

УДК 615.33.015.8.07

Ципрофлоксацин и норфлоксацин: определение чувствительности диско-диффузионным методом

Введение

Для каждого возбудителя инфекции, требующей антибиотикотерапии, необходимо определять его чувствительность к антибиотикам в том случае, когда она не может быть достоверно предсказана на основании идентификации микроорганизма и знаний о его природной чувствительности или резистентности к антимикробным препаратам. Особенно необходимо определение чувствительности тогда, когда возбудитель способен приобретать резистентность к наиболее часто используемым в практике антибактериальным препаратам.

Современные методы определения чувствительности к антибиотикам основаны на двух основных принципах:

– *серийных двойных разведений антибиотика* в жидкой (бульоне) или твердой (агаре) питательной среде;

– *диффузии антибиотика в агар* (диско-диффузионный метод и метод Е-тестов).

Определение чувствительности

ти микроорганизмов к антибиотикам с помощью дисков является наиболее простым, удобным и широко используемым методом при рутинном микробиологическом исследовании чувствительности обычных быстрорастущих и некоторых “привередливых” микроорганизмов.

Однако необходимо помнить, что на результаты определения чувствительности могут влиять многие факторы, такие, как состав, рН, толщина и равномерность слоя питательной среды, содержание в ней ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , тимидина, плотность инокулюма, возраст культуры, скорость роста микроорганизма, условия инкубации (температура, атмосфера), скорость диффузии антибиотика в агар и т. д.

Поэтому эта методика требует использования определенного агара, неукоснительного соблюдения правил его приготовления, обязательной стандартизации инокулюма, строгого соблюдения условий инокуляции и инкубации чашек, правильного и регулярного проведения процедур по контролю качества.

В данных методических рекомендациях рассматриваются вопросы, касающиеся требований, предъявляемых к приготовлению агара и инокулюма, к методике постановки чувствительности, к инкубации, к чтению и оценке

полученных результатов, к проведению контроля качества.

Краткое описание метода

Диско-диффузионный метод определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам основан на регистрации диаметра зоны подавления роста вокруг бумажного диска с антибиотиком.

Стандартизированная суспензия исследуемого микроорганизма наносится на всю поверхность чашки с агаром. Бумажные диски, пропитанные определенным количеством антибиотика, помещаются на поверхность инокулированного агара. Чашка инкубируется, а затем измеряются диаметры зон подавления роста вокруг дисков с антибиотиками. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста пропорциональна величине минимальной подавляющей концентрации (МПК). Поэтому диско-диффузионный метод позволяет косвенно судить о величине МПК и отнести штамм к одной из категорий чувствительности (чувствительный, умеренно-резистентный или резистентный).

Результаты интерпретируются путем сравнения диаметров зон, полученных у тестируемого микроорганизма, с критериями интерпретации, разработанными на основе корреляции величины

Контактный адрес:
 Стецюк Ольга Ульяновна
 214019, Смоленск, а/я 5
 Тел.: (0812) 55-3401
 Факс: (0812) 55-0624
 Эл. почта: olga@cliph.keytown.com

Методические рекомендации подготовил авторский коллектив:
 О.У. Стецюк, Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова (Смоленская государственная медицинская академия)

диаметров зон подавления роста и МПК антибиотика в отношении данного микроорганизма.

Антибиотики

Ципрофлоксацин – фторхинолон, являющийся “золотым стандартом” этой группы антибактериальных препаратов и обладающий широким спектром активности в отношении грамотрицательных микроорганизмов и стафилококков, в том числе некоторых штаммов, резистентных к другим антибиотикам.

Норфлоксацин – фторхинолон, активный в отношении наиболее частых возбудителей кишечных инфекций и инфекций мочевыводящих путей – грамотрицательных микроорганизмов семейства энтеробактерий и стафилококков. Применяется при лечении острых и хронических инфекций органов мочевого выделения, хронического простатита, гонореи, бактериального гастроэнтерита, диареи путешественников.

Микроорганизмы

Выбор видов микроорганизмов, у которых необходимо определять чувствительность к ципрофлоксацину и норфлоксацину, определяется спектром активности и фармакокинетическими особенностями этих антибиотиков.

Бактерии, которые следует тестировать на чувствительность к ципрофлоксацину, включают: грамотрицательные палочки семейства Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. и др.) и группы неферментирующих бактерий – НФБ (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. и др.), *Haemophilus influenzae*, а также грамположительные кокки

(*Staphylococcus aureus* и коагулаза-негативные стафилококки, *Enterococcus* spp. и др.).

Учитывая особенности фармакокинетики и клинического применения норфлоксацина, его активность *in vitro* определяют только в отношении штаммов, выделенных из мочевыводящих путей и кишечника (энтеробактерий, НФБ, стафилококков и энтерококков) и не тестируют к нему гемофильную палочку и бактериальные изоляты из других очагов инфекции (мокрота, раневое отделяемое и т. д.).

Не следует определять чувствительность к ципрофлоксацину и норфлоксацину микроорганизмов с природной низкой чувствительностью к этим антибиотикам, таких, как *Streptococcus* spp., в том числе *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes*.

Необходимые материалы

Питательные среды. Для тестирования аэробных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов согласно рекомендациям Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS, США) необходимо использовать агар Мюллера–Хинтона.

Агар следует закупать у известных фирм-производителей (BioMerieux, Becton Dickinson и др.), что позволяет быть уверенным в хорошем качестве и стабильности состава сухой питательной среды. Проблемы, возникающие при определении чувствительности “привередливых” микроорганизмов, например гемофильной палочки, решаются путем внесения в агар соответствующих добавок.

В России основной питательной средой для определения чувствительности микроорганизмов является среда АГВ. Однако в “Методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков” МЗ СССР, вышедших в свет 16 лет тому назад (1983), нет сведений о современных антибиотиках, в частности фторхинолонах (ципрофлоксацин, норфлоксацин), а также описаний методик определения чувствительности “привередливых” микроорганизмов, таких, как *H. influenzae*.

В связи с этим возникла потребность в исследовании возможности использования среды АГВ вместо агара Мюллера–Хинтона и критериев NCCLS для интерпретации получаемых результатов.

Приготовление агара. Агар необходимо приготовить так, как указано в инструкции. Например, для агара Мюллера–Хинтона производства компании “Becton Dickinson” 38 г порошка суспендируют в 1 л дистиллированной или деионизированной воды, тщательно перемешивая. Суспензию нагревают, часто перемешивая, и кипятят в течение 1 мин до полного растворения порошка. Автоклавируют при температуре 121°C в течение 15 мин. Очень важно не перегревать агар при автоклавировании.

В международной практике основной средой, используемой для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, является среда Мюллера–Хинтона.

Исследования показали, что отечественная питательная среда для определения чувствительности АГВ может быть использована вместо агара Мюллера–Хинтона для тестирования

микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp. и *Staphylococcus* spp. к ципрофлоксацину и норфлоксацину.

Недопустимо использовать среду АГВ для определения чувствительности *P. aeruginosa* к этим антибиотикам.

При тестировании штаммов *H. influenzae* также нельзя использовать среду АГВ с добавками и шоколадный агар на основе АГВ, так как полученные диаметры зон существенно отличаются от результатов на агаре НТМ.

Для приготовления среды АГВ 45 г порошка суспендируют в 1 л дистиллированной или деионизированной воды, тщательно перемешивая. Суспензию нагревают, часто перемешивая, и кипятят в течение 1 мин до полного растворения порошка. Автоклавировывают при 1 атмосфере в течение 15 мин. Очень важно не перегревать агар при автоклавировании.

После автоклавирования агар охлаждают до температуры 45–50°C на водяной бане, затем вносят необходимые добавки, например, кровь, и тщательно перемешивают. Приготовленный агар разливают в стерильные чашки Петри на ровном, строго горизонтальном рабочем столе. На чашку диаметром 100 мм расходует 25 мл агара, диаметром 90 мм – 20 мл, чтобы толщина среды в чашке была 4,0±0,5 мм. Агар застывает при комнатной температуре.

Чашки с застывшим агаром подсушивают с приоткрытыми крышками в термостате при температуре 35°C в течение 10–30 мин, чтобы удалить избыток конденсата. Готовые чашки можно использовать для определения чувствительности. Перед использованием каждой новой партии

чашек проводят контроль качества приготовленного агара.

Хранение приготовленных чашек с агаром. При необходимости готовые чашки для определения чувствительности можно хранить в пластиковых герметично закрытых пакетах в холодильнике при температуре +2–8°C в течение 1–2 нед. Однако после длительного хранения необходимо провести контроль качества хранившихся чашек с помощью контрольных штаммов. Перед использованием хранившихся чашек нужно убедиться, что поверхность агара сухая. Для этой цели их предварительно нагревают до комнатной температуры.

Диски с антибиотиками. Диски коммерческого изготовления (BioMerieux, BBL и др.) с 5 мкг ципрофлоксацина и 10 мкг норфлоксацина должны храниться в морозильной камере при температуре –20°C.

Перед использованием диски следует нагреть до комнатной температуры в герметично закрытом контейнере с влагопоглотителем для того, чтобы предохранить их от конденсации влаги, то есть их необходимо вынуть из холодильника за 1–2 ч до начала работы.

После вскрытия герметичной фабричной упаковки картриджи с дисками необходимо поместить в плотно закрывающиеся контейнеры с влагопоглотителем. Диспенсер, используемый для аппликации дисков, должен храниться в плотно закрытом контейнере с достаточным количеством влагопоглотителя.

Небольшое количество дисков, ежедневно расходуемых для работы, можно хранить в обычном холодильнике при температуре +2–8°C, соблюдая все перечисленные меры по предохранению их от влаги. При изменении цвета влагопоглотителя необхо-

димо заменить его новым и проверить качество дисков.

Стандарт мутности по Мак-Фарланду (McFarland). Для стандартизации плотности микробной взвеси следует использовать стандарт мутности по Мак-Фарланду. Стандарт изготавливают многие фирмы, производящие микробиологическую продукцию (BioMerieux, Remel и др.). Но он может также быть приготовлен в лаборатории.

Для приготовления стандарта мутности необходимо добавить 0,5 мл 0,048 М ВаСl₂ (1,175% раствор ВаСl₂×2Н₂О) к 99,5 мл 0,18М (0,36 N) Н₂SO₄ (1% раствор).

Оптическую плотность приготовленного стандарта мутности проверяют с помощью спектрофотометра с длиной светового пути 1 см и подходящей кюветой для определения поглощения. Для стандарта мутности 0,5 по Мак-Фарланду поглощение должно быть 0,08–0,10 при длине волны 625 нм.

Приготовленный стандарт мутности разливают по пробиркам того же размера, что и используемые для приготовления инокулюма, с хорошо закручивающимися крышками, и хранят плотно закрытыми в темном месте при комнатной температуре. Непосредственно перед использованием стандарт мутности надо интенсивно взболтать. Стандарт необходимо менять на новый или проверять его оптическую плотность ежемесячно.

Процедура тестирования

Приготовление инокулюма. Различия в плотности инокулюма могут существенно влиять на размеры диаметров зон подавления роста. Поэтому важно приготовить стандартный инокулюм.

Для приготовления инокулюма можно использовать суточную агаровую или 5–6-часовую бульонную чистую культуру ис-

следуемого микроорганизма. С чашки, содержащей суточную культуру, петлей берут верхушки 4–5 колоний одного типа и вносят в пробирку с 3–5 мл стерильного физиологического раствора, стерильной дистиллированной воды или подходящего питательного бульона до достижения плотности инокулюма, эквивалентной стандарту мутности 0,5 по Мак-Фарланду.

Приготовленный инокулюм необходимо сравнивать с контрольным стандартом при хорошем освещении на подходящем фоне, например, на белом фоне с контрастными черными полосами. Культура, соответствующая этому стандарту, содержит в 1 мл примерно 10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ/мл).

Инокуляция чашек с агаром.

Перед использованием чашек необходимо убедиться в том, что поверхность агара сухая. Инокуляция чашек следует проводить в течение 15 мин после приготовления стандартного инокулюма.

Бактериальную суспензию на чашку рекомендуется наносить стерильным ватным тампоном. Тампон смачивают в стандартизованном инокулюме, слегка отжимают о стенки пробирки и наносят им культуру в трех различных направлениях, каждый раз поворачивая чашку Петри на 60° , чтобы получить как можно более равномерный микробный газон.

В случае, если нанесение инокулюма стерильным ватным тампоном невозможно, следует развести инокулюм 1:10 стерильным физиологическим раствором или дистиллированной водой и нанести его на чашку с помощью пастеровской пипетки. При этом 1–2 мл разведенного 1:10 инокулюма наносят на поверхность чашки Петри с питательной средой, равномерно распределяют по поверхности покачиванием и уда-

ляют избыток жидкости пипеткой. Инокулированные чашки оставляют на рабочем столе на 15–20 мин для абсорбции инокулюма.

Апликация дисков. Диски с антибиотиками помещают на поверхность инокулированного агара с помощью прокаленного над пламенем спиртовки пинцета или специального диспенсера. Диски необходимо располагать на расстоянии не менее 20 мм друг от друга и от краев чашки Петри, то есть на чашку диаметром 100 мм не более 6 дисков. Диски должны плотно контактировать с поверхностью инокулированного агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом. Нельзя смещать диски после их контакта с поверхностью агара.

Инкубация чашек. Чашки с дисками переворачивают вверх дном и помещают в термостат для инкубации при температуре $+35^\circ\text{C}$ в течение 18–20 ч. Не следует инкубировать чашки при тестировании “непривередливых” микроорганизмов в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 , так как это может изменить pH среды, скорость роста микроорганизмов и активность антибиотиков, что приводит к получению некорректных результатов. Однако при тестировании капнофильных микроорганизмов, например *Haemophilus* spp., необходимо повышенное содержание CO_2 до 5–7% (в эксикаторе или CO_2 -инкубаторе).

Определение диаметров зон.

Для измерения диаметров зон подавления роста чашки помещают сверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал на них под углом 45° (учет в отраженном свете).

Для выявления единичных колоний резистентных мутантов внутри основной зоны подавления роста чашки просматривают

в проходящем свете. Для измерения диаметров зон пользуются линейкой или штангенциркулем, что предпочтительнее. Величина диаметра зоны должна определяться и регистрироваться с точностью до 1 мм.

Диаметр зоны учитывается по полному подавлению роста микроорганизма, определяемому невооруженным глазом (обращать внимание на единичные колонии или на вуаль в зоне подавления роста).

Если две или более колонии имеются в зоне подавления роста микроорганизма, необходимо субкультивировать их для проверки чистоты культуры и повторить тестирование. При определении чувствительности штаммов *Proteus* spp. тонкая вуаль роения внутри четко видимой зоны подавления роста не учитывается.

Интерпретация результатов. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности к ципрофлоксацину и норфлоксацину для “непривередливых” штаммов аэробных микроорганизмов приведены в табл. 1 (NCCLS, 1999).

Использование среды АГВ для тестирования «непривередливых» микроорганизмов

Исследование возможности использования среды АГВ вместо агара Мюллера–Хинтон показало, что результаты определения чувствительности к ципрофлоксацину и норфлоксацину контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 и клинических штаммов семейства Enterobacteriaceae, родов *Acinetobacter* и *Staphylococcus* на обоих агарах совпадают. Это позволяет рекомендовать указанные в табл. 1 критерии интерпретации результатов при тестировании этих микроорганизмов на среде АГВ.

Таблица 1. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом к ципрофлоксацину и норфлоксацину (NCCLS, 1999)

Антибиотик	Микроорганизм	Резистентный, R		Умеренно-резистентный, I		Чувствительный, S	
		Ø зоны, мм	МПК, мг/л	Ø зоны, мм	МПК, мг/л	Ø зоны, мм	МПК, мг/л
Ципрофлоксацин	<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	≤15	≥4	16–20	2	≥21	≤1
	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.	≤15	≥4	16–20	2	≥21	≤1
	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤15	≥4	16–20	2	≥21	≤1
	<i>Enterococcus</i> spp.	≤12	≥16	13–16	8	≥17	≤4
	<i>H. influenzae</i>	–	–	–	–	≥21	≤1
Норфлоксацин	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤12	≥16	13–16	8	≥17	≤4
	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.	≤12	≥16	13–16	8	≥17	≤4
	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤12	≥16	13–16	8	≥17	≤4
	<i>Enterococcus</i> spp.	≤12	≥16	13–16	8	≥17	≤4

При определении чувствительности *P. aeruginosa* (в том числе контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853) к ципрофлоксацину и норфлоксацину на среде АГВ зоны подавления роста значительно отличаются от таковых, получаемых на агаре Мюллера–Хинтон. Поэтому среда АГВ не может быть использована для определения чувствительности синегнойной палочки к этим антибиотикам.

Необходимы дальнейшие исследования возможности выработки критериев интерпретации результатов определения чувствительности *P. aeruginosa* к ципрофлоксацину и норфлоксацину на среде АГВ.

Определение чувствительности к ципрофлоксацину и норфлоксацину бактерий семейства Enterobacteriaceae, родов Acinetobacter и Staphylococcus допустимо проводить на среде АГВ с использованием критериев интерпретации результатов, рекомендованных NCCLS.

Для получения достоверных результатов при определении чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к ципрофлоксацину и норфлоксацину необходимо ис-

пользовать только агар Мюллера–Хинтон.

Определение чувствительности Haemophilus spp.

При определении чувствительности “привередливых” микроорганизмов, в частности *H. influenzae*, необходимо учитывать, что небогатые агары Мюллера–Хинтон и АГВ не могут обеспечить питательные потребности и хороший рост этих микроорганизмов.

Рекомендуемый агар. Согласно рекомендациям NCCLS, для определения чувствительности гемофильной палочки необходимо использовать среду НТМ (Haemophilus Test Medium), которая содержит все необходимые для гемофил факторы роста. Недопустимо использовать шоколадный агар для определения чувствительности *H. influenzae* spp., так как зоны подавления роста вокруг дисков с антибиотиками на шоколадном агаре значительно отличаются от таковых на НТМ.

Среда НТМ представляет собой агар Мюллера–Хинтон с добавлением дрожжевого экстракта и факторов X (гематин) и V (НАД). Она выпускается компа-

нией “Unipath Oxoid” в виде НТМ-основы и добавок. Однако ее можно приготовить и в лаборатории на основе агара Мюллера–Хинтон. После растворения основы в нее добавляют дрожжевой экстракт до конечной концентрации 5 мг/мл, НАД и раствор гематина до конечной концентрации 15 мкг/мл.

Для приготовления основного раствора гематина к 50 г порошка добавляют 100 мл 0,01N NaOH (0,01 моль/л) и нагревают при тщательном перемешивании до полного растворения. В подготовленную для автоклавирования среду на 1 л вносят 30 мл основного раствора гематина. После автоклавирования и охлаждения основы на водяной бане до температуры 45–50°C в нее асептически вносят матричный раствор никотинамидадениндинуклеотида (НАД) 3 мл на 1 л агара до конечной концентрации 15 мкг/мл. Для приготовления матричного раствора 50 мг НАД растворяют в 10 мл дистиллированной воды и стерилизуют фильтрацией через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм.

Исследования показали невозможность использования агаров, приготовленных на основе

среды АГВ, для определения чувствительности *H. influenzae* к ципрофлоксацину, так как диаметры зон подавления роста вокруг дисков с этим антибиотиком как на шоколадном агаре на основе АГВ, так и на агаре АГВ, обогащенном дрожжевым экстрактом и факторами роста, значительно отличаются от таковых на НТМ.

Следовательно, для получения достоверных результатов определения чувствительности *H. influenzae* необходимо использовать среду НТМ.

Особенности тестирования *Haemophilus* spp. Определение чувствительности гемофильной палочки к антибиотикам аналогично тестированию “непривередливых” микроорганизмов. Оно имеет следующие особенности:

- для приготовления инокулюма суспендируют колонии суточной культуры *Haemophilus* spp., выросшей на чашке с шоколадным агаром, в подходящем питательном бульоне, например в бульоне Мюллера–Хинтон или в стерильном физиологическом растворе; плотность инокулюма должна соответствовать стандарту мутности 0,5 по Мак-Фарланду; инокуляцию чашек с НТМ агаром проводят в течение 15 мин после приготовления инокулюма;

- поскольку зоны подавления роста гемофильной палочки вокруг дисков с антибиотиками обычно большие, на чашку диаметром 90–100 мм нельзя помещать более 4 дисков с антибиотиками;

- инокулированные чашки инкубируют при температуре 35°C в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (до 5%) в эксикаторе или CO₂-инкубаторе в течение 16–18 ч, после чего измеряют полученные зоны подавления роста;

- для интерпретации результатов определения чувствительности гемофильной палочки к антибиотикам используют специфические критерии, отличные от критериев интерпретации результатов определения чувствительности “непривередливых” микроорганизмов (табл. 1).

Контроль качества при определении чувствительности

Контроль качества питательных сред. При контроле роста каждая серия чашек, предназначенная для постановки чувствительности, должна проверяться на пригодность для роста тестируемых микроорганизмов. Для этого используются контрольные штаммы *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 и *H. influenzae* ATCC 10211. Из суточных культур указанных бактерий готовят взвесь, соответствующую по мутности 0,5 по Мак-Фарланду и содержащую приблизительно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Из полученной микробной взвеси готовят серию последовательных разведений 1:10. Затем на приготовленные чашки высевают по 0,1 мл взвеси –5, –6, –7 разведений, содержащих соответственно 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 КОЕ/мл. При хороших питательных свойствах агара должен отмечаться рост микроорганизмов из –6, –7 разведений.

Контроль стерильности. Репрезентативное количество чашек из каждой партии проверяется на стерильность путем инкубации при температуре 30–35°C в течение 24 ч или более.

Проверка pH агара. В условиях рутинной работы лаборатории допустимо не контролировать pH приготовленного агара, если результаты тестирования контрольных штаммов находятся в

пределах допустимого диапазона значений.

Контроль катионного состава. Содержание двухвалентных катионов, прежде всего Ca²⁺ и Mg²⁺ в питательной среде должно быть строго стандартизированным (Ca²⁺ = 20–25 мг/л, Mg²⁺ = 10,0 – 12,5 мг/л). О содержании в среде двухвалентных катионов косвенно можно судить по результатам тестирования чувствительности контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 к аминогликозидам (диаметр зоны вокруг диска с гентамицином должен быть 16–21 мм).

Контроль качества определения чувствительности. Интегральный контроль качества определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам проводят путем тестирования контрольных штаммов.

В качестве контрольных используют штаммы американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection – ATCC), отличающиеся генетической стабильностью и хорошо изученными фенотипическими характеристиками.

Набор штаммов, используемых для контроля качества определения чувствительности “непривередливых” штаммов, включает:

- *Escherichia coli* ATCC 25922;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Штамм *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 используется для контроля качества при определении чувствительности гемофилов на НТМ агаре.

Допустимые значения диаметров зон и МПК для указанных контрольных штаммов приведены в табл. 2 (NCCLS, 1999).

Хранение контрольных штаммов. В условиях лаборатории штаммы должны храниться в

таким образом, чтобы возможность мутаций и контаминации культуры была минимальной. Для этого создается банк контрольных штаммов, предназначенный для длительного хранения. Для ежедневной рутинной работы используются регулярно субкультивируемые культуры.

Для длительного хранения штаммов существуют два основных способа.

Первый способ – приготовление суспензии микроорганизмов в стабилизирующем растворе (50% фетальной телячьей сыворотки в бульоне, 10–15% глицерина в триптиказо-соевом бульоне, дефибрированная баранья или кроличья кровь) и дальнейшее хранение в замороженном состоянии при температуре -70°C и ниже в морозильной камере или в жидком азоте.

Второй способ – длительное хранение контрольных штаммов в лиофилизированном виде.

Для непродолжительного хранения “рабочие” контрольные штаммы выращивают в пробирке со скошенным агаром (триптиказо-соевым или другим аналогичным для “непривередливых” микроорганизмов, шоколадным для “привередливых” бактерий), хранят в холодильнике при температуре $+2 - +8^{\circ}\text{C}$, и еженедельно субкультивируют.

Если “рабочие” контрольные штаммы контаминированы или результаты определения чувствительности контрольного штам-

ма не попадают в необходимые пределы и это не может быть объяснено нарушениями методики определения чувствительности, “рабочий” штамм должен быть заменен на свежий из банка контрольных штаммов.

Перед использованием для контроля качества определения чувствительности хранившийся контрольный штамм должен быть дважды субкультивирован на подходящих питательных средах.

Частота проведения контроля качества. Оптимальным является ежедневный контроль качества определения чувствительности с использованием набора контрольных штаммов параллельно с тестированием клинических изолятов. Если имеется документ, подтверждающий удовлетворительное качество тестирования, контроль можно проводить реже.

Документ должен подтверждать, что все контрольные штаммы тестировались в течение 30 последовательных дней и что для каждой комбинации антибиотик – микроорганизм не более 3 значений диаметров зон в течение 30 последовательных дней находились вне пределов, указанных в табл. 2. В этом случае допустимо тестировать каждый контрольный штамм еженедельно, а также при изменении партии агара или дисков.

Если при подобном тестировании результаты окажутся за пределами указанных границ, то необходимо вернуться к еже-

дневному контролю качества для определения причины получения неправильных результатов.

Полученные данные документируются. Документ должен содержать подтверждение того, что:

- выполнялось тестирование по крайней мере с 3 контрольными штаммами (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 и *P. aeruginosa* ATCC 27853);

- все значения диаметров зон, полученные в течение 5 последовательных дней, находятся в допустимых пределах.

В противном случае (если хотя бы один результат находится за пределами допустимых границ) необходимо продолжать ежедневный контроль качества. Для возвращения к еженедельному тестированию необходимо провести проверку в течение 30 последовательных дней.

Другие процедуры по контролю качества

Контроль чистоты роста культуры. Необходимо нанести каждый образец инокулюма на чашку с селективным агаром и инкубировать в течение 12–18 ч для того, чтобы убедиться в отсутствии роста другого микроорганизма. Для повторного тестирования можно использовать свежие колонии.

Контроль интерпретации диаметров зон. Периодически следует контролировать измерение диаметров зон, чтобы избежать ошибок в интерпретации.

Весь персонал, имеющий от-

Таблица 2. Допустимые пределы диаметров зон и МПК для контрольных штаммов (NCCLS, 1999)

Контрольный штамм	Ципрофлоксацин		Норфлоксацин	
	Ø зоны, мм	МПК, мг/л	Ø зоны, мм	МПК, мг/л
<i>E. coli</i> ATCC 25922	30–40	0,004–0,015	28–35	0,03–0,12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25–33	0,25–1	22–29	1–4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	22–30	–	17–28	–
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	–	0,12–0,5	–	0,5–2
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	34–42	0,004–0,03	–	–

ношение к определению чувствительности, должен обучаться и

тренироваться в чтении и интерпретации результатов. Получен-

ные результаты необходимо документировать и сравнивать.

Литература

1. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков. – М., 1983. – 16 с.
2. Acar J. F., Goldstein F. W. Disk Susceptibility Test // *Antibiotics in Laboratory Medicine*. – 4th ed. / Ed. V. Lorian. – 1996. – P. 1–51.
3. Jorgensen J. H., Sahn D. F. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Considerations //

- Manual of Clinical Microbiology. – 6th ed. / Ed. P. Murray. – 1995. – P. 1277–1280.
4. Manual on antimicrobial resistance and susceptibility testing. WHO. – Geneva, 1997. – 97 p.
 5. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. – 6th ed. – Approved Standard. NCCLS Document M2–A6. – 1997. – Vol. 17, N 1.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Ninths Informational Supplement. NCCLS Document M100–S9. – 1999. – Vol. 18, N 1.
7. Woods G. L., Washington J. A. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Methods // *Manual of Clinical Microbiology*. – 6th ed. / Ed. P. Murray. – 1995. – P. 1327–1341.

Приложение 1

Методика определения чувствительности к ципрофлоксацину диско-диффузионным методом

Тестируемые микроорганизмы:

– грам(+): *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки, *Enterococcus* spp.

– грам(–): *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. и другие энтеробактерии, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *H. influenzae*.

Используемый агар:

– грам(–) энтеробактерии и

Acinetobacter spp. – агар Мюллера–Хинтон или АГВ;

– *P. aeruginosa* и *Pseudomonas* spp. – агар Мюллера–Хинтон;

– стафилококки – агар Мюллера–Хинтон или АГВ;

– энтерококки – агар Мюллера–Хинтон;

– гемофильная палочка – среда НТМ (Haemophilus Test Medium).

Диски с антибиотиками: с ципрофлоксацином С1Р диаметром

6 мм, содержащие 5 мкг ципрофлоксацина в картриджах по 50 шт. производства BioMerieux или BBL.

Инокулом. Бактериальная взвесь из чистой суточной культуры, соответствующая стандарту мутности 0,5 по Мак-Фарланду.

Инокуляция чашек с агаром. Агар инокулируют в течение 15 мин после приготовления инокулома.

Рекомендуемый метод: бактериальную взвесь наносят на поверхность агара стерильным ватным тампоном в трех различных направлениях.

После инокуляции закрытые чашки оставляют на 15 мин на рабочем столе для абсорбции инокулома.

Апликация дисков. Диски располагают на расстоянии не

Критерии интерпретации результатов (Ø зоны, мм)

Микроорганизм	Резистентный, R	Умеренно-резистентный, I	Чувствительный, S
<i>Enterobacteriaceae</i>	≤15	16–20	≥21
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.	≤15	16–20	≥21
<i>Staphylococcus</i> spp.	≤15	16–20	≥21
<i>Enterococcus</i> spp.	≤12	13–16	≥17
<i>H. influenzae</i>	–	–	≥21

Контроль качества определения чувствительности (используют контрольные штаммы *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25922, *H. influenzae* ATCC 49247)

Контрольный штамм	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247
Ø зоны, мм	30–40	25–33	22–30	34–42

менее 2 см друг от друга и от края чашки, то есть не более 5–6 дисков на чашку диаметром 100 мм.

Инкубация:

– грамотрицательные энтеробактерии, *P. aeruginosa* и *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., ста-

филококки и энтерококки – при температуре 35°C в обычной атмосфере в течение 16–18 ч;

– гемофильная палочка – в течение 16–18 ч при температуре 35°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ (в эксикаторе со свечой или CO₂-инкубаторе).

Учет результатов. Измеряется диаметр зоны полного подавления роста с точностью до 1 мм.

Приложение 2

Методика определения чувствительности к норфлоксацину диско-диффузионным методом

Тестируемые микроорганизмы (изоляция из мочевыводящих путей и кишечника):

– грам(+): *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки, *Enterococcus* spp.

– грам(-): *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. и другие энтеро-

Acinetobacter spp. – агар Мюллера–Хинтон или АГВ;

– *P. aeruginosa* и *Pseudomonas* spp. – агар Мюллера–Хинтон;

– стафилококки – агар Мюллера–Хинтон или АГВ;

– энтерококки – агар Мюллера–Хинтон;

Диски с антибиотиками: норфлоксацином NOR диаметром

Критерии интерпретации результатов (Ø зоны, мм)

Микроорганизм	Резистентный, R	Умеренно-резистентный, I	Чувствительный, S
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	≤12	13–16	≥17
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.	≤12	13–16	≥17
<i>Staphylococcus</i> spp.	≤12	13–16	≥17
<i>Enterococcus</i> spp.	≤12	13–16	≥17

Контроль качества определения чувствительности (используют контрольные штаммы *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25922)

Контрольный штамм	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25922
Ø зоны, мм	28–35	22–29	17–28

бактерии, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.

Используемый агар:

– грам(-) энтеробактерии и

6 мм, содержащие 10 мкг норфлоксацина в картриджах по 50 шт. производства BioMerieux или BBL.

Инокулом. Бактериальная взвесь из чистой суточной культуры, соответствующая стандарту мутности 0,5 по Мак-Фарланду.

Инокуляция чашек с агаром. Агар инокулируют в течение 15 мин после приготовления инокулома.

Рекомендуемый метод: бактериальную взвесь наносят на поверхность агара стерильным ватным тампоном в трех различных направлениях.

После инокуляции закрытые чашки оставляют на 15 мин на рабочем столе для абсорбции инокулома.

Апликация дисков. Диски располагают на расстоянии не менее 2 см друг от друга и от края чашки, то есть не более 5–6 дисков на чашку диаметром 100 мм.

Инкубация. Энтеробактерии, *P. aeruginosa* и *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., стафилококки и энтерококки инкубируют при температуре 35°C в обычной атмосфере в течение 16–18 ч.

Учет результатов. Измеряется линейкой диаметр зоны полного подавления роста с точностью до 1 мм.