


ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
Федеральное казённое учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный  
институт Сибири и Дальнего Востока»

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**



УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ  
ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ

ИРКУТСК – 2022



Федеральная служба по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека  
Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный институт  
Сибири и Дальнего Востока»

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ  
МИКРООРГАНИЗМОВ  
К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

**Учебно-методическое пособие  
для врачей-бактериологов**

Иркутск – 2022

УДК 615.015.8:615.281

ББК 52.64:52.81

062

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: учебно-методическое пособие для врачей-бактериологов. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 58 с.

ISBN 978-5-98277-361-6

Утверждено Ученым советом  
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора»

Предлагаемое учебно-методическое пособие предназначено для организации и проведения практических занятий на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей, биологов и лаборантов по особо опасным инфекциям.

Основное назначение пособия – ознакомить слушателей с методами определения чувствительности бактерий, в том числе возбудителей особо опасных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сеп, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам.

Авторы:

*О.Б. Колесникова, Т.Ю. Загоскина, Т.М. Долгова, О.В. Гаврилова,  
О.А. Старикова, Л.Г. Грднева, С.В. Балахонов*

ISBN 978-5-98277-361-6



© Коллектив авторов, 2022

© ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора, 2022

© ИНЦХТ, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений и обозначений .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
Методы определения чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам .....	9
Общая характеристика методов .....	9
Метод серийных разведений .....	10
Диско-диффузионный метод .....	14
Е-тест .....	17
Метод пограничных концентраций .....	18
Автоматизированные методы .....	18
Выявление бета-лактамаз расширенного спектра у бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i> .....	19
Выявление резистентности стафилококков к метициллину и другим бета-лактамным антибиотикам .....	22
ЗАНЯТИЕ 1. 1-й день. Определение антибиотикочувствительности энтеробактерий диффузионными методами (дисками и в Е-тесте)	23
ЗАНЯТИЕ 2. 2-й день. Определение антибиотикочувствительности энтеробактерий диффузионными методами (дисками и в Е-тесте)	24
ЗАНЯТИЕ 3. 1-й день. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в бульоне (на примере неферментирующих бактерий) .....	25
ЗАНЯТИЕ 4. 2-й день. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в бульоне (на примере неферментирующих бактерий) .....	27
ЗАНЯТИЕ 5. 1-й день. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в агаре (на примере возбудителей кишечных инфекций сем. <i>Enterobacteriaceae</i> ) .....	28
ЗАНЯТИЕ 6. 2-й день. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в агаре (на примере представителей семейства <i>Enterobacteriaceae</i> , возбудителей кишечных инфекций) .....	31

---

ЗАНЯТИЕ 7. 1-й день. Выявление продукции БЛРС штаммами <i>Enterobacteriaceae</i> методом «двойных дисков» (на примере <i>Salmonella</i> spp.) .....	32
ЗАНЯТИЕ 8. 2-й день. Выявление продукции БЛРС штаммами <i>Enterobacteriaceae</i> методом «двойных дисков» .....	32
ЗАНЯТИЕ 9. 1-й день. Выявление резистентности бактерий к бета-лактамным антибиотикам методом скрининга .....	33
ЗАНЯТИЕ 10. 2-й день. Выявление резистентности бактерий к бета-лактамным антибиотикам методом скрининга .....	34
ЗАНЯТИЕ 11. 1-й день. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам с помощью системы автоматической идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибиотикам <i>Micro Tax SY-LAB</i> , Австрия ....	35
ЗАНЯТИЕ 12. 2-й день. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам с помощью системы автоматической идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибиотикам <i>Micro Tax SY-LAB</i> , Австрия ....	37
ТАБЛИЦЫ .....	39
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	51
Приложение 1. Выбор контрольных штаммов .....	51
Приложение 2. Выбор питательных сред .....	52
Приложение 3. Требования к культуре, используемой для инокуляции .....	52
Приложение 4. Выбор антибактериальных препаратов .....	53
Приложение 5. Интерпретация результатов исследования .....	54
Контрольные вопросы для подготовки к практическим занятиям ..	55
Нормативные документы и рекомендуемая литература .....	56

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБП	– антибактериальный препарат
АГВ	– агар Гивенталья – Ведьминой
БЛРС	– бета-лактамазы расширенного спектра
ГСИ	– гнойно-септические инфекции
ДДМ	– диско-диффузионный метод
дН <sub>2</sub> О	– дистиллированная вода
КИ	– кишечные инфекции
КОЕ	– колониобразующие единицы
МПА	– мясопептонный агар
МПК	– минимальная подавляющая концентрация
НГОБ	– неферментирующие грамотрицательные бактерии
НФБ	– неферментирующие бактерии
ПСБ	– пенициллинсвязывающий белок
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
mecA	– ген резистентности к бета-лактамам антибиотикам
MRSA	– метициллин-резистентные <i>S. aureus</i>
MRSE	– метициллин-резистентные <i>S. epidermidis</i>
NCCLS	– Национальный Комитет по клиническим лабораторным метод

## ВВЕДЕНИЕ

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) приобретает все более важное значение в связи с появлением и широким распространением антибиотикорезистентности у бактерий и является важнейшим разделом работы бактериолога. Степень чувствительности возбудителей к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам необходимо знать не только для рационального подбора средств эффективной терапии и профилактики, но также для изучения возникновения и распространения инфекции, наблюдения за появлением и формированием антибиотикорезистентности микроорганизмов в отдельных лечебных учреждениях или географических регионах. Резистогаммы патогенов могут служить удобным маркером в эпидемиологических исследованиях.

Для получения объективных, воспроизводимых и сопоставимых результатов методы и средства определения антибиотикочувствительности микроорганизмов должны быть стандартизованы. Важное значение имеет правильная интерпретация полученных данных.

Чувствительность клинически значимых микроорганизмов к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам необходимо определять в каждом случае выявления инфекции и периодически – в ходе лечения.

Не следует в практических целях исследовать микроорганизмы, для которых методы определения чувствительности в настоящее время не стандартизованы и отсутствуют критерии интерпретации результатов.

При составлении перечня препаратов для изучения чувствительности к ним изолятов следует учитывать наличие перекрестной резистентности бактерий к разным представителям одной группы антибактериальных препаратов. На практике бывает достаточно оценить чувствительность микроорганизмов только к одному АБП из группы. Выбор антибиотиков и методов определения чувствительности к ним обычно зависят от целей и задач исследования, возможностей лаборатории, количества исследуемых проб. Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США (NCCLS) выпустил Руководство по отбору АБП для тестирования и Руководство для оценки, стандартизации и интерпретации те-



стов чувствительности к антибиотикам (NCCLS, 1997а, 1997б). Поскольку в России эти материалы малодоступны, в своей работе бактериологи должны руководствоваться методическими указаниями «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.1890-04), а при работе с особо опасными инфекциями (МУК 4.2.2495-09) «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам».

Насущной проблемой как медицинской науки, так и клинической медицины является антибиотикорезистентность возбудителей различных инфекционных заболеваний. Особую опасность представляет множественная лекарственная устойчивость бактерий, чрезвычайно быстро распространяющаяся с помощью мигрирующих генетических элементов, содержащих гены лекарственной устойчивости и имеющих специализированные механизмы их передачи среди широкого круга бактерий. Некоторые микроорганизмы легко мутируют, приобретая резистентность к ряду антибиотиков (стрептомицину, рифампицину, налидиксовой кислоте и др.).

Наличие антибиотикорезистентности обнаружено у природных штаммов чумного микроба. Все чаще встречаются сообщения о выделении стрептомициноустойчивых, тетрациклиноустойчивых вариантов микробов. Имеются факты регистрации резистентности к рифампицину, левомицетину и снижения чувствительности к гентамицину. От людей выделены возбудители с плазмидами множественной лекарственной устойчивости.

Большинство природных изолятов сибиреязвенного микроба чувствительны к АБП, однако описаны случаи выделения штаммов, устойчивых к пенициллину, амоксициллину, стрептомицину, тетрациклину, рифампицину.

Серьезным осложнением течения 7-й пандемии холеры является нарастание устойчивости возбудителя к традиционно применяемым для лечения инфекции препаратам тетрациклинового ряда, левомицетину, триметоприму/сульфаметоксазолу, фуразолидону, ампициллину и др. В настоящее время от больных выделяют культуры, имеющие от 3 до 10 маркеров резистентности, в т.ч. и к фторхинолонам (ципрофлоксацину, офлоксацину и др.).

Природная устойчивость возбудителей бруцеллеза и туляремии к бета-лактамам, цефалоспорином, а также сниженная чувствительность к химиопрепаратам возбудителей сальмонеллеза и мелиоидоза затрудняет выбор АБП и их комбинаций для этиотропной терапии указанных инфекций.

Экспериментально доказана возможность получения штаммов чумного, сибирязвенного, туляремийного микробов, устойчивых к АБП, что делает вероятным их использование в качестве агентов биотерроризма.

В процессе лечения антибактериальными препаратами спектр и степень антибиотикорезистентности возбудителей может меняться, что требует смены АБП или их комбинаций.

Выбор АБП для тестирования микроорганизмов и интерпретация результатов исследования основываются на данных о природной чувствительности микроорганизмов отдельных видов или их групп, распространении среди них приобретенной резистентности к антибактериальным препаратам и клинически подтвержденной эффективности при соответствующих заболеваниях. Исходя из этого, разработаны списки АБП (табл. 1), к которым чувствительность микроорганизмов разных видов рекомендуется определять в первую очередь (I группа) и дополнительно (II группа). Специальная экстренная профилактика и этиотропная терапия инфекции проводится уже в соответствии с установленной антибиотикограммой возбудителя, включающей данные о чувствительности к антибактериальным препаратам I и II групп.

К АБП I группы относят антибиотики, наиболее эффективные при данной инфекции, вызванной антибиотикочувствительными типичными штаммами возбудителя. Чувствительность к этим препаратам определяют в первую очередь для обоснования специальной экстренной профилактики и этиотропной терапии инфекции. В число таких АБП обычно включены и препараты, используемые для целей общей экстренной профилактики.

К дополнительным (II группа) АБП относят антибиотики, которые могут быть альтернативой препаратам I группы в случае регистрации к ним устойчивости, а также использоваться для получения антибиотикограмм выделенных штаммов возбудителя в рамках эпидемиологического надзора за чувствительностью определенного вида микроорганизма.

Результаты определения чувствительности микроорганизмов к препаратам I группы дают минимальную информацию для назначения рациональной этиотропной терапии или профилактики инфекции, вызванной исследуемым патогеном. Информативность полученных данных значительно возрастает за счет включения в исследование препаратов II группы. При этом прогнозирование клинической эффективности используемых АБП по результатам определения фенотипа (антибиотикограммы) уступает по информативности данным определения особенностей генотипа (набора детерминант резистентности) патогена.

При составлении наборов АБП в МУК 4.2.2495-09 учтены закономерности перекрестной резистентности бактерий к различным представителям одной группы. Так, для определения чувствительности к фторхинолонам достаточно воспользоваться только ципрофлоксацином (или офлоксацином, или пefлоксацином и др.); к цефалоспорином III поколения – цефтриаксоном (или цефотаксимом, или цефтазидимом).

В практической работе, как правило, генотипирование изолятов не проводится. Однако оно может быть заменено определением чувствительности микроорганизмов к АБП, являющимся маркерами того или иного механизма устойчивости. Например, оксациллин (метициллин) используется в качестве маркера устойчивости *Staphylococcus spp.*, связанной с наличием гена резистентности (*mecA*) ко всем бета-лактамам антибиотикам (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы). Цефтазидим может служить маркером продукции бета-лактамаз расширенного спектра исследуемых микроорганизмов. Цефокситин используется для дифференциации продуцентов БЛРС и Amp C.

## **МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

### **Общая характеристика методов**

Разработан ряд методов определения чувствительности бактерий к АБП: методы серийных разведений и диффузионные. В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или в бульоне. В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют методы серийных макро- и микроразведений. Основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и E-тест.

Для определения чувствительности возбудителей ООИ к АБП используют только метод серийных разведений препаратов в плотной питательной среде (МСР) и диско-диффузионный метод (ДДМ). Однако в лабораториях ФБУЗ ЦГиЭ, СПЭБ, противочумных станций допускается применение только диско-диффузионного метода.

Мерой чувствительности бактерий при использовании МСР является минимальная концентрация АБП, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма (МПК).

В соответствии с МУК 4.2.1890-04 исследуемые микроорганизмы по результатам изучения их антибиотикограмм относят к одной из трех категорий:

- чувствительный – рост и размножение бактерий подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых дозах и схемах применения. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, обычно эффективно;

- промежуточный – МПК АБП в отношении штаммов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достигаемых при максимально допустимых режимах дозирования. Лечение инфекции, вызванной микроорганизмом, относящимся к этой категории, может быть эффективным при применении АБП в повышенных дозах, однако не исключен отбор вариантов возбудителя, характеризующихся более высоким значением МПК, сопровождающихся отсутствием эффекта антибиотикотерапии;

- устойчивый – рост штаммов не подавляется при концентрациях АБП, создающихся в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Использование АБП, к которому культура микроорганизмов устойчива, недопустимо.

Оценка антибиотикочувствительности, независимо от конкретно-го метода, предполагает последовательное выполнение нескольких этапов:

- приготовление питательных сред (приложение 2);
- приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма) (приложение 3);
- инокуляция;
- инкубация;
- учет и интерпретация результатов (приложение 5), формулировка рекомендаций по лечению.

Диффузионные методы включают также этап наложения дисков или полосок Е-теста на плотную питательную среду.

При тестировании антибиотикочувствительности патогенов необходимо использовать специальные проверенные среды, стандартную микробную взвесь, наборы АБП для бактерий каждого вида. Обязательным является контроль роста культуры на среде без АБП и чистоты использованной в работе суспензии микроорганизма путем высева на неселективные среды. Параллельно контролируют качество исследования (сред и АБП) с использованием соответствующих референтных штаммов микроорганизмов (см. приложения).

### **Метод серийных разведений**

Метод серийных разведений, как в бульоне, так и в агаре, относится к категории количественных, поскольку позволяет непосредственно

определять минимальную подавляющую концентрацию антибактериального препарата.

Общим и крайне важным этапом для всех методов серийных разведений является приготовление растворов АБП. Различают «основные» растворы АБП (пригодные для хранения) и «рабочие» – те, которые необходимо использовать «*ex tempore*» для приготовления питательных сред.

Для приготовления основных растворов АБП необходимо использовать субстанции АБП с известной активностью. При отсутствии субстанций в экстренных случаях допускается использование препаратов в виде мелкодисперсных порошков, инъекционных форм препаратов. АБП взвешивают на электронных лабораторных весах с точностью до 4-го знака. Объем растворителя должен соответствовать количеству активного вещества в навеске. Расчет навески АБП для приготовления основного раствора проводят по формуле:

$$m_{\text{АБП теор.}} = \frac{C \times V_{\text{теор.}}}{A}$$

где  $m_{\text{АБП теор.}}$  – расчетная (теоретическая) навеска АБП, мг;

$C$  – необходимая концентрация АБП, мкг/мл

$V_{\text{теор.}}$  – объем растворителя для растворения теоретической навески, мл;

$A$  – активность АБП (количество активного вещества, содержащегося в субстанции), мкг/мг.

Взвесить точно расчетное количество порошка практически невозможно. Поэтому готовят близкую к расчетной навеску, а затем пересчитывают количество необходимого растворителя.

$$V_{\text{практ.}} = \frac{m_{\text{АБП практ.}} \times V_{\text{теор.}} (\text{мл})}{m_{\text{АБП теор.}} (\text{мг})}$$

где  $V_{\text{практ.}}$  – объем растворителя для растворения практической навески, мл;

$m_{\text{АБП практ.}}$  – полученная навеска АБП, мг;

$m_{\text{АБП теор.}}$  – расчетная (теоретическая) навеска АБП, мг;

$V_{\text{теор.}}$  – объем растворителя для растворения теоретической навески, мл;

АБП различают по растворимости. Одни антибактериальные препараты растворяют в дистиллированной воде ( $\text{дН}_2\text{О}$ ), другие – специальными веществами (табл. 7).

Для растворения тетрациклинов, рифампицина, фуразолидона используют димексид, левомицетин растворяют в 96°-м спирте.

Приготовление основных растворов налидиксовой кислоты и фторхинолонов проводят в  $\frac{1}{2}$  от необходимого объема  $\text{дН}_2\text{О}$  добавлением по капле 0,1 М КОН до полного растворения препаратов с последующим доведением растворителя до расчетного объема.

Для измерения объемов растворов антибиотиков используют калиброванные дозаторы и пипетки. В тех случаях, когда растворители и разбавители – разные вещества, для солюбилизации антибиотика используют минимально возможные количества растворителя.

Оптимальными для использования являются антибиотики в растворимой форме (во флаконах, ампулах). Если во флаконе содержится 0,5 г препарата (стрептомицин, амикацин, канамицин, гентамицин, нетилмицин, тобрамицин, ампициллин, цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, цефепим, азтреонам, ципрофлоксацин, офлоксацин, пefлоксацин), то при добавлении 5 мл  $\text{дН}_2\text{О}$  или соответствующего растворителя получают раствор, содержащий 100 000 мкг/мл. Далее путем последовательных десятикратных разведений  $\text{дН}_2\text{О}$  получают растворы необходимых концентраций – 10 000, 1 000, 100, 10 мкг/мл.

Из раствора 10 000 мкг/мл путем разведения в 5 раз получают удобный для исследования рабочий раствор 2 000 мкг/мл. Для приготовления АБП в концентрации 256 мкг/мл необходимо к 2 мл рабочего раствора добавить 13,62 мл 0,9%-го разбавителя.

В таблице 8 представлена схема приготовления растворов АБП необходимой концентрации.

При отсутствии АБП в растворимой форме используют капсулы или таблетки (доксциклин, тетрациклин, ломефлоксацин, рифампицин, Ко-три-моксазол, налидиксовая кислота, левомецетин, цефтибутен, цефиксим и др.). Содержимое капсулы растворяют в димексиде (доксциклин, рифампицин) или щелочном растворе (налидиксовая кислота). Например, 0,1 г доксциклина растворяют в 10 мл димексида, получая концентрацию препарата 10 000 мкг/мл. Раствор налидиксовой кислоты готовят следующим образом: содержимое капсулы налидиксовой кислоты (500 мг) вносят в 25 мл  $\text{дН}_2\text{О}$ , добавляют по каплям 0,1 моль/л раствор NaOH до растворения АБП, затем приливают 25 мл  $\text{дН}_2\text{О}$ , получая раствор АБП концентрацией 10 000 мкг/мл.

Лекарственные препараты в таблетированной форме измельчают в ступке до порошкообразного состояния и растворяют в  $\text{дН}_2\text{О}$ , димексиде или 96°-м спирте. Расчет концентрации препаратов в растворе, если он готовится из таблетки или капсулы, производится с учетом содержания в них активного вещества. Например, если таблетка при весе 375 мг содержит 250 мг активного вещества, то для при-

готовления основного раствора с концентрацией АБП 10 000 мкг/мл необходимо ввести поправочный коэффициент, равный в данном случае 1,5 (375:250), т.е. следует отвесить 15 мг тщательно растертой таблетки и добавить 1 мл  $\text{дН}_2\text{О}$ .

Чувствительность к Ко-триметоприму (бисептолу, септрину), содержащему 400 мг сульфаметоксазола и 80 мг триметоприма (всего 480 мг), определяют исходя из содержания в таблетке триметоприма (таблетку растворяют в 8 мл  $\text{дН}_2\text{О}$ , получая раствор триметоприма в концентрации 10 000 мкг/мл).

Приготовление агара с АБП можно осуществить тремя способами:

1. Агар расплавляют на водяной бане, охлаждают до 50 °С, наливают 20 мл (если заранее не был разлит мерно) в стерильный мерный флакон и добавляют соответствующее количество рабочего раствора АБП, начиная с минимальной концентрации, тщательно перемешивают и выливают в чашку Петри. После застывания агар подсушивают.

В таблице 8 приведены объемы АБП в рабочих разведениях, которые вносят в 20 мл агара для получения в среде выращивания препарата нужной концентрации.

2. Агар расплавляют на водяной бане, охлаждают до 50 °С, наливают по 18 мл (если заранее не был мерно разлит) в стерильные флаконы, асептически вносят по 2 мл АБП в заранее приготовленных серийных разведениях и при необходимости – термолабильные питательные добавки. Тщательно перемешивают и выливают в промаркированные (АБП, доза) чашки Петри. После застывания агар подсушивают. Конечная концентрация АБП в агаре будет в 10 раз меньше, чем концентрация АБП, вносимого в среду.

3. Агар разливают мерно по 125 мл во флаконы и стерилизуют путем автоклавирования. В остуженный до 48–50 °С агар пипеткой добавляют основные растворы АБП по следующей схеме:

Агар (мл)	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
<i>Рабочие растворы АБП (мкг/мл)</i>												
	1:100				1:1000				1:10000			
АБП (мл)	0,155	0,31	0,62	1,25	0,25	0,5	1,0	2,0	0,4	0,8	1,6	3,2
<i>Конечная концентрация в агаре</i>												
мкг/мл	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0	64,0	128,0	256,0

## Диско-диффузионный метод

Диско-диффузионный метод определения чувствительности микроорганизмов к АБП основан на способности используемых препаратов, которыми пропитаны бумажные диски, диффундировать в питательную среду, подавляя рост посеянных на поверхность агара бактерий. Этот метод полуколичественный, менее чувствительный, чем метод стандартных разведений, но в практической работе бактериолога применяется чаще. Диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный). Следует учитывать, что скорость диффузии АБП в агар зависит от его структуры, молекулярной массы, наличия примесей, состава и рН используемой питательной среды.

Проверенный на пригодность с использованием эталонных антибиотикочувствительных штаммов (приложение 1) питательный агар разливают в чашки Петри (приложение 2).

Перед использованием свежеприготовленных чашек или после хранения в холодильнике (7–10 суток в запаянных полиэтиленовых пакетах) их необходимо подсушить при 37 °С (в течение 15 мин).

При определении чувствительности культур микроорганизмов с помощью ДДМ необходимо использовать только стандартизированные качественные диски производственного изготовления.

Каждую серию дисков с АБП контролируют с помощью референс-штаммов на соответствие заявленным концентрациям на питательной среде, прошедшей контроль качества. Диски, дающие диаметры зон ингибиции роста большие, чем допустимый диапазон значений для референс-культуры, выбраковываются, т.к. их использование может привести к отнесению антибиотикорезистентных штаммов к разряду чувствительных.

Проверенные на пригодность серии дисков с АБП хранятся до истечения срока годности в герметичной упаковке при –18 °С и ниже. Используемые в работе диски можно хранить в холодильнике (4–8 °С). Картриджи должны быть плотно упакованными, чтобы не допустить попадания в них влаги. Флаконы с дисками (картриджи) следует извлекать из холодильника за 1 ч до начала работы и открывать только по достижении ими комнатной температуры, предотвращая тем самым образование конденсата влаги на дисках после открывания картриджа.

Бактериальную суспензию необходимой концентрации (приложение 3) наносят на агаровую чашку Петри в объеме 0,2–0,3 мл и распре-



деляют равномерно по поверхности с помощью стерильного шпателя. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10–15 мин и затем наносят диски (не более 6 на чашку). Диски наносят стерильным пинцетом и слегка придавливают. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно составлять 15–20 мм (рис. 1).

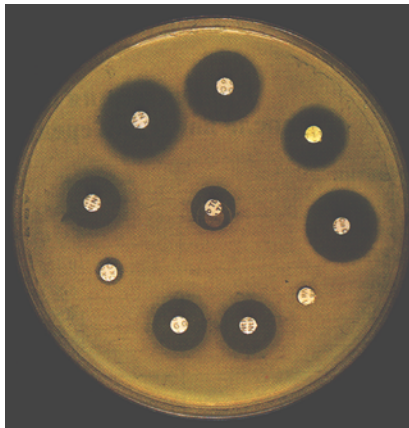


Рис. 1. Диско-диффузионный метод.

Чашки с посевом без дисков (контроль роста культуры) и с дисками инкубируют вверх дном 18–48 ч при температуре, оптимальной для роста изучаемого вида возбудителя (28, 37 °С). Параллельно с тестируемыми культурами необходимо проводить внутренний контроль качества исследования – определение чувствительности референс-штамма к используемым АБП. Учет результатов проводится только при наличии сливного роста культуры на чашках без дисков и соответствия величин зон ингибиции роста контрольных штаммов значениям, приведенным в соответствующих таблицах. Измерение диаметров зон полного подавления видимого роста производят кронциркулем, штангенциркулем, с помощью линейки-лекала (с точностью до 1 мм) на чашках, помещенных кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом 45°.

Появление колоний в зоне задержки роста микроорганизмов может свидетельствовать или о загрязнении культуры посторонней микрофлорой, или о гетерогенности тестируемой культуры по признаку чувствительности/устойчивости к данному антибиотику. И в одном, и в другом случаях исследование необходимо повторить с изучением чувствительности к АБП культур из колоний (если это не загрязнение), выросших в пределах диаметра зоны ингибиции роста. Интерпретацию результатов исследования следует провести с использованием таблиц, в которых даны пограничные значения диаметров зон ингибиции роста исследуемого микроорганизма конкретным АБП.

В паспорт каждой выделенной культуры необходимо вносить не только значение МПК, диаметров зон задержки роста, но и интерпретацию результатов исследований: штамм чувствительный, промежуточный или устойчивый.

Чашки с посевом без дисков (контроль роста культуры) и с дисками инкубируют вверх дном 18–48 ч при температуре, оптимальной для роста изучаемого вида возбудителя (28, 37 °С). Параллельно с тестируемыми культурами необходимо проводить внутренний контроль качества исследования – определение чувствительности референс-штамма к используемым АБП. Учет результатов проводится только при наличии сливного роста культуры на чашках без дисков и соответствия величин зон ингибиции роста контрольных штаммов значениям, приведенным в соответствующих таблицах.

Для одномоментного наложения дисков можно применить полуавтоматический диспенсер (рис. 2).

Вместо обычных одиночных дисков удобно применять специальные октодиски (*HiMedia*), представляющие собой комплекс из 8 дисков, радиально скрепленных в виде «ромашки». На октодиски нанесены АБП в разных комбинациях – для грамположительных, грамотрицательных бактерий, псевдомонад, возбудителей «мочевых» инфекций – с указанием концентрации препарата (рис. 3).

Для получения достоверных результатов определения чувствительности микроорганизмов к АБП диско-диффузионным методом необходимо строго соблюдать условия хранения и использования дисков.

Учет результатов исследования проводят после инкубации посевов в термостате и точного (до 1 мм) измерения в отраженном свете диаметров зон задержки роста культуры. При измерении следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста, не обращая внимания на мелкие колонии (за исключением анализов со стафилококками). Наличие крупных колоний в зоне просветления свидетельствуют о загрязнении изучаемой культуры посторонней микрофлорой или о гетерорезистентности популяции культуры. При исследовании роящихся культур протeya зона подавления роста может быть затянута вуалеобразной пленкой, которая не мешает учету результатов. После измерения диаметров зон задержки роста по специальным таблицам определяют степень чувствительности выделенной культуры к тому или иному АБП.

Существует линейная связь между логарифмом МПК, определяемой



Рис. 2. Диспенсер на 8 картриджей.

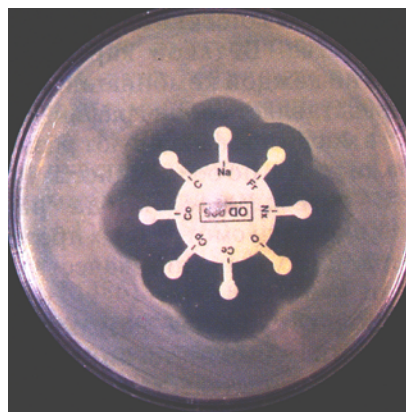


Рис. 3. Октодиск.

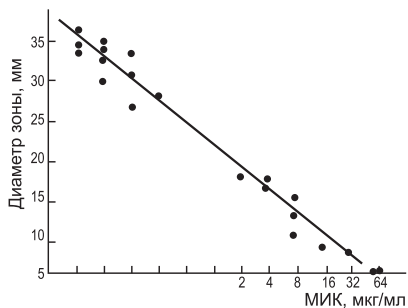


Рис. 4. Взаимосвязь между  $\log$  МПК и зоной задержки роста при ДДМ.

на одном принципе – сравнении величины МПК для данного патогена со средней концентрацией препарата в крови (или месте локализации возбудителя). Различие состоит в том, что в первом случае МПК определяют непосредственно в опыте, а во втором случае определяют величину зоны задержки роста как эквивалент МПК.

### Е-тест

Е-тест является модификацией диско-диффузионного метода определения чувствительности бактерий к АБП. Материал для Е-теста представляет собой полимерные полоски ( $6,0 \times 0,5$  см), пропитанные АБП в убывающих концентрациях (128, 64, 32, 16, 8, 4 ... мкг/мл). На наружной поверхности полосок типографским способом нанесены символ используемого АБП и его концентрации.

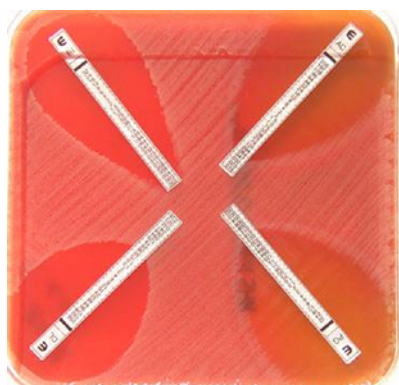


Рис. 5а. Е-тест.

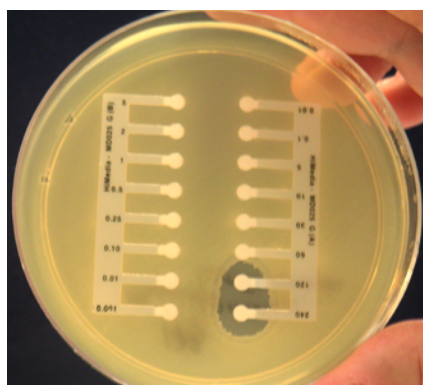


Рис. 5б. Е-тест.

методом серийных разведений, и диаметром зоны задержки роста при использовании ДДМ (рис. 4). Следовательно, по диаметру зоны можно определить степень чувствительности микроорганизмов к тому или иному антибиотику: чувствительные (S), резистентные (R) и промежуточные (I).

Таким образом, определение антибиотикочувствительности методами серийных разведений и диско-диффузионным основано

Полимерные полоски для Е-теста, как и диски при ДДМ, укладывают на поверхность стандартного питательного агара, засеянного испытуемой культурой. После инкубирования в термостате вокруг полоски формируется эллипсоидная зона задержки роста, которая сужается в области малых концентраций препарата и «пересекает» полоску на уровне, соответствующем величине МПК (рис. 5а).

Фирма «ХайМедиаЛабс» для постановки Е-теста выпускает стрипы *HiComb* (рис. 5б).

### **Метод пограничных концентраций**

Метод пограничных концентраций является разновидностью метода серийных разведений. Испытуемую культуру вносят в две пробирки, одна из которых содержит жидкую питательную среду с АБП в высокой (В), другая – в низкой (Н) концентрации. «В»-концентрация соответствует границе между резистентными и промежуточными по чувствительности штаммами, а «Н» – границе между промежуточными и чувствительными штаммами. Исследуемую культуру относят к чувствительной, если после инкубирования рост отсутствует в обеих пробирках; к промежуточной – рост отсутствует только в пробирке с концентрацией «В»; резистентной – наблюдается рост в обеих пробирках.

Метод пограничных концентраций характеризуется простотой выполнения и экономичностью, однако результаты исследования имеют полуколичественное выражение.

### **Автоматизированные методы**

При массовых исследованиях используют автоматизированные тесты определения чувствительности микроорганизмов к АБП. Это позволяет ускорить и упростить проведение анализа. Чаще применяют методы серийных разведений и пограничных концентраций (микрометоды). В работе используют готовые стерильные 96-луночные планшеты, в лунки которых внесены лиофильно высушенные в бульоне антибиотики в убывающих концентрациях. В контрольных пробах антибиотик отсутствует. Стандартизированную суспензию испытуемой культуры в одинаковой дозе асептически вносят в лунки соответствующих рядов, планшеты закрывают крышкой, инкубируют при оптимальной температуре. Результаты учитывают по наличию или отсутствию роста культуры в лунках с различными концентрациями антибиотиков. Последняя лунка с задержкой роста (прозрачное содержимое) соответствует МПК антибиотика в отношении тестируемой культуры.

Учет результатов можно проводить как визуально, так и с помощью микробиологических анализаторов. Последние позволяют автоматизи-

зировать внесение культуры в лунки, инкубирование, встряхивание, определение оптической плотности (степени мутности) жидкости в лунке, графически отображать полученные результаты, определять степень чувствительности возбудителей к АБП и печатать протокол анализа.

Такие фирмы, как «SY-LAB» (Австрия), «BioMerieux» (Франция), для идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к антибиотикам выпускают автоматизированную систему «Микро Такс» и автоматический анализатор «Vitek 2 Compact». При этом определяются минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибиотиков, выражающиеся в мг/л. Результаты определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам интерпретируются как «устойчив», «чувствителен», «умеренно устойчив».

### **Выявление бета-лактамаз расширенного спектра у бактерий семейства *Enterobacteriaceae***

Одним из основных механизмов резистентности к антибактериальным средствам является способность микроорганизмов к синтезу ферментов, инактивирующих АБП, в частности, бета-лактамаз, разрушающих бета-лактамное кольцо пенициллинов, цефалоспоринов и других бета-лактамов. Бета-лактамазы, продуцируемые бактериями разных видов, различаются по специфичности действия в отношении разных пенициллинов и цефалоспоринов. При конструировании новых АБП с целью преодоления устойчивости к бета-лактамам использован принципиально новый подход – поиск антибиотиков, разрушающих или инактивирующих бета-лактамазы.

Мощным ингибитором бета-лактамаз 2, 3, 4 и 5-го классов оказалась клавулановая кислота, которая, являясь слабым антибиотиком, способна инактивировать бета-лактамазы. На основе амоксициллина – пенициллина широкого спектра действия – и клавулановой кислоты синтезирован комбинированный антибиотик – аугментин. Другим комбинированным препаратом является сулациллин (ампициллин и ингибитор бета-лактамаз – сульбактам).

При определении чувствительности к АБП представителей семейства *Enterobacteriaceae*, которые являются одними из ведущих этиологических агентов внебольничных и нозокомиальных инфекций, необходимо выявлять штаммы, продуцирующие БЛРС. Для детекции БЛРС используют метод скрининга и подтверждающие тесты в отношении подозрительных штаммов (фенотипический метод). Скрининг не предполагает проведения специальных исследований, а основывается на анализе имеющихся данных тестирования штаммов. Для получения

достоверных результатов скрининга минимальный набор АБП должен включать как минимум три цефалоспорины третьего поколения: цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидин.

Все фенотипические тесты для подтверждения продукции БЛРС являются вариантами стандартных методов определения чувствительности к антибиотикам и основаны на ингибиции БЛРС клавулановой кислотой.

При постановке ДДМ применяют стандартные диски, содержащие цефотаксим (30 мкг), цефтазидим (30 мкг) или цефподоксим (10 мкг), а также диски, содержащие комбинации: цефотаксим + клавуланат (30/10 мкг) или цефподоксим + клавуланат (10/10 мкг). Различия в диаметрах зон подавления роста при использовании дисков с цефподоксином/клавулановой кислотой и цефподоксином на 6 мм и более, а дисков с цефотаксимом/клавулановой кислотой и цефотаксимом, цефтазидимом/клавулановой кислотой и цефтазидимом – на 5 мм и более свидетельствует о продукции штаммами БЛРС. Достоверность исследования контролируют штаммом *E. coli*, не продуцирующим бета-лактамаз (отрицательный контроль), и штаммом *K. pneumoniae*, продуцирующим БЛРС (положительный контроль).

Кроме фенотипического метода детекции БЛРС штаммами представителей семейства *Enterobacteriaceae*, для рутинной практики приемлем метод «двойных дисков». Последний позволяет выявить диско-диффузионным методом продукцию БЛРС по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с каким-либо цефалоспорином третьего поколения, размещенного напротив диска с клавулановой кислотой. Синергизм отмечается на участке пересечения зон диффузии двух дисков, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга. Особенностью метода является то, что через 5–10 мин после нанесения стандартной взвеси исследуемого штамма на поверхности агара на определенном расстоянии размещают диски с АБП. Центральное положение занимает диск, содержащий клавулановую кислоту (амоксициллин/клавуланат, 20/20 мкг), по периферии от него на расстоянии 20 и 30 мм между центрами располагают диски с цефтазидином (30 мкг) и цефотаксимом (30 мкг). Использование двух дисков каждого АБП, расположенных на разном расстоянии (20 и 30 мм) от диска с клавуланатом, позволяет повысить эффективность обнаружения БЛРС.

Если штамм продуцирует БЛРС, зона подавления роста вокруг диска с цефалоспорином третьего поколения «вытянута» в сторону диска с амоксициллин/клавулановой кислотой (рис. 6). Параллельно с опытными тестируют контрольные штаммы.

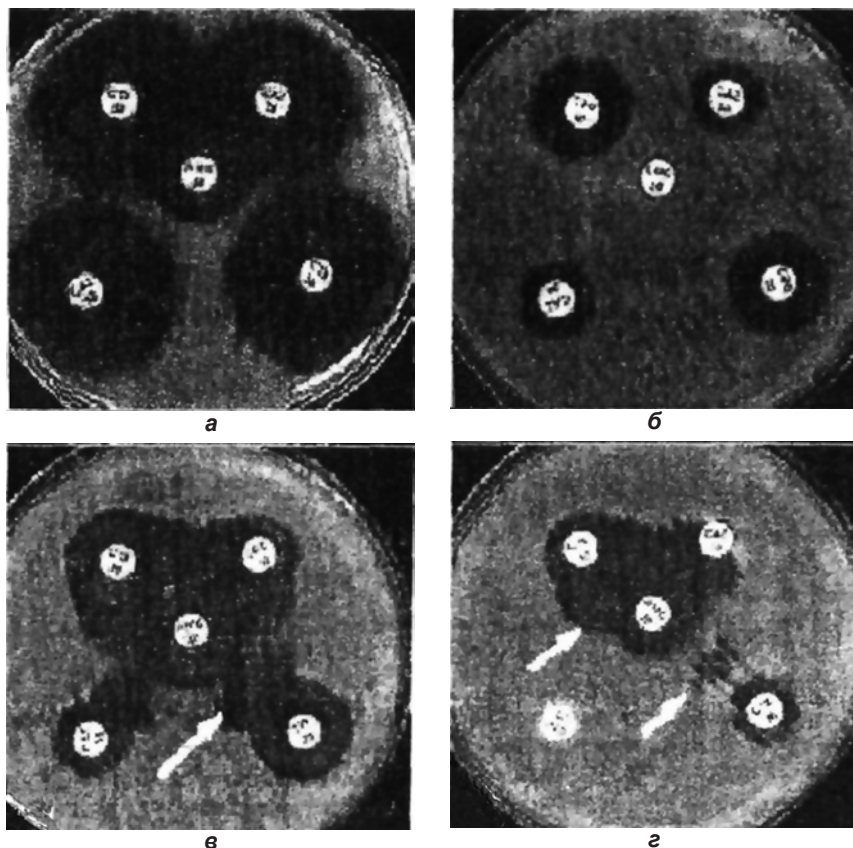


Рис. 6. Выявление продукции БЛРС с помощью метода «двойных дисков». Отрицательные результаты: **а** – *E. coli* (БЛРС–); **б** – *E. cloacae* (гиперпродукция AmpC). Положительные результаты: **в, г** – *K. pneumoniae* (БЛРС+). Обозначения дисков: AmpC – амоксициллин/клавулановая кислота (20/10 мкг); CAZ – цефтазидим (30 мкг); CTX – цефотаксим (30 мкг); CPO – цефпиром (30 мкг).

Ни один из методов не обеспечивает выявление БЛРС в 100 % случаев. Более того, при наличии у микроорганизмов нескольких детерминант устойчивости исследование затрудняется. Например, при продукции БЛРС и гиперпродукции хромосомных бета-лактамаз класса С устойчивость последних к клавулановой кислоте маскирует выработку БЛРС.

## Выявление резистентности стафилококков к метициллину и другим бета-лактамам антибиотикам

Метициллинрезистентные стафилококки и, прежде всего, метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA) являются одними из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций. Резистентность стафилококков к метициллину (оксациллину) может быть обусловлена:

- продукцией дополнительного пенициллинсвязывающего белка – ПСБ2а (фермента, участвующего в синтезе клеточной стенки), кодируемого хромосомальным геном *mecA* – классическая или истинная резистентность к метициллину (оксациллину);
- гиперпродукцией бета-лактамаз;
- модификацией обычных ПСБ (1, 2, 4).

Важно различать штаммы с классической (*mecA*-обусловленной) резистентностью от штаммов с двумя другими механизмами резистентности, которые обуславливают низкий или пограничный уровень устойчивости. При инфекциях, вызванных штаммами с классической резистентностью, терапия бета-лактамами антибиотиками (пенициллинами, цефалоспорины, карбапенемами) неэффективна. Кроме того, эти изоляты могут быть резистентны к антибиотикам других классов. В отличие от штаммов с классической резистентностью, гиперпродуценты бета-лактамаз и штаммы с мутациями нормальных ПСБ обычно не имеют множественной резистентности к другим антибиотикам. Штаммы с *mecA*-обусловленной резистентностью могут быть гомогенными или гетерогенными по типу экспрессии резистентности. При гомогенном типе экспрессии практически все микробные клетки проявляют резистентность в стандартных тестах *in vitro*, при гетерогенном типе резистентны лишь единичные клетки (1 из 10–100 млн.), что ведет к получению пограничных результатов при определении чувствительности к оксациллину (МПК 2–8 мг/л). Резистентность, обусловленная гиперпродукцией бета-лактамаз и мутацией ПСБ, также приводит к получению пограничных значений МПК.

Резистентность к оксациллину, обусловленную гиперпродукцией бета-лактамаз, можно отличить от классической по обратимости резистентности при использовании ингибиторов бета-лактамаз. Наличие классической резистентности у изолятов (*S. aureus*) выявляют методом скрининга на агаре. Однако при получении сомнительных результатов исследования, а также для штаммов, выделенных от пациентов с клинически не эффективной терапией, проводят развернутое исследование с определением МПК оксациллина и непосредственное определение наличия гена *mecA* молекулярно-генетическими методами (например, с помощью полимеразной цепной реакции). Кроме того, разработан коммерческий метод выявления ПСБ2а в реакции агглютинации.



## ЗАНЯТИЕ 1

### 1-й день

#### 1. Определение антибиотикочувствительности энтеробактерий диффузионными методами (дисками и в Е-тесте).

##### 1.1. Диско-диффузионный метод.

1.1.1. Агар Мюллера – Хинтона (или АГВ) готовят из сухой основы согласно инструкции изготовителя и разливают в чашки Петри таким образом, чтобы толщина агарового слоя составила 4 мм. Перед розливом среды чашки Петри помещают на строго горизонтальную поверхность. Среда должна быть такого качества, чтобы зоны задержки роста референс-штаммов соответствовали пределам, указанным в таблице 2.

1.1.2. После застывания поверхность агара подсушивают при температуре 37 °С, приоткрыв крышки.

1.1.3. Изучаемую культуру, выращенную в течение 16–24 ч на не-селективном агаре из 3-5 однотипных колоний, суспендируют в 0,9%-м растворе хлористого натрия. Стандартизацию суспензии проводят по оптическому стандарту мутности (ОСО) ГИСК им. Л.А. Тарасевича 5 ед., что соответствует  $- 5 \times 10^8$  м.к. ( $\sim 1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл). Инокулюм следует использовать в течение 15 мин после приготовления.

1.1.4. Приготовленный инокулюм наносят стерильной пипеткой на поверхность среды в объеме 0,2–0,3 мл. Равномерно распределяют по поверхности агара шпателем.

Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре не более 10–15 мин.

1.1.5. Заранее подобранные диски с антибиотиками (табл. 1) наносят на засеянную чашку с помощью стерильного пинцета (не более 6 дисков на одну чашку Петри). Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно составлять 15–20 мм.

Каждый диск после наложения на поверхность среды, засеянной культурой, не сдвигая, аккуратно прижимают пинцетом.

1.1.6. Чашки с посевом без дисков (контроль роста культуры) и с дисками инкубируют вверх дном 18–48 ч при температуре, оптимальной для роста изучаемого вида возбудителя. Увеличение интервала времени между наложением дисков на поверхность агара и началом инкубации приводит к «преддиффузии» АБП в агар и к увеличению диаметра зоны подавления роста, что искажает результаты исследования.

##### 1.2. Постановка Е-теста.

1.2.1. Выполняют подготовительную работу согласно п.п. 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4.

1.2.2. Заранее подобранные полимерные полоски с АБП для Е-теста с помощью стерильного пинцета накладывают на засеянную чашку Петри. Полоски размещают на агаре радиально (от центра к периферии чашки), слегка прижимают их к среде, не сдвигая.

1.2.3. Посевы инкубируют при температуре 35–37 °С в течение 18–24 ч.

### Материалы и оборудование

Суточная культура возбудителей кишечных инфекций: <i>Shigella</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. или <i>Escherichia</i> spp. ....	1 пробирка
Агар Мюллера-Хинтона (М 173) или АГВ .....	100 мл
Чашки Петри (диаметр 100 мм) .....	4 шт.
Бактериологическая пробирка .....	1 шт.
0,9%-й раствор хлористого натрия .....	20–30 мл
Оптический стандарт мутности (ОСО) 5 ед. ....	1 шт.
Пипетка стерильная объемом 1–2 мл .....	2 шт.
Пинцет хирургический .....	1 шт.
Спирт этиловый .....	50 мл
Измерительная линейка, штангенциркуль или кронциркуль .....	1 шт.

#### *Диски с антибиотиками:*

Ампициллин 10 мкг .....	2 шт.
Ко-тримоксазол 1,25/23,75 мкг .....	2 шт.
Тетрациклин 30 мкг .....	2 шт.
Ципрофлоксацин 5 мкг .....	2 шт.
Хлорамфеникол 30 мкг .....	2 шт.
Цефотаксим 30 мкг .....	2 шт.
Полимерные полоски с вышеперечисленными АБП для Е-теста .....	12 шт.

## ЗАНЯТИЕ 2

### 2-й день

#### 1. Определение антибиотикочувствительности энтеробактерий диффузионными методами (дисками и в Е-тесте).

1.1. Диско-диффузионный метод.

1.1.7. Учитывают результаты определения антибиотикочувствительности изучаемой культуры. Учет результатов проводится только

при наличии сливного роста культуры на чашках без дисков. Измерение диаметров зон полного подавления видимого роста производят с помощью линейки-лекала (с точностью до 1 мм) на чашках, помещенных кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом 45°. Рост культуры должен быть сливной или почти сливной, а зоны задержки роста – четкими, с отсутствием видимого роста. Измеряют и записывают диаметр зоны ингибиции роста (включая диаметр диска) в миллиметрах.

1.1.8. Проводят интерпретацию результатов в соответствии с предельными размерами диаметров зон задержки роста для чувствительных, промежуточных и резистентных штаммов (табл. 3).

1.2. Постановка Е-теста.

1.2.4. Учитывают результаты определения антибиотикочувствительности изучаемой культуры в Е-тесте. Оценивают характер роста культуры в коспроходящем свете. Рост культуры должен быть сливной, а зоны задержки роста (при положительном результате) – в виде эллипсов, которые сужаются в области малых концентраций АБП и пересекают полоску Е-теста на уровне, соответствующем величине МПК.

1.2.5. Проводят интерпретацию результатов определения МПК согласно таблице 3.

## ЗАНЯТИЕ 3

### 1-й день

#### **2. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в бульоне (на примере неферментирующих бактерий).**

При тестировании неферментирующих бактерий (НФБ) необходимо учесть, что ДДМ стандартизован лишь для *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.* В связи с этим, изучая *Pseudomonas spp.* и другие НФБ, следует использовать метод серийных разведений в бульоне или агаре.

2.1. Готовят 2-кратные разведения антибиотиков 1-го ряда в 0,5 мл бульона, учитывая фактор последующего разбавления при титрации АБП и добавлении исследуемой культуры. В серии разведений обязательно должны быть представлены пограничные концентрации и допустимые диапазоны МПК для контрольных штаммов.

Антибиотик	Концентрация (мкг/мл)
Амикацин	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
Цефтазидим	1, 2, 4, 8, 16, 32
Цефепим	1, 2, 4, 8, 16, 32
Имипенем	1, 2, 4, 8, 16
Гентамицин	0,5; 1, 2, 4, 8, 16
Ципрофлоксацин	0,25; 0,5; 1, 2, 4

2.1.1. Основные растворы (2000,0 мкг/мл) выше перечисленных антибиотиков разводят в питательном бульоне до концентрации рабочих разведений:

Амикацин	256 мкг/мл
Цефтазидим	128 мкг/мл
Цефепим	128 мкг/мл
Имипенем	64 мкг/мл
Гентамицин	64 мкг/мл
Ципрофлоксацин	16 мкг/мл

2.1.2. В стерильные пробирки разливают по 0,5 мл питательного бульона. Для амикацина – семь, цефтазидима, цефепима и гентамицина – шесть, имипенема и ципрофлоксацина – пять пробирок, для «отрицательного» контроля – одну пробирку.

2.1.3. Антибиотики, отобранные по 0,5 мл в рабочем разведении, титруют последовательно в питательном бульоне до последней пробирки, меняя пипетки на каждом «шаге». Из последней пробирки удаляют 0,5 мл бульона. Отрицательным контролем служит пробирка без АБП.

2.2. Готовят суспензию (инокулюм) исследуемой культуры (*Pseudomonas* spp.).

2.2.1. Суточную культуру, выращенную на плотной питательной среде из нескольких однотипных колоний, суспендируют в 0,9%-м растворе хлористого натрия или питательном бульоне. Стандартизацию суспензии проводят по оптическому стандарту мутности (ОСО) ГИСК им. Л.А. Тарасевича 5 ед.

2.2.2. Приготовленную стандартизованную микробную взвесь разводят в 100 раз питательным бульоном (0,1 мл микробной взвеси и 9,9 мл бульона). Концентрация микроорганизмов в приготовленном инокулюме составит  $\approx 10^6$  КОЕ/мл.

2.2.3. Инокулюм используют не позднее 15 мин после приготовления.

2.3. В каждую пробирку с АБП и «отрицательным» контролем вносят по 0,5 мл тестируемого инокулюма.

2.4. Пробирки инкубируют в обычной атмосфере при 35 °С в течение 20–24 ч.

2.5. Пробирку с отрицательным контролем помещают в холодильник при 4 °С до учета результатов исследования.

**Примечание:**

Параллельно с исследуемой культурой тестируют контрольный штамм (в данном случае *P. aeruginosa* ATCC 27853). Диапазон концентраций АБП: амикацин, цефтазидим, имипенем – 1, 2, 4 мкг/мл; цефепим – 1, 2, 4, 8 мкг/мл; гентамицин – 0,5; 1,2 мкг/мл; ципрофлоксацин – 0,25; 0,5; 1 мкг/мл (табл. 4).

**Материалы и оборудование**

Суточная агаровая культура <i>Pseudomonas</i> spp. ....	1 пробирка
Питательный бульон .....	20 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия .....	20 мл
Оптический стандарт мутности (ОСО) 5 ед. ....	1 набор
Бактериологическая пробирка (стерильная) .....	50 шт.
Пипетка стерильная 1–2 мл .....	50 шт.
Пипетка стерильная 5 мл .....	2 шт.
Спирт этиловый .....	50 мл
Основные растворы антибиотиков (2000,0 мкг/мл)	
Амикацин .....	2 мл
Цефтазидим .....	2 мл
Цефепим .....	2 мл
Имипенем .....	2 мл
Гентамицин .....	2 мл
Ципрофлоксацин .....	2 мл

**ЗАНЯТИЕ 4**

**2-й день**

**2. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в бульоне (на примере неферментирующих бактерий).**

2.6. Учет и интерпретация результатов исследования.

2.6.1. Пробирки с посевами просматривают в проходящем свете, сравнивая рост культуры в присутствии АБП с «отрицательным» контролем.

МПК каждого антибиотика определяют по наименьшей концентрации препарата, при которой подавляется видимый рост тестируемой культуры (бульон прозрачный).

2.6.2. Согласно таблице 6, исследуемую культуру относят к резистентной, чувствительной или промежуточной категориям к тому или иному из испытанных антибиотиков.

Результаты исследования считаются достоверными, если при определении чувствительности к АБП контрольного штамма получены значения МПК, которые соответствуют его паспортной характеристике.

## ЗАНЯТИЕ 5

### 1-й день

#### 3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в агаре (на примере возбудителей кишечных инфекций сем. *Enterobacteriaceae*).

3.1. Готовят агар Мюллера – Хинтона в соответствии с инструкцией изготовителя, разливают по 18 мл во флаконы (число флаконов зависит от количества используемых в работе доз АБП, тестируемых и контрольных штаммов) и автоклавируют.

3.2. Готовят двукратные разведения ампициллина, ципрофлоксацина (препараты первого ряда) и хлорамфеникола (из числа дополнительных препаратов), учитывая фактор последующего разбавления (в два раза) при титрации и добавлении агара (в 10 раз).

В серии конечных разведений АБП в приготовленном для работы агаре должны быть представлены пограничные концентрации препаратов для тестируемых штаммов и допустимые диапазоны МПК для контрольных штаммов (табл. 2, 3):

- для тестируемой культуры
  - ампициллин – 4–64 мкг/мл
  - ципрофлоксацин – 0,5–8 мкг/мл
  - хлорамфеникол – 4–64 мкг/мл
- для контрольного штамма (*E. coli* ATCC 25922)
  - ампициллин – 1–16 мкг/мл
  - ципрофлоксацин – 0,002–0,032 мкг/мл
  - хлорамфеникол – 1–16 мкг/мл

3.2.1. Готовят основные растворы вышеперечисленных АБП и разводят их до рабочей концентрации:

- для тестируемой культуры
  - ампициллин – 1280 мкг/мл
  - ципрофлоксацин – 160 мкг/мл
  - хлорамфеникол – 1280 мкг/мл
- для контрольного штамма
  - ампициллин – 320 мкг/мл
  - ципрофлоксацин – 0,64 мкг/мл
  - хлорамфеникол – 320 мкг/мл

3.2.2. Разливают по 3 мл питательного бульона в 30 стерильных пробирок.

3.2.3. Каждый антибиотик, взятый в рабочем разведении, титруют по 3 мл в пяти пробирках. Пипетки меняют на каждом «шаге».

3.3. Готовят агар с АБП.

3.3.1. Расплавляют на водяной бане при 48–50 °С агар Мюллера – Хинтона.

3.3.2. Асептически вносят во флакон с 18 мл агара по 2 мл АБП в приготовленных разведениях. Тщательно перемешивают и выливают в предварительно маркированную чашку Петри.

Чашку ставят на строго горизонтальную поверхность, не передвигают и не переносят до полного остывания агара.

3.4. Разливают агар Мюллера – Хинтона в две чашки Петри (для контроля роста тестируемого и контрольного штаммов).

3.5. Разливают неселективный агар в две чашки Петри (для контроля тестируемого и контрольного штаммов на «чистоту» роста).

3.6. Приготовленные чашки Петри используют немедленно. При необходимости допускается хранение агара в запаянных полиэтиленовых пакетах при 4–8 °С в течение 5 сут.

3.7. Готовят суспензии тестируемой культуры и контрольного штамма.

3.7.1. Суточные культуры, выращенные на плотной питательной среде из нескольких однотипных колоний, суспендируют в 0,9%-м растворе хлористого натрия. Стандартизацию суспензии проводят по оптическому стандарту мутности (ОСО) ГИСК им. Л.А. Тарасевича 5 ед., что соответствует  $\sim 1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

3.7.2. Разводят приготовленные стандартизированные микробные взвеси в 10 раз 0,9%-м раствором хлористого натрия (0,5 мл взвеси и 4,5 мл раствора NaCl). Концентрация микроорганизмов в приготовленных инокулюмах составит  $\approx 10^7$  КОЕ/мл. Полученную суспензию используют в течение 15 мин после приготовления.

3.8. Проводят инокуляцию тестируемой культуры и контрольного штамма.

3.8.1. Приготовленные микробные взвеси инокулируют на поверхность агара с АБП и без антибиотика, используя стандартные бактериологические петли диаметром 3,0 мм.

3.8.2. Взвеси тестируемой культуры и контрольного штамма засевают бактериологической петлей на неселективный агар для получения изолированных колоний.

3.8.3. При анализе большого числа штаммов микроорганизмов можно пользоваться металлическими репликаторами. Число стержней на репликаторе достигает 36–50. Основание репликатора содержит соответствующее количество углублений.

Стерильное основание репликатора помещают в кювету на марлевую салфетку, смоченную дезраствором. В каждую лунку пластины-основания с помощью микропипетки вносят взвесь тестируемой культуры и контрольного штамма согласно заранее нарисованной на бумаге схеме. Каждой исследуемой культуре соответствует определенный номер квадрата на схеме и на засеянной чашке. Достают из стерилизатора репликатор, осторожно опускают стержни в лунки с культурами и переносят репликатор на поверхность агара. Заранее на донышко чашек Петри слева сверху делают пометку, соответствующую номеру первой тестируемой культуры.

Таким образом, засевают все взятые в анализ чашки Петри с агаром, содержащим АБП в различных концентрациях, и чашки агара без антибиотика. При необходимости в процессе работы в лунки репликатора добавляют исследуемые микробные взвеси.

3.8.4. После инокуляции чашки оставляют при комнатной температуре для подсыхания.

3.9. Инкубируют посевы при температуре 35 °С в течение 18–24 ч.

### Материалы и оборудование

Суточная агаровая культура <i>Shigella</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. или <i>Escherichia</i> spp. (тестируемая культура) . . . . .	1 пробирка
Суточная агаровая культура <i>E.coli</i> ATCC 25922 (контрольный штамм) . . .	1 пробирка
Агар Мюллера – Хинтона . . . . .	600 мл
Бульон мясо-пептонный . . . . .	150 мл
Агар мясо-пептонный . . . . .	50 мл
Чашка Петри стерильная . . . . .	34 шт.
Флакон стерильный (50 мл) . . . . .	32 шт.



Пробирка бактериологическая стерильная	50 шт.
Дистиллированная вода	100 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия	100 мл
Оптический стандарт мутности (ОСО) 5 ед.	1 набор
Пипетка стерильная 5 мл	70 шт.
Пипетка стерильная 2 мл	10 шт.
Пипетка стерильная 1 мл	10 шт.
Репликатор металлический	1 шт.
Микропипетка стерильная (количество зависит от числа тестируемых культур)	

*Основные растворы антибиотиков*

Ампициллин (100000 мкг/мл)	1 мл
Ципрофлоксацин (10000 мкг/мл)	1 мл
Хлорамфеникол (100000 мкг/мл)	1 мл

## ЗАНЯТИЕ 6

### 2-й день

#### **3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в агаре (на примере представителей семейства *Enterobacteriaceae*, возбудителей кишечных инфекций).**

3.10. Учет и интерпретация результатов исследования.

3.10.1. Просматривают посевы на чашках, поместив их на темную, не отражающую свет поверхность. За МПК принимают минимальную концентрацию АБП, при которой происходит полная ингибция видимого роста культуры.

3.10.2. Согласно таблице 4 относят тестируемую культуру к категории резистентная, чувствительная или промежуточная к тому или иному из испытанных АБП.

3.10.3. Результаты исследования считают достоверными при:

- наличии роста в виде «бляшек» тестируемого и контрольного штаммов на агаре без АБП;
- росте типичных однородных колоний тестируемого и контрольного штаммов на неселекционной среде (контроль «чистоты» культуры);
- значениях МПК контрольного штамма, соответствующих его паспортным характеристикам.

## ЗАНЯТИЕ 7

### 1-й день

#### 4. Выявление продукции БЛРС штаммами *Enterobacteriaceae* методом «двойных дисков» (на примере *Salmonella spp.*)

4.1. Выполняют работу по плану занятия 1 п.п. 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4.

4.2. Через 5–10 мин после инокуляции изучаемой культуры *Salmonella spp.* На поверхность агара стерильным пинцетом наносят диски: в центр – диск, содержащий амоксициллин/клавулановую кислоту, по периферии на расстоянии 20 мм и 30 мм от него – диски с цефтазидимом и цефотаксимом.

4.3. Аналогичным методом проводят тестирование контрольных штаммов: *E. coli* (БЛРС–) и *K. pneumoniae* (БЛРС+).

4.4. Посевы инкубируют при температуре 35 °С в течение 18–20 ч.

#### Материалы и оборудование

Суточная агаровая культура <i>Salmonella spp.</i> . . . . .	1 пробирка
Суточная агаровая культура <i>E.coli</i> (БЛРС –) . . . . .	1 пробирка
Суточная агаровая культура <i>K. pneumoniae</i> (БЛРС +) . . . . .	1 пробирка
Агар Мюллера – Хинтона . . . . .	3 чашки
Пробирка бактериологическая стерильная . . . . .	3 шт.
0,9%-й раствор хлористого натрия . . . . .	20–30 мл
Оптический стандарт мутности (ОСО) 5 ед. . . . .	1 набор
Пипетка стерильная 1–2 мл . . . . .	3 шт.
Пинцет хирургический . . . . .	1 шт.
Спирт этиловый . . . . .	50 мл

#### Диски с антибиотиками:

АМС – амоксициллин/клавулановая кислота (20–10 мкг) . . . . .	3 шт.
САЗ – цефтазидим (30 мкг) . . . . .	6 шт.
СТХ – цефатаксим (30 мкг) . . . . .	6 шт.

## ЗАНЯТИЕ 8

### 2-й день

#### 2. Выявление продукции БЛРС штаммами *Enterobacteriaceae* методом «двойных дисков».

4.5. Проводят учет и интерпретацию результатов исследования:

4.5.1. Оценивают характер роста культур и зон подавления роста в косопроходящем свете.

4.5.2. Если исследуемая культура продуцирует БЛРС, зона подавления роста вокруг дисков с цефалоспоринами (цефтазидим, цефотаксим), расположенных на расстоянии 30 мм, окажется «вытянутой» в сторону диска с амоксициллин/клавулановой кислотой или будет отсутствовать вообще. Вокруг дисков, размещенных на расстоянии 20 мм от диска с амоксициллин/клавулановой кислотой, зоны ингибиции роста могут быть равномерно округлой формы или также «вытянуты» в сторону диска с клавуланатом.

Аналогичная картина будет на чашке с посевом контрольного штамма *K. pneumonia* (БЛРС+). На чашке с посевом контрольного штамма *E. Coli* (БЛРС-) зоны ингибиции вокруг цефалоспоринов равномерно округлой формы (рис. 6).

## ЗАНЯТИЕ 9

### 1-й день

#### 5. Выявление резистентности бактерий к бета-лактамным антибиотикам методом скрининга.

5.1. Готовят агар Мюллера – Хинтона с добавлением 4%-го хлористого натрия (до автоклавирования) и 6 мг/л оксациллина или метициллина (после автоклавирования среды). Расчет концентрации антибиотика проводят с учетом его активности.

5.2. Разливают приготовленный агар в чашки Петри толщиной слоя 3–4 мм (на чашку диаметром 100 мм – 25 мл) на строго горизонтальной поверхности стола.

5.3. Разливают агар Мюллера – Хинтона без антибиотика (для контроля роста исследуемых культур).

5.4. Готовят бактериальные взвеси изучаемой культуры (*Staphylococcus* spp.) и контрольных штаммов (*S. aureus* ATCC 38591 – резистентный и *S. aureus* ATCC 29213 – чувствительный), выращенных из нескольких колоний с одинаковой морфологией в течение 18–24 ч на кровяном агаре. Доводят полученные бактериальные взвеси по оптическому стандарту мутности (ОСО) ГИСК им. Л.А. Тарасевича 5 ед., что соответствует  $\sim 1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

5.5. Проводят посев приготовленных взвесей (микропипеткой):

5.5.1. Разводят 1 : 100 стандартные инокулюмы (0,1 мл приготовленных стандартных суспензий и 9,9 мл стерильного 0,9%-го раствора хлористого натрия).

5.5.1.1. Микропипеткой наносят по капле (10 мкл) разведенной стандартной суспензии изучаемой культуры и контрольных штаммов на поверхность агара с антибиотиком и распределяют посев по поверхности агара путем покачивания чашек. Аналогичным способом засевают инокулюмы на агар без антибиотика.

5.5.1.2. Аналогичным методом засевают стандартизированные суспензии контрольных штаммов.

5.6. Штаммы *S. aureus* инкубируют в обычной атмосфере при 35 °С в течение 24 ч, а коагулазоотрицательных стафилококков – в течение 48 ч.

### Материалы и оборудование

18–24-час. культуры <i>Staphylococcus</i> spp., <i>S. aureus</i> ATCC 38591, <i>S. aureus</i> ATCC 29213 на косяках кровяного агара	.....	по 1 пробирке
Агар Мюллера – Хинтона с 4%-го хлористого натрия и 6 мкг/мл оксациллина или метициллина	.....	3 чашки
Агар Мюллера – Хинтона с 4 % хлористого натрия	.....	3 чашки
Пробирка бактериологическая стерильная	.....	6 шт.
0,9%-й раствор хлористого натрия	.....	50 мл
Оптический стандарт мутности (СО) 5 ед.	.....	1 набор
Микропипетка стерильная	.....	6 шт.
Спирт этиловый	.....	50 мл

## ЗАНЯТИЕ 10

### 2-й день

#### 5. Выявление резистентности бактерий к бета-лактамным антибиотикам методом скрининга.

5.7. Проводят учет и интерпретацию результатов исследования.

5.7.1. Видимый рост более одной колонии на месте нанесения исследуемой культуры и контрольного штамма *S. aureus* ATCC 38591 означает устойчивость к оксациллину (метициллину).

5.7.2. При отсутствии роста на месте нанесения исследуемой культуры и контрольного штамма *S. aureus* ATCC 29213 тестируемую культуру считают чувствительной к оксациллину (метициллину).

5.7.3. На агаре Мюллера – Хинтона без антибиотика все штаммы дают характерный рост.

5.7.4. При получении сомнительных результатов, а также для штаммов, выделенных от тяжело больных, необходимо провести развернутое исследование с определением МПК оксациллина (метициллина) и гена *mecA*.

### 5.8. Заключение:

Оксациллин (метициллин)-резистентные стафилококки расцениваются как устойчивые ко всем  $\beta$ -лактамам антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, комбинациям пенициллинов с ингибиторами  $\beta$ -лактамаз). Кроме того, среди оксациллин (метициллин)-резистентных стафилококков очень часто наблюдается ассоциативная устойчивость к другим антибиотикам (аминогликозидам, макролидам, фторхинолонам, тетрациклином).

## ЗАНЯТИЕ 11

### 1-й день

#### 6. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам с помощью системы автоматической идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибиотикам *Micro Tax SY-LAB*, Австрия.

Использование автоматической системы *Micro Tax* (рис. 7) значительно упрощает и ускоряет проведение микробиологических исследо-



Рис. 7. Общий вид комплекса приборов, системы автоматической идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибиотикам *Micro Tax SY-LAB*, Австрия (Идентификационные планшеты, планшеты *Micro Tax S* для определения чувствительности к антибиотикам, персональный компьютер, программное обеспечение, 8-канальный фотометр для планшетов *Micro Tax Reader MT-1*, 8-канальная электронная пипетка, инкубатор *MT-5*).

ваний, поскольку позволяет автоматизировать основные манипуляции бактериолога – внесение культуры в лунки планшета, инкубирование, встряхивание, измерение оптической плотности (степени мутности) жидкости в каждой лунке планшета. *Micro Tax* позволяет распечатывать результаты определения МПК антибиотика и *SIR* тестируемой культуры методом пограничных концентраций и в тесте серийных разведений.

### Этапы определения

#### 6.1. Приготовление инокулята.

6.1.1. Изучаемую культуру, выращенную в течение 18–24 ч на неселективном агаре, суспендируют в 3–5 мл 0,9%-го раствора хлористого натрия до мутности, соответствующей 5 ед. по оптическому стандарту мутности (ОСО) ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

6.1.2. При тестировании грамотрицательных бактерий 10 мкл приготовленной бактериальной суспензии переносят в 10 мл среды *Isosensitest* и перемешивают.

В программе *MCT-Software* код данного определения – «R»

6.1.3. При тестировании грамположительных бактерий 100 мкл приготовленной бактериальной суспензии переносят в 10 мл среды *Isosensitest* и перемешивают.

В программе *MCT-Software* код данного определения – «R»

6.1.4. При тестировании медленно растущих бактерий (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Neisseria gonorrhoeae*) 200 мкл приготовленной бактериальной суспензии переносят в 10 мл H-broth среды и перемешивают.

В программе *MCT-Software* код данного определения – «H»

#### 6.2. Внесение инокулята в *MicroTax S* планшет.

6.2.1. Приготовленную суспензию тестируемой культуры (из *Isosensitest* или H-broth сред) вносят в кювету для набора инокулята.

6.2.2. С помощью 8-канальной электронной пипетки раскапывают по 100 мкл бактериальной во все лунки планшета.

6.2.3. Планшет накрывают специальной перфорированной пленкой.

#### 6.3. Выращивание в инкубаторе МТ – 5.

6.3.1. Планшет помещают в инкубатор при 35–37 °С на 18–24 ч.

6.3.2. При изучении медленно растущих бактерий (планшеты с H-broth средой) выращивание проводят в атмосфере 5%-го CO<sub>2</sub>.

6.4. В *MCT-Software* согласно таксону выбирают список антибиотиков и вводят его в работу программы. В нашем случае для определения чувствительности к антибиотикам *E. coli* используют список антибиотиков № 3.

### Материалы и оборудование

Суточная культура возбудителей кишечных инфекций: <i>E. coli</i> . . . . .	1 пробирка
Бактериологическая пробирка . . . . .	2 шт.
0,9%-й раствор хлористого натрия . . . . .	20–30 мл
Оптический стандарт мутности (ОСО) 5 ед. . . . .	1 шт.
Пипетка стерильная объемом 1–2 мл . . . . .	2 шт.
Пинцет хирургический . . . . .	1 шт.
Спирт этиловый . . . . .	50 мл
<i>Isosensitest-среда фирмы SY-LAB</i> (Австрия) . . . . .	30 мл
<i>H-broth среда фирмы SY-LAB</i> (Австрия) . . . . .	30 мл
<i>Система автоматической идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибиотикам:</i>	
Идентификационный планшет <i>Micro Tax S</i> фирмы <i>SY-LAB</i> . . . . .	1 шт.
Персональный компьютер . . . . .	1 шт.
Программное обеспечение . . . . .	1 шт.
8-канальный фотометр для планшетов <i>Micro Tax Reader MT-1</i> . . . . .	1 шт.
8-канальная электронная пипетка . . . . .	1 шт.
Наконечники для пипетки одноразовые . . . . .	10 шт.
4-луночная кювета для набора инокулята . . . . .	1 шт.
Инкубатор <i>MT-5</i> . . . . .	1 шт.

## ЗАНЯТИЕ 12

### 2-й день

#### 6. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам с помощью системы автоматической идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибиотикам *Micro Tax SY-LAB*, Австрия.

##### 6.5. Считывание.

6.5.1. В компьютере выбирают программу *MCT-Software*.

6.5.2. Снимают покрывающую планшет пленку.

6.5.3. Тщательно протирают дно планшета (удаляют конденсат).

6.5.4. Следуя инструкции пользователя к прибору, проводят считывание.

6.5.5. Планшеты считывают на *MicroTax Rider* при 620 нм.

Контроль реакций:

Для исключения ошибки при инокулировании предусматривается один контроль роста культуры для каждого определения.

**Примечание:**

Определение *SIR* в тесте **Break-point**:

Если рост культуры отсутствует при минимальной и максимальной концентрациях антибиотика, бактерии считаются **чувствительными** к данному антибиотику (**S**).

Если рост культуры наблюдается только при минимальной концентрации антибиотика, то чувствительность бактерий к данному антибиотику является **промежуточной** (**I**).

Если рост культуры наблюдается при минимальной и максимальной концентрациях антибиотика, бактерии считаются **устойчивыми** к данному антибиотику (**R**).

**МПК** – минимальная концентрация антибиотика, которая ингибирует рост бактерий.

**Материалы и оборудование**

Спирт этиловый .....	50 мл
<i>Система автоматической идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибиотикам</i>	
Персональный компьютер .....	1 шт.
Программное обеспечение .....	1 шт.
8-канальный фотометр для планшетов <i>MicroTax Reader</i> MT-1 .....	1 шт.



## ТАБЛИЦЫ

Таблица 1

**Антимикробные средства для тестирования, в зависимости от природы этиологического агента инфекции**

Микроорганизмы	АБП первого ряда	АБП второго ряда
<b>Чума</b>	Стрептомицин Амикацин Гентамицин Доксициклин Ципрофлоксацин (или офлоксацин, пемфлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин) Цефтриаксон (или цефотаксим) Рифампицин Триметоприм/ сульфаметоксазол (по триметоприму)	Канамицин Нетилмицин Тобрамицин Тетрациклин Ампициллин Цефтазидим (или цефтибутен, цефиксим, цефепим) Азтреонам Налидиксовая кислота Левомецетин
<b>Сибирская язва</b>	Ампициллин Доксициклин Ципрофлоксацин Рифампицин Меропенем	Цефазолин Эритромицин Линкомицин Канамицин
<b>Холера</b>	Доксициклин Ципрофлоксацин Налидиксовая кислота Триметоприм Фуразолидон Гентамицин	Тетрациклин Левомецетин Цефотаксим Ампициллин Стрептомицин Канамицин Рифампицин
<b>Туляремия</b>	Доксициклин Ципрофлоксацин Стрептомицин Гентамицин Рифампицин	Амикацин Канамицин Налидиксовая кислота
<b>Бруцеллез</b>	Гентамицин Стрептомицин Доксициклин Ципрофлоксацин Рифампицин	Амикацин Канамицин Тетрациклин Налидиксовая кислота
<b>Сап, мелииоз</b>	Доксициклин Триметоприм Цефтазидим Имипенем Рифампицин Левомецетин	Амоксициллин Ципрофлоксацин Цефтриаксон Пиперациллин

Таблица 1 (продолжение)

Энтеробактерии	При ГСИ	Ампициллин или Амоксициллин Амоксициллин/ Клавуланат Цефазолин или Цефалотин Цефотаксим Гентамицин Ципрофлоксацин	Амикацин Карбопенемы Азлоциллин или Пиперациллин/ Сульбактам Сульфаниламиды Тетрациклин Цефлоспорины IV (при тяжелых инфекциях)
	При КИ	Ампициллин Ко-тримоксазол Тетрациклин Цефотаксим Ципрофлоксацин Хлорамфеникол	Налидиксовая кислота Тетрациклин Аминогликозиды Тобрамицин Цефоперазон Карбопенемы Хлорамфеникол Ко-тримоксазол Нетилмицин
Стафилококки		Оксациллин Бензилпенициллин Эритромицин Ко-тримоксазол Клиндамицин Ванкомицин	Тетрациклин Фузидиевая кислота Гентамицин Рифампицин Фторхинолоны Хлорамфеникол Ристомидин (в случае MRSA)
НГОБ		Гентамицин Пиперациллин Цефтазидим Амикацин Ципрофлоксацин Цефепим	Тобрамицин Цефоперазон Карбопенемы Хлорамфеникол Ко-тримоксазол Нетилмицин
Энтерококки		Бензилпенициллин или Ампициллин Стрептомицин или Гентамицин Ванкомицин Эритромицин Хлорамфеникол Тетрациклин	Амикацин Ципрофлоксацин Нитрофурантоин Рифампицин Ристомидин
Возбудители мочевых инфекций		Карбенициллин Фторхинолоны Нитрофурантоин Цефтизоксим Сульфаниламиды Тетрациклин	Налидиксовая кислота Пипемидовая кислота Нитроксолин Ко-тримоксазол

Таблица 2

**Допустимые диапазоны диаметров зон подавления роста (мм) контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями**

Антибиотик	Содержание в диске, мкг	<i>E. coli</i> ATCC 25922, 35218*	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	2	3	4	5
Бензилпенициллин	6 (10 ЕД)	–	26–37	–
Ампициллин	10	16–22	27–35	–
Ампициллин/ сульбактам	10/10	19–24 13–19*	29–37	–
Амоксициллин/ клавуланат	20/10	18–24 17–22*	28–36	–
Оксациллин	1	–	18–24	–
Тикарциллин/ клавуланат	75/10	24–30 21–25*	29–37	20–28
Цефазолин	30	21–27	29–35	–
Цефалотин	30	15–21	29–37	–
Цефаклор	30	23–27	27–31	–
Цефамандол	30	26–32	26–34	–
Цефуроксим	30	20–26	27–35	–
Цефокситин	30	23–29	23–29	–
Цефиксим	5	23–27	–	–
Цефподоксим	10	23–28	19–25	–
Цефтибутен	30	27–35	–	–
Цефоперазон	75	28–34	24–33	23–29
Цефотаксим	30	29–35	25–31	18–22
Цефтазидим	30	25–32	16–20	22–29
Цефтриаксон	30	29–35	22–28	17–23
Цефепим	30	31–37	23–29	24–30
Азтреонам	30	28–36	–	23–29
Имипенем	10	26–32	–	20–28
Меропенем	10	28–34	29–37	27–33
Эртапенем	10	29–36	24–31	13–21
Налидиксовая к-та	30	22–28	–	–
Норфлоксацин	10	28–35	17–28	22–29
Ципрофлоксацин	5	30–40	22–30	25–33

Таблица 2 (продолжение)

1	2	3	4	5
Офлоксацин	5	29–33	24–28	17–21
Ломефлоксацин	10	27–33	23–29	22–28
Левифлоксацин	5	29–37	25–30	19–26
Спарфлоксацин	5	30–38	27–33	21–29
Моксифлоксацин	5	28–35	28–35	17–25
Гатифлоксацин	5	30–37	27–33	20–28
Гемифлоксацин	5	29–36	27–33	19–25
Амикацин	30	19–26	20–26	18–26
Гентамицин	10	19–26	19–27	16–21
Нетилмицин	30	22–30	22–31	17–23
Тобрамицин	10	18–26	19–29	19–25
Канамицин	30	17–25	19–26	–
Эритромицин	15	–	22–30	–
Азитромицин	15	–	21–26	–
Кларитромицин	15	–	26–32	–
Клиндамицин	2	–	24–30	–
Тетромицин	15	–	24–30	–
Хлорамфеникол	30	21–27	19–26	–
Тетрациклин	30	18–25	24–30	–
Доксициклин	30	18–24	23–29	–
Рифампицин	5	8–10	26–34	–
Нитрофурантоин	300	20–25	18–22	–
Ко-тримоксазол (1/19)	1,25/23,75	23–29	24–32	–
Ванкомицин	30	–	17–21	–
Линезолид	30	–	25–32	–
Фосфомицин*	200	22–30	25–33	–

**Примечание:** \* – при оценке чувствительности к фосфомицину в питательную среду необходимо добавлять глюкозо-6-фосфат до концентрации 25 мкг/мл.

Таблица 3

**Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Enterobacteriaceae*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП**

Анти- бактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Зона подавления роста (мм)			МПК (мг/л)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
1	2	3	5	4	6	7	8
Ампициллин	10	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8
Ампициллин/ сульбактам	10/10	≤ 11	12–14	≥ 15	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Амоксициллин/ клавуланат	20/10	≤ 13	14–17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Тикарциллин/ клавуланат	75/10	≤ 14	15–19	≥ 20	≥ 128/2	32/2– 64/2	≤ 16/2
Цефалотин	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефазолин	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефаклор	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефамандол	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефуросим Na	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефуросим аксетил	30	≤ 14	15–22	≥ 23	≥ 32	8–16	≤ 4
Цефокситин	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефотетан	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 64	32	≤ 16
Цефметазол	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 64	32	≤ 16
Цефоперазон	75	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 64	32	≤ 16
Цефотаксим	30	≤ 14	15–22	≥ 23	≥ 64	16–32	≤ 8
Цефтриаксон	30	≤ 13	14–20	≥ 21	≥ 64	16–32	≤ 8
Цефтазидим	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефиксим	5	≤ 15	16–18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1
Цефподоксим	10	≤ 17	18–20	≥ 21	≥ 8	4	≤ 2
Цефтибутен	30	≤ 17	18–20	≥ 21	≥ 32	16	≤ 8
Цефепим	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Азтреонам	30	≤ 15	16–21	≥ 22	≥ 32	16	≤ 8
Имипенем	10	≤ 13	14–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Меропенем	10	≤ 13	14–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Эртапенем	10	≤ 15	16–18	≥ 19	≥ 8	4	≤ 2

Таблица 3 (продолжение)

АМИНОГЛИКОЗИДЫ							
Канамицин	30	≤ 13	14–17	≥ 18	≥ 64	32	≤ 16
Гентамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Тобрамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Нетилмицин	30	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 32	16	≤ 8
Амикацин	30	≤ 14	15–16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
ХИНОЛОНЫ							
Налидиксовая кислота	30	≤ 13	14–18	≥ 19	≥ 32	–	≤ 16
Норфлоксацин	10	≤ 12	13–16	≥ 17	≥ 16	8	≤ 4
Перфлоксацин	5	≤ 15	16–21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 1
Офлоксацин	5	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 8	4	≤ 2
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Ломефлоксацин	10	≤ 18	19–21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 2
Левифлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Гатифлоксацин	5	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 8	4	≤ 2
ТЕТРАЦИКЛИНЫ							
Тетрациклин	30	≤ 14	15–18	≥ 19	≥ 16	8	≤ 4
Доксициклин	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ							
Хлорамфеникол	30	≤ 12	13–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Ко-тримоксазол	1,25/23,75	≤ 10	11–15	≥ 16	≥ 4/76	–	≤ 2/38
Нитрофурантоин	300	≤ 14	15–16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32
Фосфомицин*	200	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64

**Примечание:** \* – для определения МПК фосфомицина необходимо использовать метод серийных разведений в агаре. При определении чувствительности к этому антибиотику как методом серийных разведений в агаре, так и ДДМ, в питательную среду необходимо вносить 25 мг/л глюкозо-6-фосфата.

Таблица 4

**Допустимые диапазоны значений МПК (мг/л) контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями<sup>1</sup>**

Антибиотик	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922 35218*	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Бензилпенициллин	0,25–2	1–4	–	–
Ампициллин	0,5–2	0,5–2	2–8	–
Ампициллин/ сульбактам	–	–	2/1–8/4 8/4–32/16*	–
Амоксициллин/ клавуланат	0,12/0,06– 0,5/0,25	0,25/0,12– 1,0/0,5	2/1–8/4 4/2–16/8*	–
Оксациллин	0,12–0,5	8–32	–	–
Тикарциллин/ клавуланат	0,5/2–2/2	16/2–64/2	4/2–16/2 8/2–32/2*	8/2–32/2
Цефазолин	0,25–1	–	1–4	–
Цефалотин	0,12–0,5	–	4–16	–
Цефаклор	1–4	–	1–4	–
Цефамандол	0,25–1	–	0,25–1	–
Цефуросим	0,5–2	–	2–8	–
Цефокситин	1–4	–	2–8	–
Цефиксим	8–32	–	0,25–1	–
Цефподоксим	1–8	–	0,25–1	–
Цефтибутен	–	–	0,12–0,5	–
Цефоперазон	1–4	–	0,12–0,5	2–8
Цефотаксим	1–4	–	0,03–0,12	8–32
Цефтазидим	4–16	–	0,06–0,5	1–4
Цефтриаксон	1–8	–	0,03–0,12	8–64
Цефепим	1–4	–	0,016–0,12	1–8
Азтреонам	–	–	0,08–0,25	2–8
Имипенем	0,016–0,06	0,5–2	0,06–0,25	1–4
Меропинем	0,03–0,125	2–8	0,008–0,06	0,25–1
Эртапенем	0,06–0,25	4–16	0,004–0,016	2–8
Налидиксовая кислота	–	–	1–4	–
Норфлоксацин	0,5–2	2–8	0,03–0,12	1–4
Ципрофлоксацин	0,12–0,5	0,25–2	0,004–0,016	0,25–1
Офлоксацин	0,12–1	1–4	0,015–0,12	1–8

Таблица 4 (продолжение)

Ломефлоксацин	0,25–2	2–8	0,03–0,12	1–4
Левофлоксацин	0,06–0,5	0,25–2	0,008–0,06	0,5–4
Спарфлоксацин	0,03–0,12	0,12–0,5	0,004–0,16	0,5–2
Моксифлоксацин	0,016–0,12	0,06–0,5	0,008–0,06	1–8
Гатифлоксацин	0,003–0,12	0,12–1	0,008–0,03	0,5–2
Гемифлоксацин	0,008–0,03	0,016–0,12	0,004–0,016	0,25–1
Амикацин	1–4	64–256	0,5–4	1–4
Гентамицин	0,12–1	4–16	0,25–1	0,5–2
Нетилмицин	< 0,25	4–16	< 0,5–1	0,5–8
Тобрамицин	0,12–1	8–32	0,25–1	0,25–1
Канамицин	1–4	16–64	1–4	–
Эритромицин	0,25–1	1–4	–	–
Азитромицин	0,5–2	–	–	–
Кларитромицин	0,12–0,5	–	–	–
Клиндамицин	0,06–0,25	4–16	–	–
Телитромицин	0,06–0,25	0,016–0,12	–	–
Хлорамфеникол	2–8	4–16	2–8	–
Тетрациклин	0,12–1	8–32	0,5–2	8–32
Токсициклин	–	–	0,5–2	–
Рифампицин	0,004–0,016	0,5–4	4–16	16–64
Нитрофурантоин	8–32	4–16	4–16	–
Ко-тримаксазол (1/19)	< 0,5/9,5	< 0,5/9,5	< 0,5/9,5	8/152–32/608
Ванкомицин	0,5–2	1–4	–	–
Линезолид	1–4	1–4	–	–
Фосфомицин <sup>2</sup>	0,5–4	32–128	0,5–2	2–8

**Примечание:** <sup>1</sup> – данные приведены для методов серийных микроразведений в бульоне.  
<sup>2</sup> – при оценке чувствительности к фосфомицину необходимо использовать метод серийный разведений в агаре, в среду необходимо добавлять глюкозо-6-фосфат до концентрации 25 мкг/мл.



Таблица 5

**Пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и МПК (мг/л) АБП в отношении *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. И других НФБ1**

Антибактериальные препараты	Содежание в диске (мкг)	Зона подавления роста (мм)			МПК (мг/мл)		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
<b>БЕТА-ЛАКТАМЫ</b>							
Ампициллин/сульбактам	10/10	≤ 11	12–14	≥ 15	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Тикарциллин/клавуланат <sup>2</sup> : <i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp.	75/10	≤ 14	–	≥ 15 ≥ 20	≥ 128/2	–	≤ 64/2
	75/10	≤ 14	15–19				
Цефоперазон	75	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 64	32	≤ 16
Цефотаксим	30	≤ 14	15–22	≥ 23	≥ 64	16–32	≤ 8
Цефтриаксон	30	≤ 13	14–20	≥ 21	≥ 64	16–32	≤ 8
Цефтазидим	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефепим	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Азтреонам	30	≤ 15	16–21	≥ 22	≥ 32	16	≤ 8
Имипенем	10	≤ 13	14–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Меропенем	10	≤ 13	14–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
<b>АМИНОГЛИКОЗИДЫ</b>							
Гентамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Тобрамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Нетилмицин	30	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 32	16	≤ 8
Амикацин	30	≤ 14	15–16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
<b>ХИНОЛОНЫ</b>							
Норфлоксацин	10	≤ 12	13–16	≥ 17	≥ 16	8	≤ 4
Пефлоксацин	5	≤ 12	13–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Офлоксацин	5	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 8	4	≤ 2
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Левифлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Ломефлоксацин	10	≤ 18	19–21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 2

Таблица 5 (продолжение)

ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ							
Хлорамфеникол	30	≤ 12	13–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Ко-тримоксазол	1,25/23,75	≤ 10	11–15	≥ 16	≥ 4/76	–	≤ 2/38
Тетрациклин	30	≤ 14	15–18	≥ 19	≥ 16	8	≤ 4
Доксициклин	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4

**Примечание:** <sup>1</sup> – ДДМ стандартизован только для *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. При определении чувствительности других НФБ необходимо использовать методы серийных разведений. <sup>2</sup> – Метод серийных разведений не стандартизован для определения чувствительности *Acinetobacter* spp. к тикарциллину/клавуланату.

Таблица 6

**Растворители и разбавители, используемые для приготовления основных растворов антибиотиков**

Антибиотик	Растворитель	Разбавитель
Ампициллин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 6,0
Хлорамфеникол	95%-й этанол	Вода
Норфлоксацин	½ объема воды, затем добавляют по каплям 0,1 моль/л раствор NaOH до растворения	Вода
Офлоксацин		
Налидиксовая кислота		
Нитрофурантоин	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 8,0	Фосфатный буфер 0,1 моль/л рН 8,0
Рифампин	Метанол	Вода
Сульфаниламиды	½ объема горячей воды и минимальное количество 2,5 моль/л раствора NaOH	Вода
Триметоприм	0,05 н. раствор соляной кислоты до 10 % от конечного объема	Вода

Таблица 7

**Приготовление агара с АБП необходимой концентрации**

Необходимая концентрация препарата в 1 мл агара (мкг/мл, мг/л)	Концентрация препарата в рабочем растворе (мкг/мл, мг/л)	Количество рабочего раствора, вносимого в агар (20 мл), для получения необходимой концентрации препарата, мл
0,06	10	0,12
0,125		0,25
0,25		0,5
0,5	100	0,1
1,0		0,2
2,0		0,4
4,0		0,8
8,0	1 000*	0,16
16,0		0,32
32,0		0,64
64,0	10 000*	0,128
128,0		0,256
256,0		0,512

**Примечание:** \* – для приготовления растворов соответствующих препаратов в концентрациях 100 000, 10 000, 1 000 мкг/мл (мг/л) используют димексид или 96%-й этиловый спирт.

Таблица 8  
**Последовательности праймеров, использованных для детекции генов резистентности к антибиотикам**

Праймер	Последовательность (5'® 3')	Размер ампликона в (п.н.)	№ в базе данных GenBank	Сайт праймера (nt)	Ссылка
suIII-F	TGTGCGGATGAAGTCAGCTCC	626	AY034138	16101-16121	Hochhut et al. (2001)
suIII-R	AGGGGGCAGATGTGATCGAC		AY034138	16707-16726	Hochhut et al. (2001)
str-F	CCGCGATAGCTAGATCGCGTT	515	AY034138	14364-14384	Ramachandran D. (2007)
str-R	CGACTACCAGGCGACCGAAAT		AY034138	14858-14878	Ramachandran D. (2007)

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1

#### Выбор контрольных штаммов

Выбор контрольных штаммов определяется видом тестируемого микроорганизма. В качестве контрольных тест-штаммов используют типичные штаммы с хорошо изученными фенотипическими характеристиками, включая чувствительность к АБП, отличающиеся генетической стабильностью. К таковым относятся вакцинные штаммы *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Francisella tularensis* 15, *Brucella abortus* 19ВА, *Bacillus anthracis* СТИ, а также *Vibrio cholerae non 01 КМ 162* (P-9741), депонированный в качестве референтного антибиотикочувствительного тест-штамма в ГК ПБ РосНИПЧИ «Микроб», типичные штаммы буркхолдерий – *Burkholderia mallei* NCTC 10230 и *Burkholderia pseudomallei* CIP 6086. Контрольные штаммы, соответствующие каждому виду возбудителей ООИ, используют на этапах предварительного изучения качества питательных сред, применяемых при определении антибиотикочувствительности, контроля активности дисков с антибиотиками и субстанций АБП, для их последующего использования в случае эпидемических осложнений (МУ 3.4.1030-01).

Для внутреннего контроля качества определения антибиотикограммы используют также эталонные референс-штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922 (для возбудителей чумы, туляремии, бруцеллеза, холеры), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (для возбудителя сибирской язвы), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (для возбудителей сапа и мелиоидоза).

Для сохранения свойств и чистоты контрольные штаммы необходимо хранить в лиофилизированном состоянии. «Рабочие» культуры хранят в пробирках на скошенном агаре или в столбиках агара, оптимального для роста каждого вида микроорганизма, при 2–8 °С с еженедельным пересевом. Исключением является контрольный штамм *Vibrio cholerae non 01 КМ 162* (P-9741), который хранится в 0,3%-м полужидком агаре при 18–20 °С. Перед использованием для контроля качества определения антибиотикограммы референтный штамм двукратно пересеивается.

## Приложение 2

### Выбор питательных сред

Для оценки чувствительности микроорганизмов к АБП используют питательные среды, разрешенные к применению в Российской Федерации, в соответствии с биологическими особенностями каждого вида изучаемого микроорганизма. Стандартной средой является агар и бульон Мюллера – Хинтона (*Muller – Hinton*). При тестировании микроорганизмов со сложными питательными потребностями (например, *Streptococcus spp.*) к агару Мюллера – Хинтона добавляют 5%-й дефибринированной бараньей крови, а в бульон Мюллера – Хинтона – 2,0–5,0%-й лизированной лошадиной крови.

Каждую партию питательных сред проверяют с использованием контрольного штамма на ростовые качества для тестируемого микроорганизма (рост при высеве на чашки с агаром – не менее 30 % КОЕ), а также на соответствие рекомендуемого рН с помощью рН-метра. Последнее связано с изменением активности аминогликозидов, макролидов, тетрациклинов в зависимости от рН питательной среды.

Выбранную питательную среду промышленного производства готовят в колбах в строгом соответствии с инструкцией изготовителя, затем разливают в градуированные бутылки емкостью 250 мл и автоклавируют. Остуженный до 48–50 °С агар (при необходимости в него добавляют стерильные термолабильные добавки или растворы АБП) разливают в чашки Петри.

Агар разливают по 25 мл в чашки диаметром 100 мм и по 20 мл в чашки диаметром 90 мм с тем, чтобы толщина агара составляла  $(4 \pm 0,5)$  мм. Чашки оставляют для застывания при комнатной температуре. Для приготовления чашек с агаром требуется горизонтальная поверхность. Чашки после высушивания при комнатной температуре лучше использовать немедленно, однако возможно их приготовление за 24 ч до использования при условии хранения при 4–8 °С. Допускается подсушивание при 37 °С в течение 15 мин перевернутых вверх дном чашек в термостате, предварительно обработанном 70%-м этиловым спиртом.

## Приложение 3

### Требования к культуре, используемой для инокуляции

Исследование на чувствительность культур микроорганизмов к АБП проводится одновременно с их индикацией и/или идентификацией.

Необходимо использовать только чистые культуры бактерий или (при проведении специфической индикации) материал из 2–3 изолированных морфологически типичных колоний возбудителя в первичном посеве пробы клинического материала от больного при выраженной симптоматике инфекции (например, водянистый стул у больных с алгидной формой холеры обычно содержит чистую культуру *V. cholerae*, так же как и пунктат из чумного бубона, обычно содержит чистую культуру *Y. pestis* и т.д.).

Суспензию микроорганизмов готовят из агаровой культуры, выращенной на неселективной питательной среде при соответствующей температуре (28–37 °С), оптимальной для роста данного вида бактерий. Стандартизацию суспензии проводят по оптическому стандарту мутности (ОСО) ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 5–10 ед., что соответствует  $n \times 10^8 - 10^9$  КОЕ/мл в зависимости от вида возбудителя. ОСО приведен в соответствие с международным стандартом мутности. Инокулом следует использовать в течение 15 мин после приготовления.

## Приложение 4

### Выбор антибактериальных препаратов

В соответствии с нормативной документацией средствами общей экстренной профилактики инфекции бактериальной природы (до определения вида возбудителя) являются доксициклин (тетрациклин), ципрофлоксацин (офлоксацин, пефлоксацин), рифампицин и триметоприм/сульфамометоксин (торговое название – сульфатен) или триметоприм/сульфаметоксазол (бисептол, ко-тримоксазол и др.).

Специальная экстренная профилактика и этиотропная терапия инфекции проводится уже в соответствии с установленной антибиотикограммой возбудителя, включающей данные о чувствительности к антибактериальным препаратам I и II групп.

Партии АБП, используемые для осуществления общей, специальной экстренной профилактики и этиотропной терапии опасных инфекционных заболеваний, должны быть предварительно изучены на соответствие заявленной и фактической антибактериальной активности методом серийных разведений препаратов в плотной питательной среде (среда Мюллера – Хинтона) с использованием референс-штаммов.

## Приложение 5

**Интерпретация результатов исследования**

Интерпретация результатов оценки антибиотикочувствительности микроорганизма к АБП заключается в отнесении его к одной из трех категорий: чувствительный, промежуточный, устойчивый в соответствии с критериями, разработанными для данного вида бактерий. Интерпретация проводится путем сопоставлений величин МПК и (или) диаметров зон ингибиции роста, полученных в результате исследования, с пограничными значениями этих параметров для чувствительных, промежуточных и устойчивых культур изучаемого вида возбудителя.

Приведенные в МУК 4.2.1890-04 критерии интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов III–IV групп патогенности к АБП разработаны на основе микробиологических, фармакокинетических, фармакодинамических факторов и клинических наблюдений. В МУК 4.2.2495-09 проведена адаптация этих критериев к интерпретации результатов определения антибиотикограмм возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, холеры, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза. Изменение пограничных значений МПК и диаметров зон ингибиции роста бактерий для некоторых АБП явилось результатом сравнительного изучения данных *in vitro*, эффективности *in vivo* (экспериментальные модели инфекций), диапазонов значений МПК и диаметров зон ингибиции роста для 20–75 штаммов каждого вида микроорганизма, а также клинических наблюдений в практике противочумных учреждений и анализа данных современной отечественной и зарубежной литературы.

Клинически ориентированные категории чувствительности и устойчивости бактерий к АБП не всегда коррелируют с микробиологическими, в связи с чем необходим бактериологический контроль эффективности этиотропной терапии инфекции у каждого пациента даже в случае улучшения симптоматики заболевания (через 2–3 суток на фоне лечения).



## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ

1. Для чего необходимо знать степень чувствительности возбудителей к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам?

*Ответ:* Для рационального подбора средств эффективной терапии и профилактики; для изучения возникновения и распространения инфекции; для наблюдения за появлением и формированием антибиотикорезистентности микроорганизмов в отдельных лечебных учреждениях или географических регионах).

2. Что является основным показателем чувствительности микроорганизмов к АБП?

*Ответ:* Основным показателем чувствительности микроорганизмов к АБП является величина минимальной подавляющей концентрации – МПК (мкг/мл; мг/л).

3. Какие методы используются для определения чувствительности возбудителей ООИ к АБП?

*Ответ:* Для определения чувствительности возбудителей ООИ к АБП используют метод серийных разведений препаратов в плотной питательной среде (МСП) и диско-диффузионный метод (ДДМ).

4. К какой категории относят микроорганизмы в результате изучения их антибиотикограмм?

*Ответ:* В соответствии с МУК 4.2.1890-04 исследуемые микроорганизмы в результате изучения их антибиотикограмм относят к одной из трех категорий: чувствительный, промежуточный, устойчивый.

## НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ И РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. О биологической безопасности в Российской Федерации: Федеральный закон от 30.12.2020 № 492-ФЗ.
2. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
3. Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений. СанПиН 2.1.7.2527-09.
4. Определение чувствительности возбудителей особо опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2. 2495-09. – М., 2009. – 66 с.
5. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2. 1890-04. – М., 2004. – 92 с.
6. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I–II групп патогенности: МУ 1.3.1794-03. – Федеральный центр ГСЭН Минздрава России. – М., 2003.
7. Антибиотики / Справочник: моногр. – М.: Медицина, 2017. – 326 с.
8. Антибиотики и их применение. – М.: Издательство Академии медицинских наук СССР, 2012. – 160 с.
9. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии // Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. – М.: МИА, 2003. – 233 с.
10. Ваксман З.А. Антибиотики. Их природа, получение и применение. – М.: Издательство Академии Наук СССР, 2014. – 112 с.
11. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: учебник. – 6-е изд., перераб. и доп. – М., 2004. – 528 с.
12. Ермольева З.В. Антибиотики, интерферон, бактериальные полисахариды. – М.: Медицина, 2013. – 384 с.
13. Идентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антибиотикам. Инструкция пользователя // Sy-Lab Gerete GmbH (Австрия). – 2004.
14. Идентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антибиотикам с применением автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact. Методические рекомендации. – М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2008. – 14 с.

15. Каримов И.Ф. Антибиотики и химиотерапевтические препараты. – М.: Бибком, 2012. – 650 с.
16. Кашкин П.Н. Антибиотики и их практическое использование: моногр. – М.: Государственное издательство медицинской литературы, 2012. – 252 с.
17. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6, № 1. – 103 с.
18. Медицинская микробиология и иммунология / У. Левинсон; Пер. с англ.; Под ред. В.Б. Белобородова. – М.: Лаборатория знаний, 2021. – 547 с.
19. Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – С. 137–164.
20. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия (справочник). – М., 1982. – 4-е изд. – 415 с.
21. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой. – Санкт-Петербург: Лань, 2021. – 588 с.
22. Практикум по микробиологии / Под ред. Нетрусова. – Москва, 2005. – 603 с.
23. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М., 2002. – 15 с.
24. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Инфекционные болезни. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 1104 с.
25. Ющук Н.Д., Венгерова Ю.Я. Инфекционные болезни. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 1104 с.
26. NCCLS. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. – Approved standart sixth edition. – 2003. – NCCLS document M7-A6.
27. NCCLS. Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standart eights edition. – 2003. – NCCLS document M2-A8.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ  
К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

**Учебно-методическое пособие  
для врачей-бактериологов**

Корректор *Бондаренко О.Г.*  
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*  
Художник *Фалеев К.А.*

---

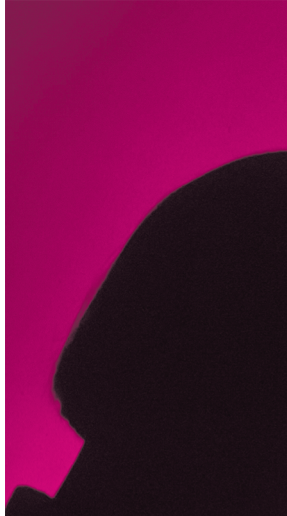
Сдано в набор 02.06.2022. Подписано в печать 09.06.2022. Бумага офсетная.  
Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Гарнитура Cambria.  
Усл. печ. л. 3,4. Тираж 130 экз. Заказ № 026-22.

---

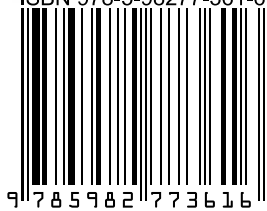
ИНЦХТ  
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.  
E-mail: arleon58@gmail.com



УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ



ISBN 978-5-98277-361-6



9 78 5 982 77 361 6