Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» МЗ РФ

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

АЛГОРИТМ УСКОРЕННОГО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМОГЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Информационное письмо

Санкт-Петербург

2015

ПРАВИТЕЛЬСТВО САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

Малая Садовая ул., 1, Санкт-Петербург, 191023
Тел. (812) 595-89-79, (812) 571-34-06
факс (812) 314-18-14
E-mail: kzdrav@gov.spb.ru
http://www.gov.spb.ru

ОКПО 00086970 ОКОГУ 97400 ОГРН 1037843003285
ИНН/КПП 7808043833/782501001

22 ЯНВ 2015 № 02/24-32/15-0 0

на № _____ от _____

Начальникам отделов
здравоохранения администраций
районов Санкт-Петербурга

Главному специалисту
Комитета по здравоохранению
по инфекционным заболеваниям
А.Г. Рахмановой

Комитет по здравоохранению направляет Вам для использования в работе «Алгоритм ускоренного бактериологического исследования с использованием хромогенных питательных сред».

Приложение: на 15 л.

Заместитель председателя
Комитета по здравоохранению Т.Н. Засухина

Аннотация

В настоящее время для выделения различных микроорганизмов разработаны питательные среды нового поколения – «хромогенные», которые позволяют в процессе культивирования проводить первичную идентификацию выросших бактерий (возбудителей ИСМП), а также выявлять штаммы, устойчивые к антибактериальным препаратам, тем самым сокращаются сроки проведения исследования на 24-48 и более часов.

В данном методическом документе представлена информация по оптимизации бактериологического исследования биоматериала для получения результата в более короткие сроки по сравнению с традиционным алгоритмом исследования.

Оптимальное использование таких сред при исследовании биоматериала уже через 18 ч позволяет выдать врачу-клиницисту предварительные рекомендации о возможности использования для терапии бета-лактамных препаратов (при лечении инфекций, вызванных *S.aureus, E.coli, K.pneumoniae, P.aeruginosa, A.baumanii*), гликопептидов (*Enterococcus* spp.) и др.

Главный бактериолог
Комитета по здравоохранению
Санкт-Петербурга,
д.м.н., профессор Л.А. Кафтырева

Авторы:

Полухина Ольга Васильевна – заведующая бактериологической лабораторией ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» МЗ РФ;

Суборова Татьяна Николаевна – д.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (военной хирургии) научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ;

Егорова Светлана Александровна – к.м.н., научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера;

Макарова Мария Александровна – к.м.н., научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера;

Кафтырева Лидия Алексеевна – д.м.н., главный внештатный специалист по бактериологии КЗ С-Пб, профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И.Мечникова, заведующая лабораторией кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Сокращения

АМП	антимикробные препараты
БЛРС	бета-лактамазы расширенного спектра
ВБИ	внутрибольничные инфекции
ГОНБ	грамотрицательные неферментирующие бактерии
ГСИ	гнойно-септические инфекции
ИМВП	инфекции мочевыводящих путей
ИСМП	инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
ЛПО	лечебно-профилактическая организация
ПСБ	пенициллин-связывающий белок
РНЦРХТ	Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
ЦРС	цефалоспорины расширенного спектра
MRSA	метициллин-резистентный *S.aureus*
VRE	ванкомицин-резистентные энтерококки

Термины

Хромогенные среды – питательные среды, содержащие хромогенный субстрат, который позволяет выявить высокоспецифичные ферменты микроорганизмов (β-глюкуронидаза и триптофаназа *E.coli,* фосфолипаза С *L.monocytogenes,* кислая фосфатаза *Cl.perfringens,* β-глюкозидаза *Enterococcus* spp. и др.). Под действием бактериального фермента хромогенный субстрат расщепляется, выделяя в среду хромофор, который окрашивает колонию микроорганизма в определенный цвет. Специфичность и интенсивность цветов, яркость колоний на хромогенных средах упрощают подсчет колоний различных микроорганизмов. Большинство хромогенных сред содержат селективные добавки, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры (азид натрия при выделении энтерококков; лаурилсульфат натрия и соли желчных кислот при выделении *E.coli*; дезоксихолат натрия при выделении сальмонелл).

Бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) – бактериальные ферменты, вырабатываемые в основном микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* , способные инактивировать β-лактамные антибиотики различных классов (пенициллины, цефалоспорины I-IV поколений), кроме цефамицинов (цефокситин, цефотетан) и карбапенемов.

Карбапенемазы – бактериальные ферменты, вырабатываемые микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* и ГОНБ, способные инактивировать практически все β-лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины I-IV поколений и карбапенемы).

Метициллинрезистентные *S.aureus* (MRSA) – штаммы *S.aureus*, резистентные к метициллину (оксациллину, цефокситину); содержат ген резистентности *mecA*, обуславливающий изменение ПСБ; нечувствительны ко всем β-лактамным антибиотикам (пенициллинам, цефалоспоринам I-IV поколений и карбапенемам).

Ванкомицинрезистентные энтерококки (VRE) – штаммы *Enterococcus* spp., имеющие значения МПК ванкомицина > 4 мг/л.

Введение

В настоящее время для бактериологических исследований разработан и представлен на рынке широкий спектр дифференциальных питательных сред нового поколения – хромогенных и флюорогенных, которые позволяют идентифицировать различные микроорганизмы непосредственно в процессе культивирования на питательных средах. Поскольку хромогенные и селективные субстраты входят в состав питательных сред, используемых для первичного посева, то выделение «чистой культуры» микроорганизма и его идентификация происходят одновременно и не требуют постановки дополнительных тестов, что значительно сокращает время и материальные затраты на исследование. Использование хромогенных (флюорогенных) сред при исследовании проб клинического материала на этапе первичного посева делает возможным получение ускоренного ответа (через 18-24 ч.).

Большой выбор представленных на рынке хромогенных сред различных производителей позволяет подобрать оптимальный набор для исследования в соответствии с задачами и возможностями лаборатории.

Основными возбудителями ВБИ в стационарах являются *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, ГОНБ (*P.aeruginosa, A.baumanii*), *Enterococcus* spp., грибы рода *Candida*, которые способны вызывать инфекции кровотока, мягких тканей, дыхательных и мочевыводящих путей, особенно у ослабленных и иммунокомпрометированных пациентов, а также пациентов, находящихся в ОРИТ. Эти микроорганизмы представляют угрозу для пациентов и медицинского персонала, поскольку способны длительно сохраняться в больничной среде, а также распространяться от пациента к пациенту при нарушении изоляционно-ограничительных мероприятий и требований к гигиене рук медицинских работников. Ранняя постановка этиологического диагноза позволяет своевременно назначить эмпирическую этиотропную терапию и провести мероприятия инфекционного контроля, направленные на предотвращение распространения микроорганизмов в стационаре.

В письме приведены результаты использования хромогенных питательных сред, зарегистрированных в РФ, для бактериологического исследования биоматериала от пациентов, госпитализированных в Санкт-Петербурге в ЛПО онкологического профиля.

Представленные в настоящем письме сведения могут быть использованы врачами-бактериологами для оптимизации лабораторного исследования биоматериала и получения ответа в более короткие сроки, по сравнению с традиционным алгоритмом исследования.

Алгоритм ускоренного бактериологического исследования с использованием хромогенных питательных сред был апробирован в лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера в 2013 г. при расследовании пищевой вспышки ОКИ, вызванной энтерогеморрагической *E.coli* O157.

Опыт использования хромогенных питательных сред в работе бактериологической лаборатории Российского научного центра радиологии и хирургических технологий МЗ РФ

В течение пяти лет в бактериологической лаборатории РНЦРХТ для первичного посева проб клинического материала, полученных от пациентов с ГСИ, используют хромогенный неселективный агар «UriSelect», который позволяет проводить одноэтапное выделение и идентификацию наиболее распространенных возбудителей ИМВП: *Staphylococcus* spp. (включая *S.aureus)*, энтеробактерии (*E.coli, K.pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. и др.), неферментирующие грамотрицательные бактерии (*P.aeruginosa*, *A.baumanii*), *Enterococcus* spp., *Candida* spp. и др.

Несмотря на то, что подобные среды разрабатывались, прежде всего, для исследования проб мочи, во многих лабораториях в настоящее время их все шире используют для посева другого клинического материала.

Хромогенный агар «UriSelect» позволяет через 18 часов инкубации выполнить предварительную (для некоторых видов окончательную) идентификацию, оценивая цвет выросших колоний, а также выявить ассоциацию микроорганизмов.

Анализ результатов посева более 3 тысяч проб клинического материала показал, что 71,0% проб содержал микроорганизмы в монокультуре, а 29,0% - в ассоциации. Монокультуры были выделены из 87,0% проб крови и смывов с фрагментов катетеров, 73,0 – 73,4% проб отделяемого нижних дыхательных путей и мочи, 61,0% проб раневого отделяемого.

Использование для первичного посева хромогенной среды позволило уже через 24 часа не только выделить чистую культуру возбудителей, но и определить видовой состав микробных ассоциаций. Микробные ассоциации состояли из 2-4 различных видов возбудителей, колонии которых четко дифференцировались на хромогенной среде. Чаще встречались пробы, содержащие два вида возбудителей (23,3% проб), в 4,0% проб ассоциации включали три вида, 1,8% проб – четыре вида (таблица 1).

Таблица 1

Результаты исследования клинического материала с использованием хромогенной среды «UriSelect»

Клинический материал	Пробы с наличием роста микроорганизмов											
	Монокультура		Ассоциации микроорганизмов								Всего	
			2 вида		3 вида		4 вида					
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Моча	1014	73,4	304	22,0	31	2,2	33	2,4	1382	100
Раневое отделяемое	605	61,1	293	29,6	74	7,5	19	1,9	991	100
Кровь	211	86,8	30	12,4	2	0,8	0,0	0,0	243	100
Отделяемое НДП	228	79,7	48	16,8	10	3,5	0,0	0,0	286	100
Фрагмент катетера	25	86,2	4	13,8	0,0	0,0	0,0	0,0	29	100
Другой материал	14	60,9	8	34,8	1	4,4	0,0	0,0	23	100
Итого	2097	71,0	687	23,3	118	4,0	52	1,8	2954	100

Важным этапом бактериологического исследования является определение чувствительности выделенных микроорганизмов к АМП. Подготовка культуры к исследованию и сама процедура тестирования одним из методов (диско-диффузионным, пограничных концентраций с использованием автоматических анализаторов или зарегистрированных коммерческих тест систем) занимают 18-48 часов, что задерживает назначении обоснованной этиотропной терапии.

В настоящее время частота выделения штаммов микроорганизмов, устойчивых к АМП, широко используемым для лечения инфекций, во многих странах достаточна велика. К наиболее «проблемным» с позиции резистентности в настоящее время относят метициллинрезистентные штаммы *S.aureus* (MRSA); штаммы Enterobacteriacae и ГОНБ, резистентные к ЦРС и карбапенемам; штаммы *Enterococcus* spp., устойчивые к ванкомицину. Быстрая детекция таких штаммов позволяет избежать назначения неадекватных АМП, а также предпринять меры инфекционного контроля, направленные на ограничение распространения резистентного штамма в стационаре.

При решении эпидемиологических задач по ограничению распространения устойчивых штаммов/генов резистентности в популяции возбудителя необходимо проведение тестов, подтверждающих отдельные (клинически значимые) механизмы резистентности, например, продукцию БЛРС, карбапенемаз у Enterobacteriacae и НГБ, наличие ПСБ2а у *S.aureus* и др. Постановка фенотипических подтверждающих тестов занимает дополнительные 18-24 часа.

Сократить время исследования помогают молекулярно-генетические методы с использованием коммерческих тест-систем, направленные на выявление клинически значимых микроорганизмов и генов, кодирующих механизмы резистентности. Такие тесты, особенно при постановке в режиме ПЦР в реальном времени, позволяют значительно сократить время

исследования. Однако не все лаборатории располагают необходимым оборудованием и квалифицированным персоналом.

Использование хромогенных сред с дополнительными селективными добавками (определенные пороговые концентрации АМП) позволяет решить большинство вышеперечисленных проблем. При посеве клинического материала одноэтапно проводится не только выделение и идентификация микроорганизма, но и (в зависимости от селективной добавки) обнаруживаются штаммы, устойчивые к бета-лактамам (MRSA, БЛРС-продуцирующие и карбапенем-резистентные энтеробактерии и ГОНБ) и гликопептидам (VRE). При этом срок исследования сокращается до 18-24 ч. Кроме того, такие среды позволяют заметить «гетерогенность» популяции возбудителя по чувствительности к АМП, и выявить те колонии, которые характеризуются устойчивостью. Использование хромогенных сред не требует специального оборудования, обучения персонала лаборатории и дополнительных трудозатрат.

В 2010-2014 гг. для первичного посева проб клинического материала в бактериологической лаборатории РНЦРХТ дополнительно стали использовать две хромогенные среды, зарегистрированные в РФ: среду «CHROMagar ESBL», предназначенную для скрининга штаммов энтеробактерий, резистентных к ЦРС (продуцирующих БЛРС); среду «CHROMagar KPC» - для скрининга штаммов карбапенем-резистентных грамотрицательных бактерий.

Использование этих сред при первичном посеве биоматериала позволило уже через 18 ч. выдать врачу-клиницисту и клиническому фармакологу предварительные рекомендации о возможности использования для терапии цефалоспоринов и карбапенемов. Максимально ранняя информация о выделении таких штаммов микроорганизмов необходима также госпитальному эпидемиологу для проведения своевременных профилактических мероприятий в рамках инфекционного контроля.

Таблица 2

Алгоритм бактериологического исследования клинического материала с использованием традиционных и хромогенных питательных сред

Этапы	Алгоритм бактериологического исследования с использованием питательных сред	
	традиционных (приказ № 535 от 22.04.1985)	хромогенных
Посев клинического материала	**Моча:** 1. 5% Кровяной агар 2. Сахарный бульон 3. Простой агар **Раневое отделяемое:** 1. 5% Кровяной агар 2. Сахарный бульон 3. Среда для контроля стерильности **Материал из дыхательных путей:** 1. 5% Кровяной агар 2. Желточно-солевой агар 3. Шоколадный агар 4. Среда Эндо 5. Среда Сабуро	**Моча, раневое отделяемое, материал из дыхательных путей:** **универсальный набор сред** 1. 5% Кровяной агар (инкубация в аэробных и анаэробных условиях – кроме исследования мочи). 2. Хромогенная неселективная среда для выделения микроорганизмов из мочевого тракта. 3. Хромогенная среда для выделения *Candida*. 4. Хромогенная среда для выделения микроорганизмов, устойчивых к ЦРС. 5. Хромогенная среда для выделения микроорганизмов, устойчивых к карбапенемам. 6. Дополнительно **при исследовании мочи**: хромогенная среда для стрептококков группы В. 7. Хромогенные среды для выделения VRE и MRSA **(по эпид.показаниям)**
18-24 ч	1. Оценка результатов окраски по Граму, оксидазной и каталазной активности выросших микроорганизмов; 2. Пересев с сахарного бульона на кровяной агар.	1. **Идентификация окончательная:** *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *C.albicans;* 2. **Идентификация предварительная:** *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Candida* «не-*albicans*»;
		3. Выявление штаммов грамотрицательных микроорганизмов, устойчивых к ЦРС и карбапенемам, VRE и MRSA
36-48 ч	Продолжение исследования: 1. Постановка тестов для родовой/видовой идентификации; 2. Тесты на чувствительность к АМП	Идентификация до вида и определение чувствительности к АМП (бак. анализатор), интерпретация результатов (экспертная система). **Исследование завершено**
От 3 до 10 суток	1. **Идентификация до вида** 2. **Учет результатов определения чувствительности к АМП,** постановка подтверждающих тестов. **Исследование завершено.**	
Бактериологическое исследование крови		
Посев клинического материала (приказ № 535)	1. Двойная среда 2. Среда для контроля стерильности 3. «Среда со стаканчиком» 4. Среда Тароцци 5. Среда Сабуро	Бактериологический анализатор для гемокультур: 1. Среда для культивирования аэробных микроорганизмов и грибов; 2. Среда для культивирования анаэробных микроорганизмов
2-18 ч.	Инкубация в термостате	Пересев на: 1. 5% Кровяной агар (аэробные и анаэробные условия инкубации); 2. Хромогенная неселективная среда для выделения микроорганизмов из мочевого тракта; 3. Хромогенная среда для выделения *Candida*; 4. Хромогенная среда для выделения микроорганизмов, устойчивых к ЦРС;

		5. Хромогенная среда для выделения микроорганизмов, устойчивых к карбапенемам; 6. Хромогенные среды для выделения VRE и MRSA (по эпид.показаниям)
18-24 ч	Пересев на простой агар	1. **Идентификация окончательная:** *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *C.albicans;* 2. **Идентификация предварительная:** *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Candida* «не-*albicans*»; 3. Выявление штаммов грамотрицательных микроорганизмов, устойчивых к ЦРС и карбапенемам, VRE и MRSA.
36-48 ч.	**Продолжение исследования:** 1. Постановка тестов для родовой/видовой идентификации; 2. тесты на чувствительность к АМП	Идентификация до вида и определение чувствительности к АМП (бак. анализатор), интерпретация результатов (экспертная система). **Исследование завершено**
От 3 до 10 суток	1. **Идентификация до вида** 2. **Учет результатов определения чувствительности к АМП,** постановка подтверждающих тестов. **Исследование завершено**	
Отрицательный ответ	9-10 дней	7 дней

Таблица 3

Сроки проведения бактериологического исследования с использованием хромогенных питательных сред

Время получения результатов	Алгоритм бактериологического исследования с использованием питательных сред	
	традиционных (приказ № 535 от 22.04.1985)	хромогенных
18-24 ч	Получение чистой культуры микроорганизмов	Получение чистой культуры микроорганизмов; предварительная и/или окончательная идентификация; выявление полирезистентных штаммов клинически значимых микроорганизмов
36-48 ч	Постановка идентификационных тестов, определение чувствительности микроорганизмов к АМП	Окончательная идентификация; учет результатов чувствительности к АМП (бактериологический анализатор, интерпретация результатов - критерии EUCAST). **Исследование завершено**
72 ч -10 суток	Учет результатов тестирования. **Исследование завершено**	

Рекомендации

1. В настоящее время при традиционном бактериологическом исследовании хромогенные среды можно использовать в двух направлениях:

- для одновременного селективного выделения и идентификации микроорганизмов в пробах клинического материала (возбудителей ИМВП, *Candida* spp., *Salmonella*, *E.coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *S.aureus*, *Streptococcus* гр. B и др.), а также в пробах пищевых продуктов, воды, объектах внешней среды при исследованиях, проводимых в рамках внутреннего контроля качества и санитарной микробиологии;

- для скрининга штаммов микроорганизмов, устойчивых к определенным классам АМП: метициллинрезистентных *S.aureus,* ванкомицинрезистентных *Enterococcus* spp., Enterobacteriacae и неферментирующих грамотрицательных бактерий, устойчивых к цефалоспоринам и карбапенемам (в том числе, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра и карбапенемазы).

2. Хромогенные среды имеют преимущества перед традиционно используемыми средами, так как одноэтапное выделение, идентификация и количественная оценка возбудителей ГСИ и инфекционных заболеваний позволяют существенно сократить сроки бактериологического исследования (с 3-5 суток до 18-36 ч).

3. Детекция устойчивых к АМП штаммов клинически значимых микроорганизмов в течение 18-24 часов при первичном посеве клинического материала на хромогенные питательные среды значительно упрощает и сокращает бактериологическое исследование.