

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

КАК ОБЕСПЕЧИТЬ КАЧЕСТВО

М.В. Сухорукова
Москва, 12 октября 2017

НЕОБХОДИМЫЙ УРОВЕНЬ ТОЧНОСТИ

Проведение измерений всегда сопровождается определенной степенью погрешности

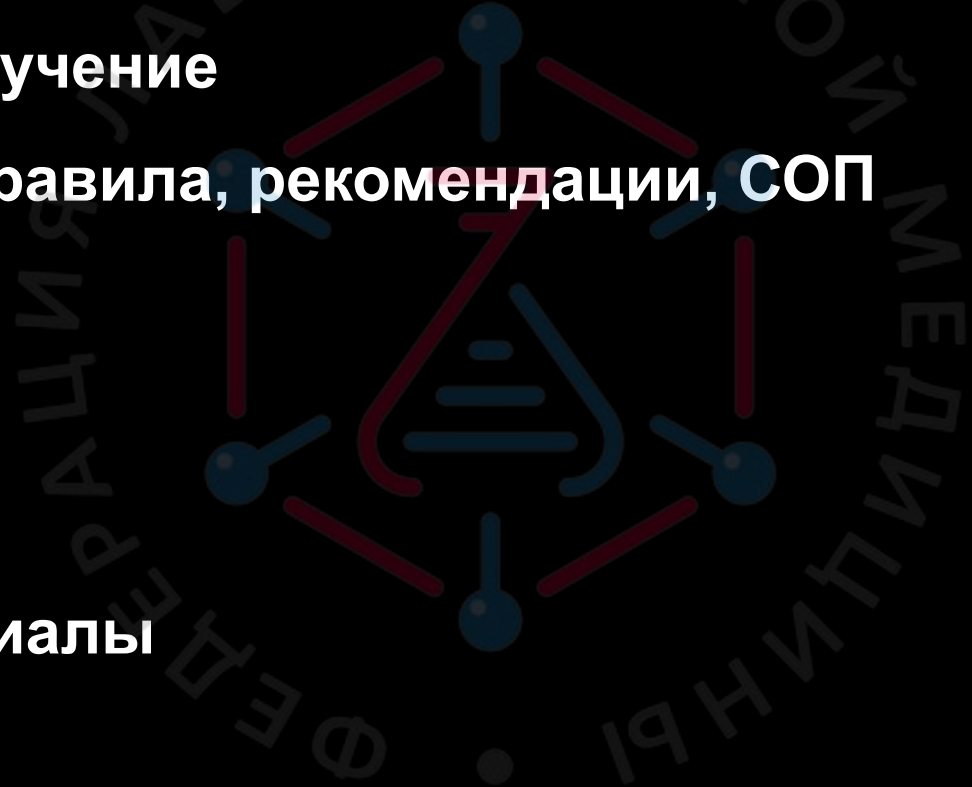
Основная задача – уменьшение погрешностей настолько, насколько позволяют ограничения аналитических систем

СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ КАЧЕСТВОМ КОНТРОЛЬ И ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА

- **Система управления качеством:** скоординированные действия, направляющие и контролирующие деятельность организации в отношении качества
- **Контроль качества** – регулярные проверки для отслеживания текущего соблюдения стандартов качества – !это лишь элемент системы управления качеством
- **Обеспечение качества** – меры, принятые до начала работы для предотвращения отклонения от стандарта качества
- Организация процессов (вкл. процедуры исследований) – это один из 12 основных элементов системы качества

ЧТО НЕОБХОДИМО ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРОЦЕССА?

- **Люди:** человек, обладающий определенными знаниями и навыками
 - Информация и обучение
- **Способы:** методы, правила, рекомендации, СОП
- **Материалы:**
 - помещение
 - оборудование
 - расходные материалы



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- **Имплементация рекомендаций Европейского комитета по определению чувствительности (EUCAST), начиная с версии 4.0 с учетом ситуации в России**
- **Зарегистрированы в федеральной электронной медицинской библиотеке: впервые 15 ноября 2014**
- **Версия 2015-02 – имплементация изменений и дополнений рекомендаций EUCAST 2015 – 09.02.2016**
- **2017 – обсуждение и утверждение новой версии – на основе версии EUCAST 7.1, 10.03.2017**

ЧТО ОПИСЫВАЮТ СТАНДАРТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ?

- **Процедуры** определения чувствительности (материалы и методы: инокулюм, среды и параметры тестирования)
- Рекомендации по выбору **наборов антибиотиков** для тестирования различных групп микроорганизмов
- **Пограничные значения МПК** ($\emptyset$ зон подавления роста) для каждой комбинации микроорганизм – антибиотик), которые позволяют отнести микроорганизм к категориям: **чувствительности (S)**, **умеренной резистентности (I)**, или **резистентности (R)**, в соответствии с ожидаемой клинической эффективностью
- Параметры **контроля качества** и допустимые значения МПК ($\emptyset$ зон подавления роста) для контрольных штаммов микроорганизмов

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

- **Диффузионные**

- диско-диффузионный (ДДМ)

Ø зоны подавления роста, мм

- градиентной диффузии (Е-тест и др.)

МПК, мкг/мл

- **Последовательных разведений**

- разведений в агаре

МПК, мкг/мл

- разведений в бульоне

МПК, мкг/мл

- микроразведений в бульоне

МПК, мкг/мл

- **Автоматизированные системы**

- модификация метода микроразведений в бульоне

- **Дополнительные методы выявления механизмов резистентности**

МПК (?)

категория Ч-УР-Р

категория Ч-УР-Р (?)

наличие отдельных факторов Р

ВЫБОР МЕТОДА: когда надо определять МПК?

➤ Определенные комбинации микроорганизм / антибиотик

Enterobacteriaceae / колистин*

Enterobacteriaceae / карбапенемы (промежуточный рез-тат)

Salmonella spp. / ципрофлоксацин*

P. aeruginosa / колистин, полимиксин В*

Acinetobacter spp. / колистин, полимиксин В

Enterococcus spp. / ванкомицин (промежуточный рез-тат)

Staphylococcus spp. / ванкомицин, тейкопланин, телаванцин*

Staphylococcus spp. / даптомицин, фосфомицин*

Стрептококки групп А, В, С и G / даптомицин*

S. pneumoniae / пенициллин, ампициллин, цефепим, цефотаксим, цефтаролин, цефтриаксон и др.

ЦС, карбапенемы*

Стрептококки группы Viridans / пенициллин*

* Клинические рекомендации, 2015-02, EUCAST Breakpoint table v. 7.1

ВЫБОР МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

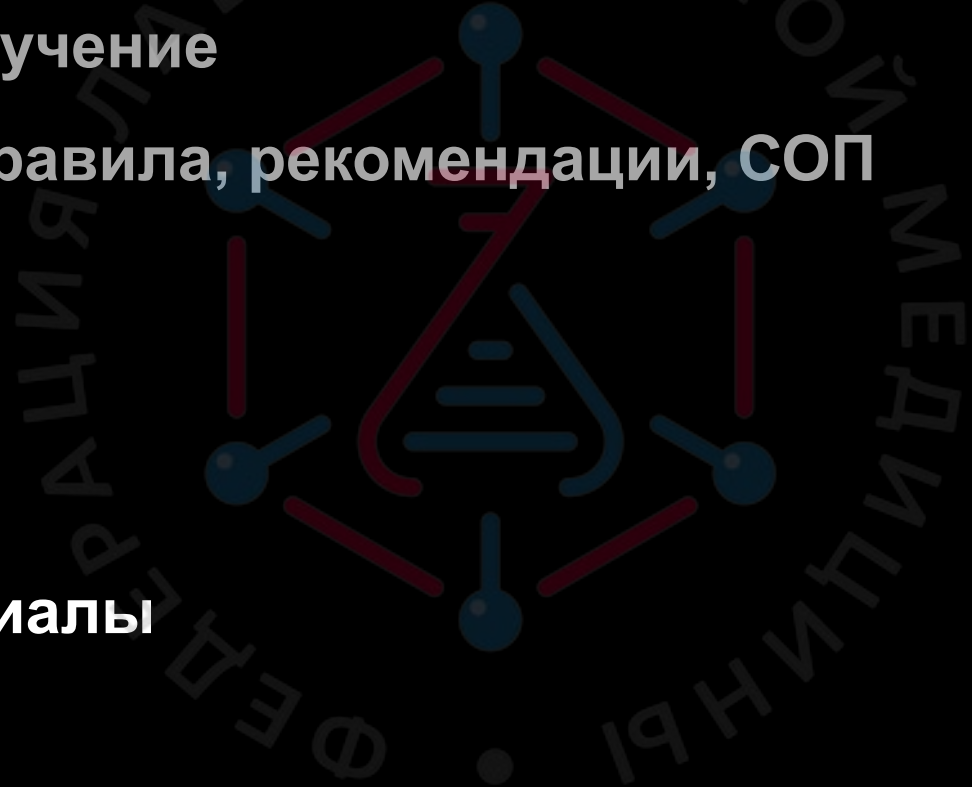
«В настоящее время большинство лабораторий использует 2 метода, особенно при наличии автоматизированных систем... Преимуществом использование двух методов является также возможность проверки необычных результатов определения чувствительности»

G. Kahlmeter, J. Turnidge

ДДМ + Градиентный метод
или
Автоматизированный + Градиентный метод
или
ДДМ + МПК
или
Автоматизированный + МПК

ЧТО НЕОБХОДИМО ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРОЦЕССА?

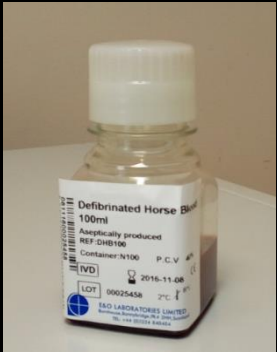
- Люди: человек, обладающий определенными знаниями и навыками
 - Информация и обучение
- Способы: методы, правила, рекомендации, СОП
- **Материалы:**
 - помещение
 - оборудование
 - расходные материалы



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ: Материалы

■ Питательная среда: агар/бульон Мюллера-Хинтон

Организм	Среда
<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	Агар Мюллера-Хинтон
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptococci групп A, B,C, и G Streptococci группы viridans <i>Haemophilus</i> spp. <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Campylobacter jejuni u coli</i> <i>Corynebacterium</i> spp.	Агар Мюллера-Хинтон + 5% дефибринированной лошадиной крови + 20мг/л β-НАД (МХ-П)

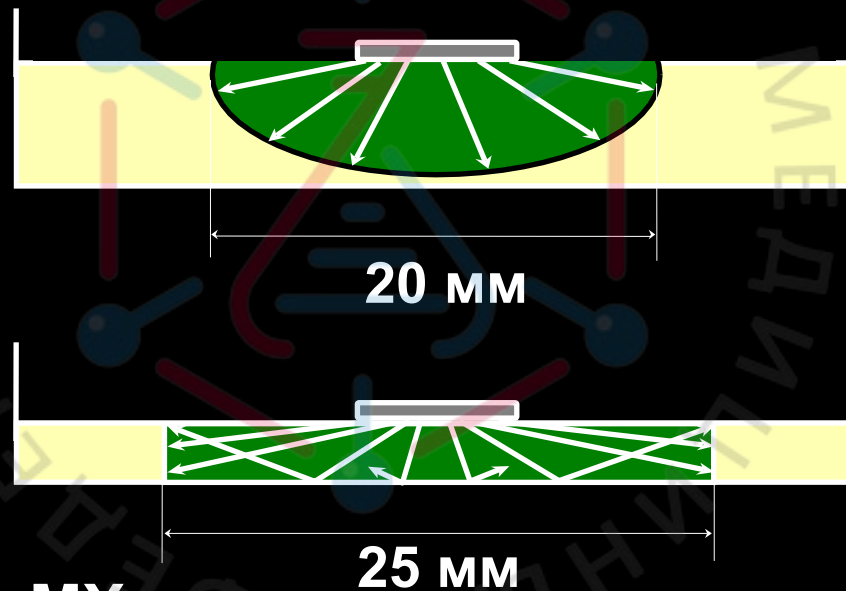


Письмо Росздравнадзора № 04-23336/16 от 03.06.2016

«...Таким образом, вещества, используемые для приготовления питательных сред, в частности «**кровь животных и её компоненты**», не относятся к медицинским изделиям и не подлежат государственной регистрации в Росздравнадзоре в качестве медицинского изделия.»

МАТЕРИАЛЫ: ДДМ

- Питательная среда: агар Мюллера-Хинтон
- Правила приготовления чашек с агаром:
 - толщина слоя агара в чашке Петри – $4 \pm 0,5$ мм: дозирование объема при приготовлении агара: 25 мл - в чашку Ø - 90 мм, 31 мл – в чашку Ø - 100 мм)



- Готовые чашки с агаром МХ
- Соблюдение правил хранения чашек с агаром МХ

МАТЕРИАЛЫ: ДДМ

■ Содержание АМП в диске, мкг

	CLSI (МУК 4.2.1890-04)	EUCAST (КР 2014, 2015)
Пенициллин	10 (ЕД)	1 (ЕД)
Пиперациллин	100	30
Пиперациллин-тазобактам	100-10	30-6
Цефотаксим	30	5
Цефтазидим	30	10
Цефтаролин (нет в МУК 4.2.1890-04)	30	5
Нетилмицин	30	10
Ампициллин (<i>Enterococcus</i> spp., <i>H. influenzae</i> , <i>L. monocytogenes</i>)	10	2
Гентамицин (<i>Enterococcus</i> spp.)	120	30

EUCAST: ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ДИСКОВ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

1 (2014) И 2 (2015) ЭТАПЫ

Antimicrobial disk	Bio-Rad		Liofilchem		BD		Abtek		SirScan		Oxoid		HiMedia		Bioanalyse		Mast	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Benzylpenicillin 1 unit					L				H	H			NA	NA	H	H		
Amoxicillin-clav. 30 µg	H	H*					L						H	H		L		
Piperacillin-tazo. 36 µg							L	L	H				NA	NA				
Oxacillin 1 µg			L		L				L				H	H	L			
Mecillinam 10 µg							L		H				H		H			
Cefotaxime 5 µg ¹							NA		L				NA	NA				
Cefoxitin 30 µg ²	H*	H*	H	H*			NA	L					L*	L*		L		
Ceftazidime 10 µg							L	L					L	H				
Meropenem 10 µg ¹	H		H*				L	L			H		H					
Ciprofloxacin 5 µg ²	L				L		L	L					H	H*		L	L	
Norfloxacin 10 µg							L		L				H*	H				
Pefloxacin 5 µg			L	L	L		NA	NA	NA				H					
Gentamicin 10 µg					H		L		NA				H	H				
Tobramycin 10 µg	NA	NA	H										H*	H*				
Erythromycin 15 µg			L		L		L		L				H	H	L*	L		
Tetracycline 30 µg			L	L*	L*		L		L*					L	L		L	

Среднее – ±1 мм от целевого значения

Среднее – >1 мм, но ±2 мм от целевого значения

Среднее – >2 мм от целевого, но в пределах допустимого диапазона

Среднее – за пределами допустимого диапазона

NA – не проводилось

H – среднее >1мм выше целевого значения

L – среднее >1 мм ниже целевого значения

* ≥1 результат за пределами допустимого диапазона

МАТЕРИАЛЫ: АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ

- Фиксированный набор антибиотиков
- Ограниченный диапазон разведений антибиотиков
- Качественный результат: $\leq X$ мг/л или $\geq Y$ мг/л (Ч, УР, Р)
- Не всегда позволяет выявить резистентные штаммы
- **Несоответствие дизайна панелей или / и настроек экспертной системы актуальным стандартам определения чувствительности**



Дизайн панелей – согласно стандартам EUCAST (актуальной версии)

VITEK 2 AST

GN-1 – Enterobacteriaceae

GN-2 – ГОНБ, Enterobacteriaceae

GP – *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. *S. agalactiae* (SGB)

PHOENIX

Gram Negative / Gram Negative Combo / Gram Negative Urine Panel

Gram Positive / Gram Positive Combo Panel

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА: КОНТРОЛЬ ПРОЦЕССОВ

- **Контроль качества** – это шаги, производимые в процессе создания продукта или предоставления услуги для обеспечения их качества
- **Контроль качества определения чувствительности**
 - Внутренний (внутрилабораторный) контроль качества выполнения метода – регулярное определение чувствительности контрольных (коллекционных) штаммов и сопоставление результатов с диапазонами допустимых значений (МПК или Ø зон подавления роста)
 - Внешняя оценка качества – Федеральная Система Внешней Оценки Качества (ФСВОК), раздел «Клиническая микробиология»
 - Международные программы внешней оценки качества (напр., NEQAS)

ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

- **Наличие контрольных штаммов в лаборатории**
 - Письмо Росздравнадзора № 10-34717/16 от 08.08.2016¹

«...Согласно предоставленной информации, у продукции «Штаммы микроорганизмов» в предназначении отсутствуют медицинские цели.
Исходя из вышеизложенного, на основании предоставленных данных, продукция «Штаммы микроорганизмов» не является медицинским изделием и не подлежит регистрации в Росздравнадзоре.»
- **Правила хранения контрольных штаммов^{2,3}**
- **Периодичность контроля^{2,3}**
- **Мониторинг качества исследований – регистрация и анализ результатов**

¹www.antibiotic.ru/minzdrav/news

²КР «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Версия 2015-02

³Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 7.0, valid from 2017-01-01

ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Контроль качества выполнения метода

Повседневный контроль метода

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Haemophilus influenzae ATCC 49766

Campylobacter jejuni ATCC 33560

Контроль методов выявления м-мов R

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603
(продуцент ESBL (SHV-18))

Staphylococcus aureus NCTC 12493
mecA-положительный, гетеро-резистентный
к оксациллину

Enterococcus faecalis ATCC 51299
высокий уровень резистентности к аминогликозидам
(HLAR), и резистентность к ванкомицину (*vanB*-
положительный)

Haemophilus influenzae ATCC 49247
β-лактамаза-отрицательный, ампициллин-
резистентный (BLNAR)

Escherichia coli NCTC 13846
(резистентный к колистину mcr-1-положительный)

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Целевые значения и контрольные диапазоны

Таблица 6. Целевые и допустимые диапазоны значений МПК и диаметров зон подавления роста контрольного штамма *Escherichia coli* ATCC 25922 (NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434)

Диско-диффузионный метод: питательная среда – МХА; инокулюм – 0,5 по стандарту мутности МакФарланда; инкубация – обычная атмосфера, $35\pm 1^\circ\text{C}$, $18\pm 2\text{ч}$; учет результатов – чашку Петри помещают сверху дном на темную матовую поверхность, так чтобы свет падал на нее под углом 45° (учет в отраженном свете); при измерении зон подавления роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста.

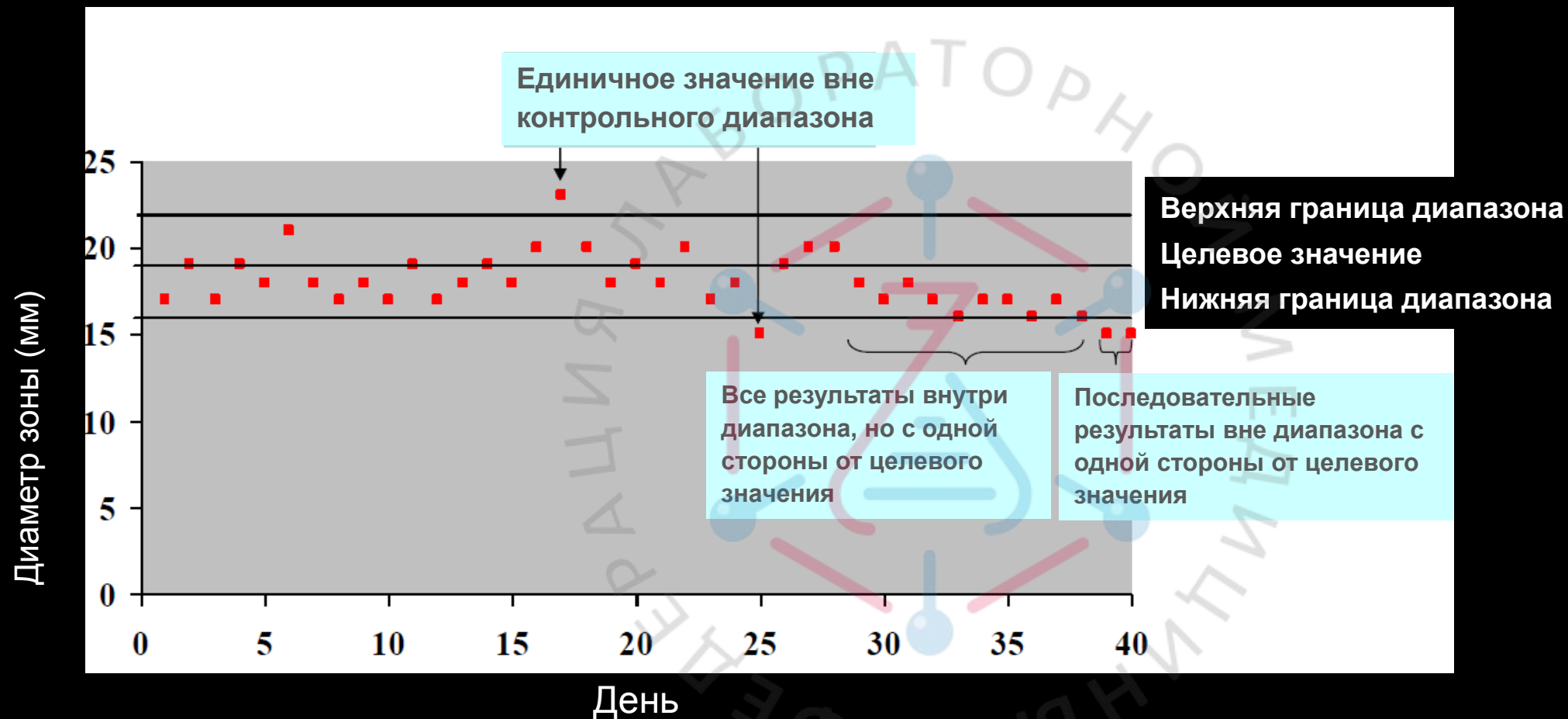
АМП	МПК (мг/л)		Содержание в диске (мкг)	Диаметр зоны подавления роста (мм)		
	Целевые значения ¹	Допустимые значения ²		Целевые значения ¹		Допустимые значения ³
Азтреонам	0,125	0,06-0,25	30	32		28-36
Амикацин	1-2	0,5-4	30	23		19-26

Интерпретация результатов

Значения МПК и диаметров зон подавления роста контрольных штаммов должны находиться в пределах указанных диапазонов

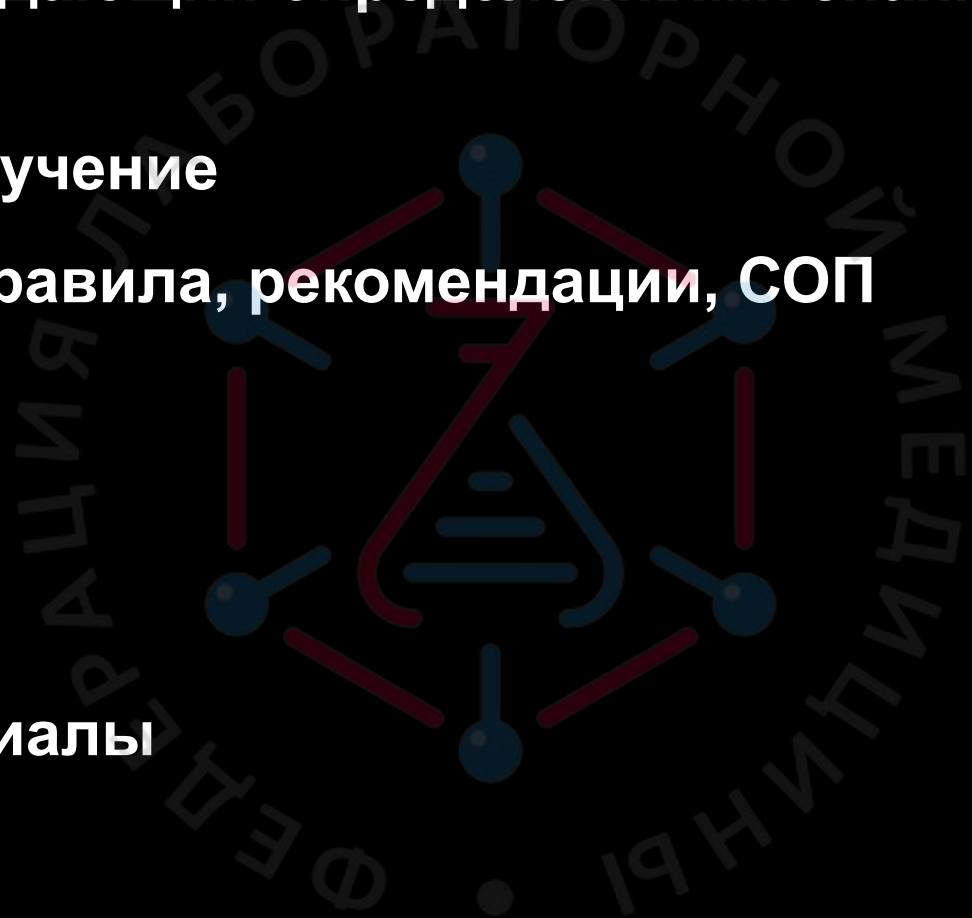
При наличии ≥ 10 результатов тестирования, мода МПК должна соответствовать целевому значению, а среднее значение диаметров зон подавления роста – должно быть близким к целевому значению

МОНИТОРИНГ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ



ЧТО НЕОБХОДИМО ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРОЦЕССА?

- **Люди:** человек, обладающий определенными знаниями и навыками
 - Информация и обучение
- **Способы:** методы, правила, рекомендации, СОП
- **Материалы:**
 - помещение
 - оборудование
 - расходные материалы



ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

■ Информация и обучение персонала

Описание методов

- Методы разведений (микроразведений в бульоне) –
ГОСТ Р ИСО 20776-1 – 2010 / ISO 20776-1:2006
ГОСТ Р ИСО 20776-2 – 2010 / ISO 20776-2:2006
- Автоматизированные системы – инструкция производителя
- Диско-диффузионный метод – Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Актуальная версия!)

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

■ Информация и обучение персонала

- Курсы повышения квалификации / Непрерывное медицинское образование
- Тематические семинары
- Интернет-ресурсы

<http://www.antibiotic.ru/minzdrav/news>

<http://www.femb.ru>

http://www.eucast.org/videos_from_eucast/

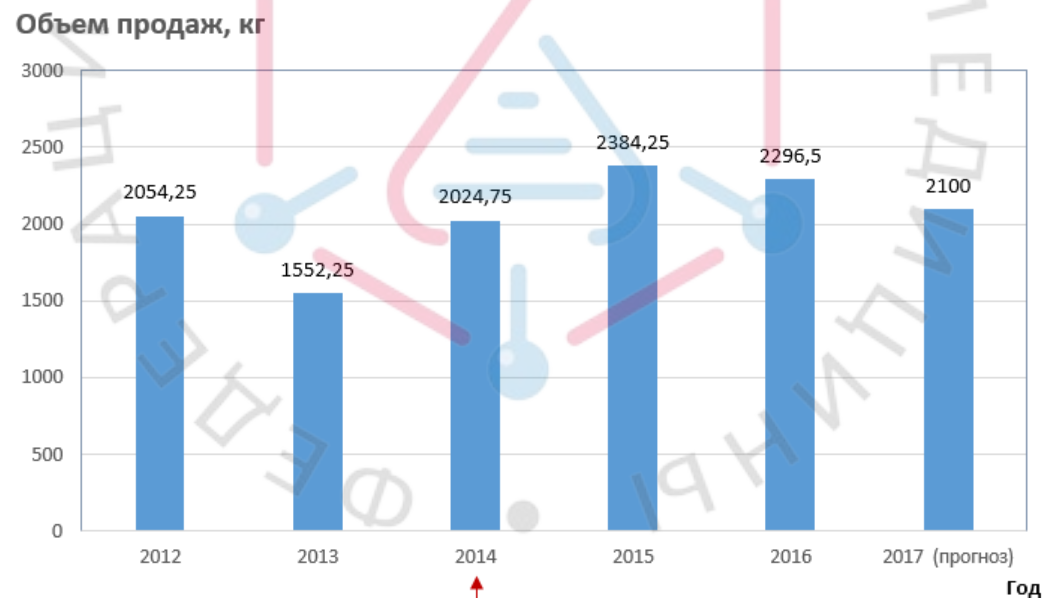
Видеоролики EUCAST

1. Приготовление инокулята
2. Инокуляция чашек
3. Нанесение дисков с антибиотиками и инкубация
4. Учет и интерпретация результатов определения чувствительности
5. Рекомендации по использованию таблиц пограничных значений

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

- Информация и обучение персонала и приверженность к выполнению рекомендаций

Производство и реализация питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам («типа АГВ») ФБУН ГНЦПМБ (Оболенск)



Клинические рекомендации

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ: КАК ОБЕСПЕЧИТЬ КАЧЕСТВО

- Своевременная актуализация обновляемых стандартов – объективная необходимость (в связи с накоплением новых клинических и лабораторных данных)
- Современный стандарт определения чувствительности КР «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»
- Корректный выбор метода тестирования и материалов
- Необходимо строгое соответствие методики и рекомендаций по интерпретации результатов
- Постоянный контроль качества выполнения метода (для всех методов, всех материалов)