающих механизмов резистентности у патогенных бактерий.

## **6. Контрольные точки чувствительности к антимикробным препаратам и критерии зоны ингибирования**

Цель ТЧАП *in vitro* состоит в том, чтобы предсказать реакцию патогенных бактерий на антимикробное средство *in vivo*. Результаты ТЧАП *in vitro*, независимо от метода (дискосвая диффузия или разведение питательной среды), обычно интерпретируют по следующим категориям: резистентность, чувствительность или промежуточная реакция микроорганизма на определенный антимикробный препарат. До сих пор нет единой общепринятой формулировки для выбора оптимальных контрольных точек. Этот сложный процесс, включающий обзорный анализ существующих данных, в значительной степени зависит от субъективной оценки лиц, которым предстоит выбрать соответствующие контрольные точки.

Обычно контрольные точки для оценки чувствительности к антимикробным препаратам устанавливают национальные организации по стандартам, профессиональные общества или органы государственного регулирования. При этом необходимо консультироваться с соответствующими документами. Однако могут наблюдаться заметные различия в контрольных точках для одного и того же антимикробного средства между разными странами и даже в пределах одной страны из-за различий между организациями, устанавливающими стандарты, и распорядительными органами, а также из-за разных региональных или национальных предпочтений в отношении режимов антибиотикотерапии (Brown & MacGowan, 2010; de Jong *et al.*, 2009; Kahlmeter *et al.*, 2006).

Как было упомянуто ранее, результаты ТЧАП должны быть выражены в количественном измерении:

- i) как распределение МИК в миллиграммах на литр или мкг/мл,
- ii) или как диаметр зоны ингибирования в миллиметрах.

Интерпретировать реакцию бактерий на воздействие антимикробного препарата (чувствительность или резистентность) позволяют два главных фактора:

- i) Разработка и установление диапазонов контроля качества (CLSI, 2006с) с использованием метода диффузии (по возможности) и методов разведения для эталонных микроорганизмов, выбранных для контроля качества.

Установление диапазонов контроля качества является важным моментом для подтверждения правильности результатов, полученных на основе применения конкретного метода ТЧАП. Перед определением контрольных точек чувствительности или резистентности необходимо установить допустимые диапазоны для категорий интерпретации в отношении эталонных микроорганизмов. Использование эталонных микроорганизмов означает контроль качества и активные действия по обеспечению гарантий качества. Однако для этого необходимо только потребовать использования эталонных микроорганизмов.

- ii) Определение адекватных критериев интерпретации в отношении установления контрольных точек (CLSI, 2006с).

Это подразумевает создание трех различных типов данных:

- a) распределение МИК в популяции соответствующих микроорганизмов,
- b) фармакокинетические параметры и фармакодинамические показатели антимикробного средства,
- c) результаты клинических испытаний и существующий опыт.

Интерпретация данных подразумевает создание диаграммы рассеяния по данным распределения в популяциях бактерий (репрезентативные виды бактерий) посредством построения графика зон ингибирования с двоичным логарифмом для МИК в отношении каждого бактериального патогена. В таком случае выбор контрольных точек основан на множестве факторов, включая линейный регрессионный анализ, который позволяет оценить корреляцию между МИК и диаметрами зон ингибирования, распределение в бактериальных популяциях, ограничение коэффициента ошибок, фармакокинетику, и в конечном итоге, клиническую верификацию.

Развитие концепции, известной под названием «микробиологические контрольные точки», или «эпидемиологические граничные значения», которая основана на популяционных распределениях в проанализированной группе специфических видов бактерий, может создать более адекватный подход для некоторых программ мониторинга антимикробного эффекта лекарств. В таком случае, выделенные бактериальные культуры, реакция которых отличается от нормальной чувствительной популяции дикого типа, можно определить как резистентные, и продолжать мониторинг сдвига чувствительности, отслеживая специфические комбинации бактерий и антимикробных препаратов (Kahlmeter *et al.*, 2006; Turnidge *et al.*, 2006). Документирование количественных данных о чувствительности является большим преимуществом в том отношении, что такие данные можно анализировать в соответствии с клиническими контрольными точками, а также используя эпидемиологические граничные значения.

## **7. Руководящие принципы тестирования на чувствительность к антимикробным средствам**

В настоящее время во всем мире существует множество доступных стандартов и руководящих указаний по тестированию на чувствительность к антимикробным

средствам, а также по критериям последующей интерпретации результатов (CLSI, 2008; Kahlmeter *et al.*, 2006). Среди всего прочего следует упомянуть стандарты и руководства, опубликованные следующими организациями и учреждениями:

Британское общество антимикробной химиотерапии (BSAC, Великобритания),  
Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI, США),  
Комитет по антибиограммам французского общества по микробиологии (CASFM, Франция),  
Нормативная комиссия по определению чувствительности (CRG, Нидерланды),  
Немецкий институт стандартизации (DIN, Германия),  
Европейская комиссия по тестированию на чувствительность к антимикробным препаратам (EUCAST),  
Японское общество химиотерапии (JSC, Япония),  
Шведская референтная группа по антибиотикам (SRGA, Швеция).

В настоящее время только CLSI (ранее NCCLS) разработал протоколы для тестирования чувствительности бактерий животного происхождения и определения критериев интерпретации (CLSI, 2008). Однако доступны протоколы и руководящие указания по тестированию на чувствительность для многих сходных видов бактерий, способных вызывать инфекции у человека, разработанные целым рядом организаций по стандартам и профессиональных обществ, включая вышеупомянутые. Вполне возможно, что такие руководящие указания можно принять для тестирования на чувствительность бактерий животного происхождения, однако каждая страна должна оценить свои собственные стандарты и руководящие принципы ТЧАП. В дополнение к этому можно отметить прогресс усилий, направленных на стандартизацию и гармонизацию контрольных точек чувствительности/резистентности, в международном масштабе. Эти усилия прежде всего направлены на принятие стандартов и руководящих указаний, разработанных CLSI и EUCAST, которые дают в распоряжение лабораторий методы и параметры контроля качества, позволяющие проводить сравнение методов ТЧАП и полученных данных (CLSI, 2008; Kahlmeter *et al.*, 2006). Для тех членов МЭБ, которые не располагают на своих местах стандартизированными методами ТЧАП, адекватным начальным шагом к введению приемлемых методов и гармонизации было бы принятие любого набора стандартов.

Многие бактерии, способные вызывать болезни у водных животных, требуют особых условий роста (например, более низких температур, полутвердых сред или сред с добавками), а также подвержены значительно большей вариабельности по сравнению с бактериальными патогенами наземных животных и человека. Это обуславливает потребность в разработке методов тестирования на антимикробную чувствительность бактерий, выделенных из водных видов. Дополнительную информацию о методах дисковой диффузии или разведения бульона для ТЧАП бактерий, выделенных из водных животных, можно найти в двух документах CLSI (CLSI, 2006a; 2006b). Дополнительную информацию о методах дисковой диффузии или разведения бульона для ТЧАП редко выделяемых или прихотливых бактерий (например, *Campylobacter*, *Pasteurella*) также можно найти в документе CLSI M45-A (CLSI, 2006c).

В качестве первого шага на пути к сравнимости данных мониторинга и наблюдения, членов МЭБ надо стимулировать к разработке согласованных и стандартизированных программ (Brown & MacGowan, 2010; Kahlmeter *et al.*, 2006; White *et al.*, 2001). В противном случае данные из стран, использующих разные методы и программы, будет невозможно сопоставлять прямым образом (Brown & MacGowan, 2010). Несмотря на это, на основании данных, собранных в течение длительного промежутка времени в какой-либо стране, можно, по меньшей мере, выявить появление резистентности к антибиотикам или тенденцию к изменению соотношения между чувствительностью и резистентностью в пределах этой страны (Petersen *et al.*, 2003). Однако, если результаты,

полученные разными методами ТЧАП, будут представлены совместно, то необходимо продемонстрировать их сравнимость и согласованную интерпретацию. Это лучше всего выполнимо при помощи точных и надежно документированных методов ТЧАП, используемых при условии мониторинга рабочих характеристик ТЧАП, а также при введении в анализ хорошо охарактеризованных эталонных микроорганизмов во всех участвующих лабораториях.

## **8. Сопоставимость результатов**

Для того чтобы можно было оценить сопоставимость результатов, полученных из разных систем мониторинга, необходимо представлять эти результаты в количественном измерении, включая информацию о рабочих характеристиках методов, эталонных микроорганизмах и антимикробных препаратах.

Необходимо создавать, документировать и периодически анализировать с регулярными интервалами данные ТЧАП, состоящие из накопленных и текущих сводок паттернов чувствительности (антибиограмм) в группе клинически важных и наблюдаемых микроорганизмов (CLSI, 2009). Для того чтобы можно было идентифицировать новые паттерны резистентности, а также подтверждать или опровергать атипичные находки, данные необходимо представлять четко и единообразно. Эти данные должны быть доступными в центральном банке данных и ежегодно опубликованы.

Накопленные данные ТЧАП будут полезны для мониторинга тенденций чувствительности/резистентности в конкретном регионе в течение длительного времени, а также для оценки эффектов тех вмешательств, которые предпринимаются с целью ограничения резистентности к антимикробным препаратам.

## **9. Контроль качества (КК) и гарантии качества (ГК)**

В лабораториях, проводящих анализы в рамках ТЧАП, должны быть установлены системы контроля качества/гарантий качества в соответствии с главой 1.1.5:

- i) контроль качества относится к рабочим методикам, применяемым для того, чтобы обеспечить точность и воспроизводимость ТЧАП,
- ii) гарантии качества включают, но, не ограничиваясь ими, мониторинг, хранение записей, оценку, введение возможных мер по устранению выявленных недостатков (при необходимости), калибровку и техобслуживание оборудования, проверку квалификации и обучение персонала, КК. Программа ГК дает уверенность в том, что анализируемые материалы и процессы обеспечивают стабильное качество результатов.

Необходимо определить и постоянно контролировать следующие компоненты:

- i) воспроизводимость процедуры ТЧАП,
- ii) точность процедуры ТЧАП,
- iii) квалификацию, компетентность, и специальную подготовку лабораторного персонала, а также персонала, который интерпретирует результаты или вовлечен в мониторинг резистентности к антимикробным препаратам,
- iv) Рабочие характеристики соответствующих реактивов.

Необходимо соблюдать следующие требования:

- i) Строгая приверженность к соблюдению заданных и документированных методик при обязательном контроле качества питательных сред и реактивов (то есть, надежное обеспечение их эксплуатационных характеристик и других критически важных критериев).

- ii) Хранение записей по:
  - a) номерам партий всех используемых материалов и реактивов,
  - b) срокам годности всех используемых материалов и реактивов,
  - c) калибровке и мониторингу оборудования,
  - d) критически важным спецификациям рабочих характеристик ТЧАП (базисные результаты, время, температура и т.д.).
- iii) Независимо от используемого метода ТЧАП всегда должны быть использованы подходящие эталонные микроорганизмы.
- iv) Эталонные микроорганизмы должны быть получены из надежного источника, например, из американской коллекции типовых культур (ATCC®), надежных коммерческих источников или из учреждений с надежной репутацией по хранению и правильному использованию микроорганизмов.
- v) Эталонные микроорганизмы должны быть каталогизированы и хорошо охарактеризованы, включая строго определенные фенотипы чувствительности к антимикробным препаратам. Записи в отношении этих эталонных микроорганизмов должны включать установленные диапазоны их резистентности и чувствительности к антибактериальным препаратам, подлежащим проверке, а также ссылку на метод(ы), посредством которых они были определены.
- vi) Лаборатории, участвующие в ТЧАП, всегда должны использовать соответствующие эталонные микроорганизмы.
- vii) Эталонные штаммы необходимо сохранять в маточных культурах, из которых получают рабочие культуры, кроме того, все эталонные штаммы должны быть получены из национальных или международных коллекций культур. Эталонные бактериальные штаммы необходимо сохранять в назначенных централизованных или региональных лабораториях. Рабочие культуры нельзя ежедневно субкультивировать, поскольку это связано с риском контаминации, а метод создания рабочих культур должен обеспечить редкое обращение к маточным культурам. Это достигается за счет производства промежуточного запаса культур, полученных из исходных культур, который используется, для повседневного создания рабочих культур.
- viii) Предпочтительный метод анализа общих рабочих характеристик каждой лаборатории должен включать проверку рабочего запаса необходимых эталонных микроорганизмов в любой день, когда проводятся анализы ТЧАП.

Поскольку это не всегда практично или экономично, частота таких проверок может быть ограничена, если лаборатория способна продемонстрировать воспроизводимость результатов тестирования эталонных микроорганизмов при использовании выбранного метода. Если лаборатория может документировать воспроизводимость используемых методов ТЧАП, то такие проверки можно проводить на еженедельной основе. Если возникают сомнения по поводу точности, воспроизводимости, или надежности метода, то лаборатория обязана выяснить их причины и провести повторное тестирование с использованием эталонных материалов. В зависимости от выявленных причин можно повторно инициировать ежедневное использование эталонных материалов и любые другие корректирующие действия.

- ix) Эталонные микроорганизмы необходимо анализировать каждый раз, когда приходится использовать новую партию питательной среды или чашек/планшетов, а также на регулярной основе параллельно с испытываемыми микроорганизмами.

- х) При получении и распределении микроорганизмов в рабочие лаборатории надо рассматривать и решать соответствующие проблемы биобезопасности.

## 10. Внешние проверки квалификации

Лаборатории должны участвовать в программах внешних гарантий качества и/или проверки квалификации в соответствии с главой 1.1.5. Лаборатории также надо стимулировать к участию в международных межлабораторных сравнениях (например, в системе внешних гарантий качества ВОЗ) (Hendriksen *et al.*, 2009). Сюда необходимо включить все виды бактерий, задействованные в программе ТЧАП.

Национальные референтные лаборатории ответственны за:

- i) постоянный контроль программ гарантий качества в лабораториях, задействованных в наблюдении и мониторинге резистентности к антимикробным препаратам,
- ii) характеризацию и рассылку в эти лаборатории набора эталонных микроорганизмов,
- iii) создание, диспетчеризацию и распределение образцов, предназначенных для использования во внешних проверках квалификации,
- iv) создание центральной базы данных, доступной через Интернет (например, Европейская система контроля над резистентностью к антимикробным препаратам [EARSS]), которая содержит различные профили чувствительности/резистентных для каждого вида бактерий, включенного в систему наблюдения.

## 11. Заключение

Хотя и существует множество методов, цель тестирования *in vitro* на чувствительность к антимикробным препаратам полностью соответствует им: предоставить надежный прогностический фактор для предсказания вероятной реакции микроорганизма на антимикробную терапию инфицированного хозяина. Информация этого типа помогает клиницисту в выборе подходящих антимикробных средств, обеспечивает данные для наблюдения, и помогает в разработке политики рационального использования антимикробных средств (Международное эпизоотическое бюро, 2010).

Тестирование на чувствительность к антимикробным препаратам *in vitro* можно проводить, используя множество форматов, самыми частыми из которых являются дисковая диффузия, разведение агара, макроразведение бульона, микроразведение бульона и тест с градиентом концентрации. Каждая из этих процедур требует использования специальных условий и методов тестирования, включая питательные среды, условия и время инкубации, а также идентификацию подходящих микроорганизмов для контроля качества, учитывая их специфические диапазоны КК. Очень важно, чтобы методы ТЧАП при повседневном использовании в лабораториях обеспечивали воспроизводимые результаты, а полученные данные были сопоставимы с результатами эталонных методов «золотого стандарта». При отсутствии стандартизированных методов или эталонных процедур результаты тестирования на чувствительность/резистентность к антимикробным препаратам, полученные в разных лабораториях, невозможно сравнивать с достаточной степенью уверенности.

Дополнительным способом для увеличения скорости и точности тестирования на чувствительность стало развитие генотипических подходов к выявлению генов резистентности к противомикробным препаратам. Кроме того, новые технологические достижения в молекулярных методиках (например, микроматричный анализ) могут облегчить, ускорить и удешевить зондирующий скрининг биологических видов бактерий на большое количество генов резистентности к антимикробным препаратам, то есть, обеспечить программы наблюдения и мониторинга важными дополнительными данными

(Ojha & Kostrzynska, 2008; Poxton, 2005). Однако, несмотря на появление новых генотипических тестов, в ближайшем будущем по-прежнему сохранится потребность в стандартизованных фенотипических методах ТЧАП для выявления возникающих механизмов резистентности у патогенных бактерий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

BROWN D. & MACGOWAN A. (2010). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing breakpoints in Europe: implications for reporting intermediate susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, **65**, 183–185.

CAI H.Y., ARCHAMBAULT M., GYLES C.L. & PRESCOTT J.F. (2003). Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. *Anim. Health Rev.*, **4**, 73–93.

CHEN S., ZHAO S., MCDERMOTT P.F., SCHROEDER C.M., WHITE D.G. & MENG J. (2005). A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Probes*, **19**, 195–201.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2008). Document M31-A3. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, Third Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2009). Document M39-A3. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline, Third Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2006a). Document M42-A, Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2006b). Document M49-A, Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2006c). Document M45-A. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

DEHAUMONT P. (2004). OIE International Standards on Antimicrobial Resistance. *J. Vet. Med.* [Series B], **51**, 411–414.

DE JONG A., BYWATER R., BUTTY P., DEROOVER E., GODINHO, K., KLEIN U., MARION H., SIMJEE, S., SMETS, K., THOMAS, V., VALLE, M., & WHEADON A. (2009). A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, **63**, 733–744.



FRYE J.G., LINDSEY R.L., RONDEAU G., PORWOLLIK S., LONG G., MCCLELLAND M., JACKSON C.R., ENGLER M.D., MEINERSMANN R.J., BERRANG M.E., DAVIS J.A., BARRETT J.B., TURPIN J.B., THITARAM S.N. & FEDORKA-CRAY P.J. (2010). Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information Database. *Microb. Drug Resist.*, **16**, 9–19.

GE B., BODEIS S., WALKER R.D., WHITE D.G., ZHAO S., MCDERMOTT P.F. & MENG J. (2002). Comparison of Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 487–494.

HENDRIKSEN R.S., SEYFARTH A.M., JENSEN A.B., WHICHARD J., KARLSMOSE S., JOYCE K., MIKOLEIT M., DELONG S.M., WEILL F.X., AIDARA-KANE A., LO FO WONG D.M., ANGULO F.J., WEGENER H.C., & AARESTRUP F.M. (2009). Results of use of WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 79–85.

KAHLMETER G., BROWN D.F., GOLDSTEIN F.W., MACGOWAN A.P., MOUTON J.W., ODENHOLT I., RODLOFF, A., SOUSSY C.J., STEINBAKK M., SORIANO F. & STETSIOUK. (2006). European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.*, **12**, 501–503.

OJHA S. & KOSTRZYNSKA M. (2008). Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. *Vet. Res.*, **39**, 4–26.

PERRETEEN V., VORLET-FAWER L., SLICKERS P., EHRLICH R., KUHNERT P. & FREY J. (2005). Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2291–2302.

PETERSEN A., AARESTRUP F.M., HOFSHAGEN M., SIPILA H., FRANKLIN A. & GUNNARSSON E. (2003). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing among veterinary diagnostic laboratories in five Nordic countries. *Microb. Drug Resist.*, **9**, 381–388.

POXTON I.R. (2005). Molecular techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: do they have a role in bacteriology? *Med. Princ. Pract.*, **14**, 20–26.

RATHE M., KRISTENSEN L., ELLERMANN-ERIKSEN S., THOMSEN M.K. & SCHUMACHER H. (2009). Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.: validation of susceptibility testing and in vitro activity of vancomycin, linezolid, tigecycline and daptomycin. *APMIS.*, **118**, 66–73.

STEPANOVIC S., HAUSCHILD T., DAKIC I., AL-DOORI Z., SVABIC-VLAHOVIC M., RANIN L. & MORRISON D. (2006). Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 934–937.

TURNIDGE J., KAHLMETER G., & KRONVALL G. (2006). Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:418-425.

WALKER R.D. (2007). Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. *In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Giguere S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. eds. Ames, IA, Blackwell Publishing.

WHITE D.G., ACAR J., ANTHONY F., FRANKLIN A., GUPTA R., NICHOLLS T., TAMURA Y., THOMPSON S., THRELFALL J.E., VOSE D., VAN VUUREN M., WEGENER H., & COSTARRICA L. (2001). Standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 849–858.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2010). Chapter 6.9. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *OIE Terrestrial Animal Health Code*, Volume 1. OIE, Paris, France.

ZELAZNY A.M., FERRARO M.J., GLENNEN A., HINDLER J.F., MANN L.M., MUNRO S., MURRAY P.R., RELLER L.B., TENOVER F.C. & JORGENSEN J.H. (2005). Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: a CLSI collaborative study. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2613–2615.

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по диагностике резистентности к антимикробным препаратам (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Для получения более подробной информации, касающейся резистентности к антимикробным препаратам, просим Вас обращаться в Референтную лабораторию МЭБ.