Кафедра клинической фармакологии и антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии

Контактный адрес: Дехнич Андрей Владимирович

214019, Смоленск, а/я 5, Факс: (0812)61-12-94

andrei@microbiology.ru

УДК 615.33.015.8.07

Выявление резистентности к метициллину и другим b-лактамным антибиотикам методом скрининга

С момента появления в 70-х годах метициллинорезистентные стафилококки и прежде всего метициллинорезистентные штаммы Staphylococcus aureus (MRSA) являются одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций. Частота MRSA в структуре стафилококковых инфекций в последние годы резко возросла во всем мире, например, в США с 2% в 1975 г. до 35% в 1996 г.

Резистентность стафилококков к оксациллину (метициллину) может быть обусловлена тремя основными механизмами:

* продукцией дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ) – ПСБ-2а (фермента, участвующего в синтезе клеточной стенки), кодируемого хромосомальным геном mecА – классическая, или истинная резистентность к метициллину (оксациллину);
* инактивацию вследствие гиперпродукции бета лактамаз;
* модификацию нормальных ПСБ.

С клинической точки зрения, важно дифференцировать штаммы с классической (mecА-обусловленной) резистентностью от штаммов с двумя другими редковстречающимися механизмами резистентности, обусловливающими низкий или пограничный уровень устойчивости. Это связано с тем, что при инфекциях, вызванных штаммами с mecA-обусловленной резистентностью, терапия бета-лактамными антибиотиками (пенициллинами, цефалоспоринами, карбапенемами) будет неэффективна.

Кроме того, эти штаммы часто бывают резистентны практически ко всем другим классам антибиотиков за исключением гликопептидов (ванкомицин, тейкопланин). Фенотипические характеристики, которые могут помочь дифференцировать три перечисленных механизма резистентности, изложены в таблице.

ТИПЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К МЕТИЦИЛЛИНУ(ОКСАЦИЛЛИНУ) У СТАФИЛОКОККОВ

Штаммы с классическим типом резистентности могут в свою очередь быть гомо- или гетерогенными по типу экспрессии устойчивости. При гомогенном типе экспрессии практически все микробные клетки проявляют резистентность в стандартных in vitro тестах, в то время как при гетерогенном типе только небольшая часть клеток проявляет резистентность фенотипически. Нередко только 1 из 10–100 млн клеток в популяции с наличием гена mecА экспрессирует резистентность, что обусловливает получение пограничных результатов при определении чувствительности к оксациллину (МПК – 2–8 мг/л). Резистентность, обусловленная гиперпродукцией b-лактамаз и мутацией нормальных ПСБ, также приводит к получению пограничных значений МПК. Однако резистентность к оксациллину, обусловленная гиперпродукцией b-лактамаз, легко отличается от классической резистентности по ее обратимости при использовании ингибиторов b-лактамаз.

В отличие от штаммов с классической резистентностью гиперпродуценты b-лактамаз и штаммы с мутациями нормальных ПСБ обычно не имеют множественной резистентности к другим антибиотикам.

Наличие классической резистентности наиболее легко определить методом скрининга, так как рост микробных клеток с неклассическими типами резистентности обычно ингибируются.

Для определения чувствительности используется оксациллин ввиду его более высокой стабильности при хранении по сравнению с метициллином.

ПРИНЦИП

Для идентификации резистентности к оксациллину (метициллину) у стафилококков необходимо соблюдение следующих условий:

* добавление 4% NaCl в агар с оксациллином (pH 7,2–7,4, так как при более низком pH увеличивается число ложноотрицательных результатов);
* температура инкубации 35oС;
* длительность инкубации 24 ч для S.aureus и 48 ч – для коагулазоотрицательных стафилококков;
* стандартизированное число микроорганизмов.

МИКРООРГАНИЗМ

Чистая культура Staphylococcus spp., инкубированная в течение 18–24 ч на кровяном агаре.

МАТЕРИАЛЫ

1. Агар Мюллера–Хинтон с добавлением 4% NaCl (4 г на 100 мл среды) и 6 мг/л оксациллина (0,6 мг на 100 мл среды). Агар Мюллера–Хинтон хранится при температуре 2–8oС, готовится согласно прописи на этикетке, 4% NaCl добавляется до автоклавирования.
2. Субстанция оксациллина с известной активностью предварительно растворяется в стерильной дистиллированной воде (расчет концентрации оксациллина проводят с учетом его активности) и добавляется в охлажденный на водяной бане до 48 –50oС агар Мюллера –Хинтон. Приготовленный агар разливается по чашкам с толщиной слоя 3–4 мм (на чашку диаметром 100 мм – 25 мл). Готовые чашки со средой хранятся в пластиковых пакетах при температуре 4 –8oС не более 5 сут.
3. Для контроля роста необходимо также приготовить чашки с агаром, содержащим 4% NaCl, но без антибиотика.
4. Кровяной агар с чистой культурой стафилококка, инкубированной в течение 18 –24 ч.
5. Стерильный физиологический раствор.
6. Стандарт мутности 0,5 по Мак-Фарланду.
7. Стерильные тампоны или микропипетка (10 мкл).
8. Термостат с температурой инкубирования 35oС.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Исследование проводят при обязательном контроле роста испытуемых культур на агаре Мюллера–Хинтон с 4% NaCl без оксациллина (культуру наносят так же, как на агар с оксациллином).

Контрольные штаммы:

S.aureus ATCC 38591 – резистентный;

S.aureus ATCC 29213 – чувствительный.

ПОСТАНОВКА ТЕСТА

Приготовление инокулюма. Бактериальную взвесь стафилококка готовят из нескольких колоний с одинаковой морфологией на стерильном физиологическом растворе (3 мл) и доводят до мутности 0,5 по Мак-Фарланду (1,5·108 КОЕ/мл).

Инокуляция. Метод I (микропипеткой):

1. приготовить разведение 1:100 стандартного инокулюма 0,5 по Мак-Фарланду для получения бактериальной взвеси, содержащей 1,5·106 КОЕ/мл (например, добавить 0,1 мл стандартной суспензии к 9,9 мл стерильного физиологического раствора);
2. с помощью микропипетки нанести каплю (10 мкл) разведенной стандартной суспензии на поверхность агара с оксацил лином.

Метод II (с помощью тампона ):

1. погрузить стерильный ватный тампон в пробирку со стандартизированной суспензией (0,5 по Мак-Фарланду), затем отжать избыток влаги о стенку пробирки;
2. коснуться тампоном поверхности агара с оксациллином.

ИНКУБАЦИЯ. Штаммы S.aureus инкубируются при температуре 35oС в течение полных 24 ч, а коагулаза(–) стафилококков – в течение 48 ч.

Примечание. Среда АГВ не может быть рекомендована для постановки теста в связи с высокой частотой ложноположительных результатов.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА

Интерпретация:

* появление видимого роста более 1 колонии на месте нанесения культуры означает устойчивость данного штамма к оксациллину (метициллину);
* при отсутствии роста на месте нанесения культуры исследуемый штамм учитывается как чувствительный к метициллину (оксациллину).
* при сомнительных результатах, а также для штаммов, выделенных у больных с клинически неэффективной терапией и у больных с серьезными инфекциями, необходимо провести развернутое исследование с определением МПК к оксациллину и гена mecA.

Представление результата:

* S.aureus или коагулаза(–) стафилококк (S.epidermidis), чувствительный к метициллину (оксациллину);
* S.aureus или коагулаза(–) стафилококк (S.epidermidis), резистентный к метициллину (MRSA или MRSE).

Метициллино (оксациллино) резистентные стафилококки должны расцениваться как резистентные ко всем b-лактамам – пенициллинам, цефалоспоринам, карбапенемам, комбинациям пенициллинов с ингибиторами b-лактамаз. Кроме того, среди метициллинорезистентных стафилококков очень часто наблюдается ассоциированная резистентность к другим антибиотикам – аминогликозидам, макролидам, хинолонам, тетрациклинам.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Скрининг на агаре с оксациллином предназначен для фенотипического определения штаммов, имеющих ген mecA. Однако штаммы с другими типами резистентности иногда могут давать ложноположительный результат.
2. Метод скрининга для выявления резистентности к оксациллину (метициллину) менее надежен у коагулаза(–) стафилококков, чем у S.aureus.

Примечание. Оксациллин в сравнении с метициллином менее стабилен к действию стафилококковых b-лактамаз, что может привести к получению большего числа ложноположительных результатов, чем при использовании метициллина. В то же время метициллин в сравнении с оксациллином значительно менее стабилен при хранении, что и ограничивает его применение.

ВАНКОМИЦИНОРЕЗИСТЕНТНЫЙ Staphylococcus aureus

О возможности появления ванкомицинорезистентных штаммов S.aureus стали задумываться около 10 лет назад после сообще ний о появлении резистентности к ванкомицину у энтерококков.

Первое сообщение о выделении метициллинорезистентного S.aureus со сниженной чувствительностью к ванкомицину (МПК 8 мг/л) из клинического материала появилось в 1996 г.

Несмотря на значение МПК к ванкомицину, соответствующее диапазону умеренной резистентности, данный штамм был зарегистрирован как VRSA (ванкомицинорезистентный S.aureus) ввиду клинической неэффективности ванкомицина. У этого штамма не было найдено ни одного из ранее известных механизмов резистентности к ванкомицину; отмечено только увеличение толщины клеточной стенки и концентрации пенициллин-связывающих белков 2 и 2а.

Далее одно за другим последовали сообщения о выделении из клинического материала штаммов S.aureus с МПК к ванкомицину 8 мг/л, обозначенных как VISA (S.aureus со сниженной чувствительностью к ванкомицину).

В результате углубленного исследования ванкомицинорезистентности у MRSA при скрининге более чем 2000 штаммов из различных стационаров было выявлено от 1 до 25%(!) штаммов с гетерогенной (индуцибельной) резистентностью к ванкомицину, экспрессирующих ее с частотой около 1 клетки на 1 млн. Такие штаммы могут являться предше ственниками VRSA.

Специалисты пока не пришли к согласию, какой термин использовать: VRSA или VISA. Это связано с тем, что, несмотря на значения МПК, соответствующие диапазону умеренной резистентности, налицо клиническая неэффективность ванкомицина при терапии VRSA- и VISA-инфекций.

Многие специалисты предлагают свои методы скрининга ванкомицинорезистентности у стафилококков. Однако общепринятые стандарты еще не разработаны.

Таким образом, чрезвычайно важна разработка методов лабораторной диагностики и мониторинга ванкомицинорезистентности, особенно у пациентов, получающих или получавших ванкомицин/ тейкопланин, и при неэффективности этой терапии.

Следует разработать методики контроля за VRSA-инфекциями. Для предупреждения распространения VRSA необходимо изолировать больных и носителей S.aureus. Кроме того, применение антибиотиков должно предусматривать снижение числа необоснованных назначений ванкомицина.

В России пока не описано ни одного штамма S.aureus со сниженной чувствительностью к ванкомицину. Вероятнее всего это связано с редким использованием ванкомицина в клинической практике.