

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ О.В. Арнаутов
11.04.2011
Регистрационный № 001-0111

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ
У ШТАММОВ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*,
ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ХЛАМИДИОИНДУЦИРОВАННЫМИ
АРТРОПАТИЯМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», УО «Белорусский государственный медицинский университет», УО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Н.Н. Полещук, канд. биол. наук Л.В. Рубаник, д-р мед. наук, проф. Г.М. Игнатъев, д-р мед. наук, проф. Н.Ф. Сорока, канд. мед. наук И.А. Варонько, канд. мед. наук, доц. С.А. Костюк

Минск 2010

Патология костей и суставов занимает значительный удельный вес среди болезней человечества. Особую актуальность в последние годы приобрело лечение пациентов с хламидиоиндуцированными артропатиями, которое, несмотря на использование различных антибиотиков, не всегда эффективно. Препаратами выбора для лечения таких пациентов являются тетрациклины, макролиды и фторхинолоны. Однако в литературе имеются данные об отсутствии терапевтического эффекта на фоне антибактериальной терапии пациентов с хламидийной инфекцией. Все чаще выделяются штаммы *C. trachomatis*, устойчивые к химиопрепаратам (тетрациклину, доксициклину, офлоксацину и азитромицину и др.), рекомендованным для лечения урогенитальной хламидийной инфекции.

Существует метод определения фенотипической устойчивости *C. trachomatis* к химиопрепаратам в перевиваемой культуре клеток, используя серийные разведения или стандартные диски с антибиотиками.

Кроме того, в настоящее время разработан подход к определению генотипической устойчивости хламидий к химиопрепаратам. Устойчивость *C. trachomatis* к препаратам группы тетрациклина связывают с наличием tet-M и tet-O детерминант, которые обнаруживаются при изменении конформации рибосом. Устойчивость хламидий к макролидам определяется генами, детерминирующими синтез метилтрансфераз (erm-гены), которые способны изменять сайты распознавания антибиотиков — 23S рРНК. Существует также механизм резистентности возбудителя к макролидам за счет транспозонов (класс мобильных элементов генома). Они, встраиваясь в геном, могут вызывать мутации, в т. ч. и такие значительные, как хромосомные перестройки. Транспозоны также играют важную роль в процессах рекомбинации и обмена генетическим материалом между различными видами в природе.

Еще один механизм устойчивости к макролидам может быть обусловлен мутацией в гене 23S рРНК. В результате снижается сродство мишени к антибиотикам и формируется устойчивость. При этом механизме может наблюдаться перекрестная резистентность ко всем макролидам.

Таким образом, имеется множество генетических факторов обуславливающих резистентность возбудителя к химиопрепаратам.

В настоящее время разработаны и стандартизированы ПЦР-тест-системы для выявления фрагментов tet- и erm-генов в ДНК *C. trachomatis*, позволяющие определять устойчивость возбудителя к тетрациклинам и макролидам. Однако выявление только данных генетических маркеров не всегда свидетельствует об истинной резистентности *C. trachomatis* к химиопрепаратам, поскольку возможна реверсия мутантного генотипа к дикому состоянию. Следует еще раз подчеркнуть, что лекарственная резистентность в целом является сложным явлением, включающим одновременно как генотипические, так и фенотипические компоненты.

В настоящей инструкции представлен оригинальный подход, заключающийся в одновременном определении как фенотипической, так и генотипической устойчивости изолятов *C. trachomatis* к антимикробным препаратам. Более того, для стандартизации результатов фенотипической и генотипической устойчивости использованы специальные стандартные диски, содержащие средние

терапевтические концентрации химиопрепаратов и стандартные ПЦР тест-системы.

Инструкция разработана с целью повышения эффективности лечения (снижение продолжительности и кратности курсов антибиотикотерапии, уменьшение частоты рецидивов суставного синдрома) хламидиоиндуцированных артропатий. Применение данного методического подхода будет полезным специалистам фундаментального и прикладного профиля: ревматологам, терапевтам, урологам, гинекологам, инфекционистам, другим смежным специалистам, а также студентам всех факультетов медицинских вузов, изучающим вопросы диагностики и лечения хламидийных инфекций, в частности хламидиоиндуцированных артропатий.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Для определения фенотипической устойчивости: термостат, центрифуга с горизонтальным ротором на 2000 об./мин, стерильные пенфлаконы, диски с антибиотиками, влажная камера, стекла предметные и стекла предметные трехлуночные, покровные стекла, световой микроскоп, флуоресцентный микроскоп с системой фильтров для ФИТЦ (возбуждающий свет с длиной волны <490 нм и эмиссией 520 нм), дозаторы переменного объема, средства индивидуальной защиты персонала, карандаш для маркировки стекол, емкости для сбора и обработки стекол, автоклав.

Культура клеток McCoу, 0,02% раствор Версена, 0,25% раствор трипсина, ростовая среда (среда Игла с 3% глутамина, содой, NERES, 5–7% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицином 20 мкг/мл), изолирующая среда (среда Игла с 3% глутамина, содой, NERES, гентамицином 20 мкг/мл, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 40% раствор глюкозы (1,25 мл на 100 мл среды), циклогексимид 1,0–2,0 мкг/мл), транспортная среда на основе сахарозо-фосфатного буфера, ацетон или 96°C этиловый спирт, дистиллированная вода, буферный раствор рН 7–8,5, нефлуоресцирующее иммерсионное масло, дезинфицирующие растворы, тест-системы для детекции *Chlamydia trachomatis* с помощью реакции иммунофлуоресценции.

Для определения генотипической устойчивости: ПЦР-боксы для проведения ПЦР-исследований, холодильники на 2–8 С с морозильной камерой, твердотельные термостаты для микропробирок, высокоскоростная (до 14000 об./мин) микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф», микроцентрифуги-вортексы для микропробирок, амплификатор (термоциклер), источник постоянного тока для электрофореза, камера для горизонтального электрофореза с плашками и гребенками для приготовления геля, трансиллюминатор для детекции продуктов амплификации в агарозном геле, видеосистема для регистрации изображений, компьютер, микроволновая печь для приготовления агарозного геля и магнитная плитка-мешалка, одноразовые пластиковые микропробирки типа «эппендорф» 1,5 мл, одноразовые пластиковые микропробирки 0,5 и 0,2 мл, наборы автоматических дозаторов переменного объема (отдельно для этапа выделения, амплификации выделенной нуклеиновой кислоты и детекции продуктов амплификации методом гель-электрофореза), одноразовые наконечники для

дозаторов переменного объема, тестированные на отсутствие ДНК/РНК, одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для дозаторов переменного объема, тестированные на отсутствие ДНК/РНК, стеклянные стаканы, стеклянные колбы, стеклянные палочки, штативы для микропробирок, штативы для автоматических дозаторов, емкости для дезинфекции, дезинфицирующие средства, бактерицидные облучатели, контейнеры для транспортировки образцов первичных проб, средства индивидуальной защиты (одноразовые перчатки, маски и др.). Набор реагентов, зарегистрированных в МЗ РБ, для выделения нуклеиновых кислот из проб первичных образцов, набор реагентов, зарегистрированных МЗ РБ, для проведения амплификации нуклеиновых кислот с детекцией методом гель-электрофореза, набор реагентов, зарегистрированных МЗ РБ, для детекции продуктов амплификации методом гель-электрофореза, дистиллированная вода, 70% этиловый спирт.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствие у пациентов с диагностированной хламидиоиндуцированной артропатией клинического и микробиологического эффекта при назначении противохламидийной терапии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Абсолютных и относительных противопоказаний не выявлено.

Тест на чувствительность *C. trachomatis* к антибиотикам затруднен при наличии сочетанной инфекции, т. к. в этих случаях, как правило, отмечается эффект доминирования условно-патогенной микрофлоры (активный рост в культуре клеток *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*) и/или сильное цитопатическое действие вирусов семейства *Herpesviridae* и др. Поэтому необходимо предварительно проводить санацию пациентов от доминирующей сопутствующей микрофлоры, острых форм герпетической инфекции (ВПГ 1, 2 типа, ЦМВ, ВЭБ).

При терапии принимают во внимание возможные побочные эффекты препаратов, приведенные в инструкции по их применению.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Для установления клинического диагноза «хламидиоиндуцированная артропатия» обследование пациентов проводят в соответствии с инструкцией по применению «Алгоритм комплексной клинической и лабораторной диагностики реактивных хламидиоиндуцированных артропатий», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 23.03.2007 (рег. № 161-1105). Необходимо также провести обследование на наличие у пациента сопутствующей урогенитальной инфекции (трихомонадной, герпетической и др.), так как от их наличия/отсутствия будет зависеть тактика терапии и ее эффективность.

Лабораторную диагностику хламидийной инфекции проводят согласно «Инструкции по лабораторной диагностике инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*» (приказ МЗ РБ № 486 от 20.05.2009) не менее чем двумя методами, одним из которых должен быть метод полимеразной цепной реакции или культуральный.

Взятие материала

Соскобный материал из урогенитального тракта пациентов целесообразно забирать на пике клинических проявлений заболевания или в период обострения. У женщин материалом для исследований должно служить отделяемое из цервикального канала, влагалища и уретры. Забор соскобного материала осуществляют универсальным зондом или ложкой Фолькмана преимущественно перед началом (за 2–4 дня) или сразу после менструации. У мужчин исследуют как отделяемое из уретры, так и секрет предстательной железы и эякулят. Забор соскобного материала проводят после пищевой провокации (спиртное, острое, соленое). Перед взятием материала из мочепоолового тракта пациентам рекомендуется задержка мочеиспускания не более чем на 1–1,5 ч (для предотвращения смыва пораженных клеток и возбудителя струей мочи, а также контаминации сопутствующей микрофлорой).

Взятый материал распределяют на предметном стекле, высушивают на воздухе и фиксируют метанолом. Для выделения возбудителей в культуре клеток McCoу соскобный материал, взятый от пациентов, помещают в транспортную среду, обеспечивающую выживание хламидий при транспортировке (2–3 ч) и хранении (1–2 сут -20°C ,). Транспортная среда готовится на основе сахарозо-фосфатного буфера (0,2 М сахара — 0,02 М фосфат): сахара — 68,46 г, K_2HPO_4 (безводный) — 2,088 г, KH_2PO_4 (безводный) — 1,088 г. Каждый реагент разводится отдельно в дистиллированной воде, затем все 3 раствора объединяют и доводят объем дистиллированной водой до 1 л. Добавляют HCl до установления pH 7,0–7,1; буфер автоклавируют во флаконах при 115°C 20 мин. К охлажденному буферу стерильно добавляют 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотик гентамицин 20 мкг/мл. Приготовленную среду разливают по 1 мл в стерильные пенициллиновые флаконы и хранят в замороженном виде при -20°C . Перед забором материала транспортную среду предварительно размораживают.

Выявление *C. trachomatis* в культуре клеток McCoу

Соскобным материалом, полученным из урогенитального тракта пациента, инфицируют 2-суточную культуру клеток McCoу, выращенную на покровных стеклышках (посевная доза 250 тыс./мл — 2 мл). Выделение хламидий в культуре клеток включает следующие этапы: удаление среды роста из пенфлаконов с культурой клеток McCoу, инокуляция соскобных образцов, центрифугирование пенфлаконов при 3000 об./мин в течение 1 ч, инкубация в термостате при 37°C 2 ч, удаление инокулята и внесение изолирующей среды с циклогексимидом, инкубация при 37°C в течение 72 ч.

Контроль развития хламидийной инфекции осуществляют путем микроскопирования клеток McCoу в инвертированном микроскопе (увеличение $\times 400$). Через 72 ч инкубации покровные стеклышки окрашивают по Романовскому–Гимзе и/или обрабатывают мечеными моноклональными противохламидийными антителами для выявления антигенов *C. trachomatis* в реакции иммунофлуоресценции. В работе используют тест-системы, зарегистрированные в Республике Беларусь.

Определение фенотипической устойчивости изолятов *C. Trachomatis*

Перед опытом по определению фенотипической устойчивости хламидий к химиотерапевтическим препаратам для накопления биомассы возбудителя в достаточных количествах проводят два «слепых» пассажа изолятов *C. trachomatis* в культуре клеток McCoу без добавления антибиотиков.

На следующем этапе культуру клеток McCoу инфицируют по 0,3 мл пробы (изолята) и проводят инкубацию 2 ч (37 °С). После инкубации в каждый флакон вносят по 1 мл изолирующей среды (без добавления антибиотика). Далее вносят диски с антибиотиками, содержащие средние терапевтические концентрации препаратов: азитромицин 15 мкг (ЕД), ципрофлоксацин 5 мкг (ЕД), офлоксацин 5 мкг (ЕД), ломефлоксацин 10 мкг (ЕД), доксициклин 30 мкг (ЕД), кларитромицин 15 мкг (ЕД), рокситромицин 15 мкг (ЕД) и другие, чувствительность к которым необходимо определить. На каждый антибиотик берут по 2 флакона. Все опыты сопровождаются положительным (внесение только изолята *C. trachomatis*) и отрицательным контролями (интактная культура McCoу).

Через 3 сут покровные стекла с культурой извлекают, промывают в физрастворе, высушивают, фиксируют 20 мин в 70% спирте и обрабатывают флуоресцирующими противохламидийными антителами. Учет результатов проводят путем микроскопирования на флуоресцентном микроскопе по 4-крестной системе: + — единичные хламидийные тельца в поле зрения; ++ до 5 хламидийных телец в поле зрения; +++ — 5–10 хламидийных телец в поле зрения; ++++ — более 10 хламидийных телец в поле зрения. При наличии свечения ++++ или +++ изолят считают устойчивым к тестируемому препарату. При наличии свечения ++ или + изолят считают слабочувствительным к тестируемому препарату. Отсутствие специфического свечения ЭТ и РТ *C. trachomatis* свидетельствует о чувствительности изолята к тестируемому препарату.

Определение генотипической устойчивости изолятов *C. trachomatis*

Гены устойчивости к тетрациклинам у изолятов *C. trachomatis* определяют, используя специфические праймеры, амплифицирующие последовательности генов устойчивости к тетрациклинам tet-M и tet-O: tet1-5'-AGT TCC ACC GAA TCC TTT CTG GGC TTC-3' (forward-праймер) и tet2-5'-TTC TTG AAT ACA CCG AGC AGG GAT TTC TCC-3' (reverse-праймер) или с помощью ПЦР-наборов. Длина специфических амплифицированных фрагментов составляет 407 пар нуклеотидов (рисунок 1).

М к+ к- 48 56 32 40 8 16 24 516 524 64 72 80 6 12 18

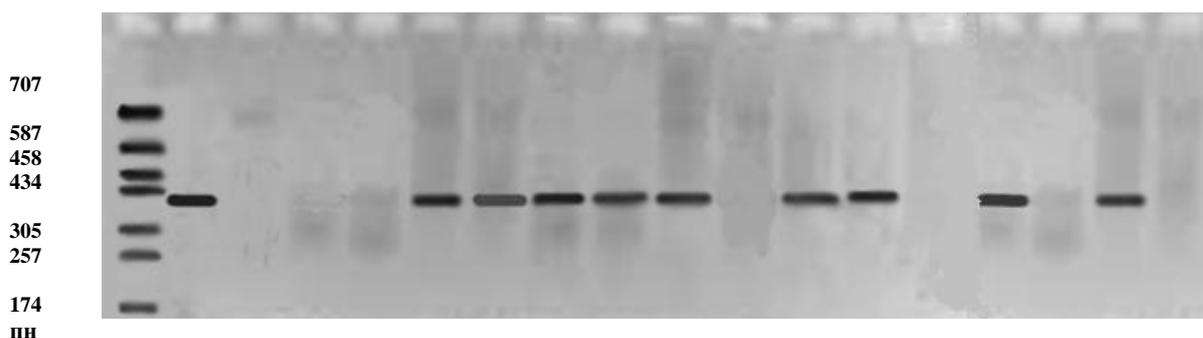


Рисунок 1 — Результаты выявления tet-гена у изолятов *C. Trachomatis*: пробы 48, 56, 516, 72, 6, 18 — фрагмент tet-гена не обнаружен; пробы 32, 40, 8, 16, 24, 524, 64, 80,12 — фрагмент tet-гена обнаружен

С целью обнаружения у изолятов *C. trachomatis* генов устойчивости к макролидам используют праймеры к участкам ДНК, кодирующим последовательности erm-генов, детерминирующих синтез метилтрансфераз: erm1-5'-TGA AAG CCA TGC GTC TGA CATC-3' (forward-праймер) и erm2-5'-TTG GCG TGT TTC ATT GCT TGAT-3' (reverse-праймер) или специальные ПЦР-наборы. Длина специфических амплифицированных фрагментов составляла 282 пары нуклеотидов (рисунок 2).

М к+ к- 48 56 32 40 8 16 24 516 524 64 72 80 6 12 18

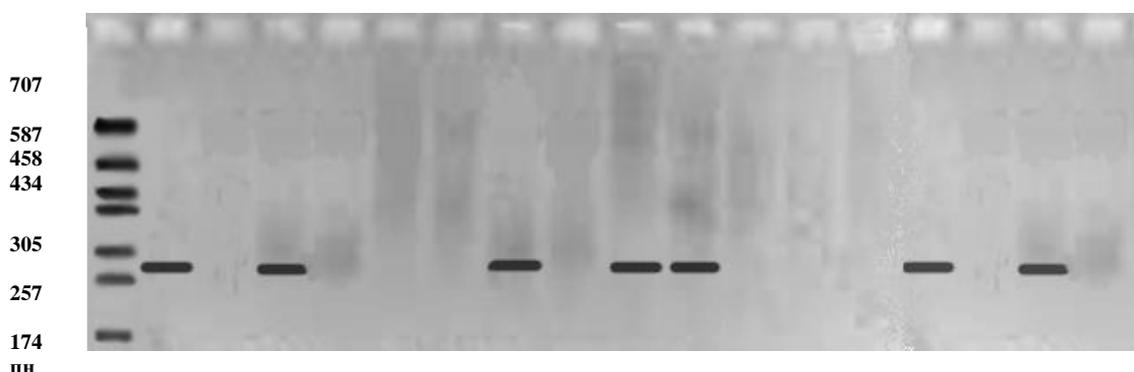


Рисунок 2 — Результаты выявления erm-гена у изолятов *C. Trachomatis*: пробы 56, 32, 40, 16, 524, 64, 72, 6, 18 — фрагмент erm-гена не обнаружен; пробы 48, 8, 24, 516, 80, 12 — фрагмент erm-ген обнаружен

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При исследовании фенотипической устойчивости изолятов *C. trachomatis* необходимо учитывать различия в действии антибиотиков *in vitro* и *in situ*. Тем не менее результаты исследования хламидий на устойчивость к антибиотикам являются важной информацией и помогают врачам при выборе оптимальных схем соответствующей противохламидийной терапии.

В лабораторно-диагностической практике могут встречаться ситуации, когда

результаты теста фенотипической устойчивости *C. trachomatis* к антибиотикам будут положительными, а результаты генотипической устойчивости — отрицательными. Это может быть связано с тем, что существуют другие малоизученные гены-устойчивости, которые являются причиной развития резистентности у представителей семейства *Chlamydiaceae*.

Может отмечаться и противоположная ситуация, когда результаты теста фенотипической устойчивости будут отрицательными, а результаты генотипической устойчивости — положительными. Это может быть обусловлено тем, что даже при наличии гена устойчивости он не экспрессируется на уровне РНК. Кроме того, устойчивость к препарату может быть непосредственно не связана с этим геном, а обусловлена другим механизмом — образованием «персистирующих телец», активное выведение антибиотика из микробной клетки (эфлюкс) и др.

Определение только фенотипической или только генотипической устойчивости хламидий к антибиотикам может привести к ложноположительным результатам и росту выявляемых устойчивых изолятов *C. trachomatis*. В этой связи предпочтительней использование сочетанного подхода с одновременным определением как фено-, так и генотипической устойчивости к антибиотикам.

Возможные ошибки при проведении ПЦР-анализа по выявлению tet- и erm-генов и их устранение изложены в инструкции по применению «Молекулярно-биологическая диагностика хламидиоза: требования по качеству и ошибки диагностики», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 18.09.2007 (рег. № 168-1206).

Возможны побочные действия лекарств согласно инструкции производителя.

Невыявленная у пациента сопутствующая урогенитальная инфекция (трихомонадная, герпетическая и др.) будет блокировать санацию организма от *C. trachomatis* или значительно снижать эффективность проводимой противохламидийной антибиотикотерапии.

При отсутствии терапевтического эффекта от проводимого лечения *in situ* необходимо также учитывать возможные мутационные изменения, включая воздействия мобильных элементов (транспозонов, плазмид, инсерционных элементов), и приобретение генов устойчивости *C. trachomatis* к другим микроорганизмам микробиоценоза урогенитального тракта.