

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ
ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-
исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика
И.Н. Блохиной»

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К
АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ
ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ.
ПРАВИЛА И ОСОБЕННОСТИ**

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией Института биологии и
биомедицины для студентов ННГУ, обучающихся по специальностям
30.05.01 «Медицинская биохимия», 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.03
«Стоматология»

Нижегород
2025

УДК 579.6
ББК 28.4
О 62

О 62 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ. ПРАВИЛА И ОСОБЕННОСТИ / Авторы: Гординская Н.А., Зайцева Н.Н., Цыбусов С.Н., Полянина А.В., Борискина Е.В., Кравченко Г.А. Учебно-методическое пособие – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2025. – 35 с.

Рецензенты: д.м.н., профессор М.А. Позднякова
к.м.н., доцент Н.Ф. Бруснигина

Определение чувствительности микроорганизмов, возбудителей инфекционных заболеваний человека к антибактериальным препаратам, приобретает все более важное значение в связи с появлением и широким распространением антибиотикорезистентности у бактерий.

Исследования чувствительности микроорганизмов к антибиотикам осуществляется с целью обоснования целенаправленной индивидуальной антибактериальной терапии для лечения инфекционного процесса, а также с целью эпидемиологического наблюдения за распространением резистентности среди микроорганизмов и в процессе изучения эффективности новых препаратов.

Вопросы, разбираемые в данном учебно-методическом пособии, могут способствовать развитию клинического мышления студентов медицинских вузов, обучающихся по специальностям 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.03 «Стоматология», 30.05.01 «Медицинская биохимия».

Ответственный за выпуск:
председатель методической комиссии Института биологии и биомедицины
к.б.н., доцент **Е.Л. Воденева**

УДК 579.6
ББК 28.4

©Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| Введение..... | 5 |
| Глава 1. История создание антибактериальных препаратов..... | 6 |
| Глава 2. Классификация антибиотиков..... | 7 |
| Глава 3. Природная и приобретенная антибиотикорезистентность бактерий..... | 8 |
| Глава 4. Критерии определения уровня чувствительности микроорганизма к антибиотикам..... | 9 |
| Глава 5. Методы и особенности определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам..... | 12 |
| 5.1. Методы определения минимальной подавляющей концентрации..... | 12 |
| 5.2. Диско-диффузионный метод оценки чувствительности бактерий к антибиотикам..... | 14 |
| 5.3. Процедура приготовления агара Мюллера-Хинтон..... | 14 |
| 5.4. Контроль качества питательной среды..... | 16 |
| 5.5. Приготовление бактериальной суспензии (инокулюма)..... | 18 |
| 5.6. Инокуляция чашек с агаром Мюллера-Хинтон..... | 19 |
| 5.7. Нанесение дисков с антибиотиками..... | 20 |
| 5.8. Перечень контрольных штаммов микроорганизмов, рекомендуемых для выявления механизмов резистентности..... | 22 |
| 5.9. Измерение зон подавления роста и интерпретация результатов определения чувствительности..... | 22 |
| Заключение..... | 33 |
| Список рекомендуемой литературы..... | 34 |

Условные обозначения:

АБ – антибиотик

АБП – антибактериальный препарат

АМП – антимикробный препарат

ДДМ – диско-диффузионный метод

МПК – минимальная подавляющая концентрация

АТСС – Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection)

ЕСОФФ – эпидемиологическая точка отсечения (epidemiological cut-off values)

ЕУСАСТ – Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

ССУГ – коллекция культур Гетеборгского университета (Culture Collection University of Gothenborg, Sweden)

CLSI – институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA)

WT – дикий тип (wild type)

NWT – недикая тип (non-wild type)

МХ – агар Мюллера-Хинтон

МХ-П – агар Мюллера-Хинтон для прихотливых бактерий

MRSA – метициллинрезистентный *S.aureus*

MRSE – метициллинрезистентный *S.epidermidis*

VRE – ванкомицинрезистентный энтерококк

ВВЕДЕНИЕ

Распространение антимикробной резистентности среди возбудителей инфекций расценивается экспертами ВОЗ в качестве глобальной угрозы человечеству и серьезной проблемы общественного здравоохранения во всех регионах мира. Борьба с устойчивостью к антимикробным препаратам относится к одному из приоритетных направлений Стратегии научно-технического развития Российской Федерации. Особую опасность представляет возникновение и наблюдаемое в последние годы распространение устойчивости к антибиотикам широко распространенных условно-патогенных микроорганизмов и увеличение численности бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

Большое внимание уделяется в последние годы изучению устойчивости к антибиотикам тех бактерий, которые обитают в окружающей среде. Проблема распространения антибиотикоустойчивости в природе приобретает особое значение на фоне широкого применения антимикробных препаратов в ветеринарии и сельском хозяйстве. Распространение бактерий с множественной лекарственной устойчивостью диктует необходимость увеличения финансовых вложений для достижения стабилизации ситуации в конкретной медицинской организации, регионе, стране.

Ключевыми направлениями в борьбе с антибиотикорезистентностью является микробиологическое мониторинговое исследование инфекционных возбудителей, научные исследования и обмен информацией о локальном уровне устойчивости к антимикробным веществам и наиболее активных препаратах. Внедрение в клиническую практику значительного количества новых АБП и появление новых механизмов антибиотикорезистентности у микроорганизмов требует стандартизации процедуры тестирования, разработки новых критериев интерпретации результатов, внедрения системы внутреннего контроля качества на каждом этапе исследования. В настоящем учебно-методическом пособии представлены современные критерии определения чувствительности бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний, разработанных международными комитетами.

Учебно-методическое пособие предназначено для специалистов в области микробиологии, студентов медицинских вузов, обучающихся по специальностям 30.05.01 «Медицинская биохимия, 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.03 «Стоматология»

ГЛАВА 1. ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

В борьбе за существование микроорганизмы создали и усовершенствовали оружие, которое позволяет им отстаивать свою среду обитания. Это оружие – специальные вещества, названные антибиотиками. В процессе жизнедеятельности многие микроорганизмы образуют специфические продукты, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к другим видам, оказывая микростатический или микробоцидный эффект. Такие вещества называют антимикробными или антибиотиками. Наиболее часто активными продуцентами антибиотических веществ являются мицелиарные грибы, актиномицеты и спорообразующие бактерии.

Упоминания об использовании противовоспалительных свойств растений и плесневых грибов для лечения гнойных ран встречались с давних времен в трудах Авиценны, Парацельса и индийских знахарей эпохи Инков.

Исследования немецкого врача Пауля Эрлиха, опубликованные в 1897 году, стали основополагающими работами в изучении проблемы антимикробной терапии инфекционных заболеваний были сформулированы ведущие концепции, создавшие основу изучения антимикробных препаратов. П. Эрлих ввел такие понятия как «минимальная лечебная» доза антимикробного вещества и «максимально переносимая» доза, а также показал, что соединения, действующие на микроорганизмы, не обязательно должны вызывать их гибель, достаточным может быть предотвращение размножения. В 1929 году А. Флеминг проводя лабораторные исследования обнаружил на чашках Петри лизис колоний золотистого стафилококка вблизи колоний плесневого гриба *Penicillium notatum*. Флеминг сделал вывод, что плесень вырабатывает вещество, убивающее бактерии. Позднее, в 1938 году двум ученым из Оксфордского университета Эрнсту Чейну и Гоуарду Флори удалось получить пенициллин в стабилизированной форме и продемонстрировать его активность *in vitro*. В нашей стране Зинаида Виссарионовна Ермольева в 1942 году выделила из *Penicillium crustosum* антибиотик, превосходящий по активности иностранный препарат. Уникальное открытие пенициллина одновременно в нескольких странах воплотилось в жизнь производством лекарственных препаратов и началась, так называемая «эра антибиотикотерапии». Термин “антибиотики” ввел в обращение в 1952 году американский микробиолог З. Ваксман.

Основой терапевтического действия антибактериальных препаратов (АБП) является подавление жизнедеятельности микроорганизмов в результате угнетения какого-либо метаболического процесса. Взаимодействие происходит в результате связывания антибиотика (АБ) с мишенью, в качестве которой могут выступать различные ферменты, либо другие структурные молекулы микроорганизма.

ГЛАВА 2. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

Антибиотики – низкомолекулярные продукты метаболизма микроорганизмов, подавляющие рост других микроорганизмов. Основой терапевтического действия антибактериальных препаратов является подавление жизнедеятельности микроорганизмов в результате угнетения какого-либо метаболического процесса. Со времени открытия пенициллина началась новая эра в медицине. Благодаря антибиотикам, множество бактериальных инфекций перестали быть смертельными для человека. В середине XX века были открыты другие антибиотики, такие как стрептомицин, тетрациклин и эритромицин. С развитием науки и технологий стало возможным создание новых, более эффективных антибиотиков. В настоящее время в России используются антибиотики более 30 различных групп, а общее число препаратов превышает две сотни.

Существует несколько видов классификации АБП: по происхождению (природные, полусинтетические, синтетические), по химическому строению (β -лактамы, аминогликозиды, хинолоны и другие), по спектру действия (на грамположительные, на грамотрицательные микроорганизмы), по типу воздействия на микробную клетку (бактерицидные, бактериостатические) и по механизму действия.

По механизму действия на бактериальную клетку среди антибиотиков выделяют:

- препараты, блокирующие клеточную стенку бактерий;
- препараты, блокирующие синтез белка в клетке;
- препараты, ингибирующие ДНК-гиразы и топоизомеразы;
- препараты, ингибирующие РНК-полимеразу;
- препараты, вызывающие повреждение мембран бактериальной клетки.

Несмотря на различия в химической структуре и механизме действия все антимикробные препараты объединяет ряд специфических свойств. Наиболее важным является то, что мишень их действия находится в клетках микроорганизма, а не в тканях человека и что активность антимикробных препаратов не является постоянной, а может снижаться, что обусловлено формированием устойчивости у микроорганизмов.

ГЛАВА 3. ПРИРОДНАЯ И ПРИОБРЕТЕННАЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ

После открытия пенициллина медицина столкнулась с новой проблемой – снижение эффективности ранее отлично «работавших» антибиотиков. Это связано с тем, что бактерии постоянно эволюционируют, вырабатывая природные генетические механизмы противостояния лекарственным препаратам. Число новых генераций микробов, «устойчивых» к даже самым сильным антибиотикам, с каждым годом неумолимо растет. В настоящее время во всем мире наблюдается совершенно объективный процесс: глобальный рост антибиотикорезистентности (устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам).

Резистентность микроорганизмов к антибактериальным препаратам может быть природной и приобретенной.

Природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени действия антибиотика или недоступности мишени вследствие первично низкой проницаемости или ферментативной инактивации. При наличии у бактерий природной устойчивости антибиотики клинически неэффективны. Природная резистентность является постоянным видовым признаком микроорганизмов и легко прогнозируется. Так к природным пенициллинам, устойчивы энтеробактерии, энтерококки, микоплазмы. К цефалоспорином I поколения устойчивы неферментирующие Гр- палочки, энтерококки, серрации, листерии. К цефалоспорином II поколения устойчивы неферментирующие Гр- палочки, энтерококки, листерии, *S.difficile*. К цефалоспорином III и IV поколений устойчивы энтерококки. К карбапенемам устойчивы энтерококки, а к эртапенему еще и неферментирующие Гр- палочки. К монобактамам устойчивы все Гр+ микроорганизмы, а к гликопептидам - все Гр- бактерии. К полимиксином устойчивы протеи, Гр- кокки, Гр+ микроорганизмы, микобактерии. К аминогликозидам устойчивы пневмококки и анаэробные бактерии. К тетрациклином устойчивы неферментирующие Гр- палочки, протеи, микобактерии. К макролидам устойчивы энтерококки, неферментирующие Гр- палочки. К линкозамидам устойчивы Гр- палочки, энтерококки.

Приобретенная устойчивость – это свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Возможны ситуации, когда большая часть микробной популяции проявляет приобретенную устойчивость. Появление у бактерий приобретенной резистентности не обязательно сопровождается снижением клинической эффективности антибиотика. Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически: приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов.

ГЛАВА 4. КРИТЕРИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМА К АНТИБИОТИКАМ

Основной целью определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (АМП) *in vitro* является прогнозирование их эффективности при лечении инфекций у конкретных пациентов *in vivo*. Анализ чувствительности также проводят с целью эпидемиологического наблюдения за распространением резистентности среди микроорганизмов и в процессе изучения эффективности новых препаратов.

С целью оценки чувствительности микроорганизмов к антибиотикам *in vitro* разработаны международные критерии, которые регламентированы специальными документами. Критерии оценки (МПК – минимальные подавляющие концентрации препаратов и диаметры зоны подавления роста вокруг диска с препаратом) ежегодно пересматриваются Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), Американским институтом клинических лабораторных стандартов (CLSI) и Российской ассоциацией клинических микробиологов и химиотерапевтов.

Использование унифицированных методов определения чувствительности и подходов к интерпретации результатов является необходимым условием для формирования единой системы обработки, анализа, составления отчетов и обмена данными для повышения эффективности системы мониторинга за антибиотикорезистентностью.

В настоящее время теоретически наиболее обоснованным является комплекс подходов к оценке чувствительности бактерий и интерпретации результатов, предлагаемый Европейским комитетом по определению чувствительности к антибиотикам. Наряду с корректным термином «антимикробный препарат» EUCAST допускает использование традиционного термина «антибиотик», к которым относят вещества природного, полусинтетического или синтетического происхождения (последние в строгом смысле относятся к химиотерапевтическим препаратам), проявляющие избирательную активность в отношении бактерий, и потенциально применимые для лечения инфекционных болезней. Антисептики, дезинфицирующие средства и консерванты к антибиотикам не относятся. Широко используемый в русскоязычной литературе термин «антибиотикочувствительность» следует рассматривать как аналог используемого в документах EUCAST термина «antimicrobial susceptibility» (чувствительность к антимикробным препаратам), а термин «определение чувствительности к антибиотикам» – как аналог термина «antimicrobial susceptibility testing» (исследование чувствительности к антимикробным препаратам). Основным параметром, характеризующим взаимоотношения между микроорганизмом и антибиотиком, является величина минимальной подавляющей концентрации препарата. МПК – это минимальная концентрация антибиотика, подавляющая видимый рост микроорганизма *in vitro*.

Относительно значений МПК, установленных референтным методом микроразведений в бульоне, «калибруются» как наиболее распространенный в рутинной практике диско-диффузионный метод (ДДМ), так и различные коммерческие методы определения чувствительности к антибиотикам.

Идеология системы оценки чувствительности к антибиотикам основана на признании факта существования различий между микробиологической и клинической чувствительностью / устойчивостью микроорганизмов. Результаты оценки антибиотикочувствительности бактерий, полученные с помощью референтного метода, используют для обоснования микробиологических и клинических критериев оценки чувствительности. С микробиологической точки зрения в пределах популяций отдельных видов бактерий выделяют следующие типы:

- Дикий тип (wild type - WT), к которому относятся микроорганизмы, не имеющие мутационных или других приобретенных механизмов устойчивости к конкретному антибиотику.
- Недикакий тип (non-wild type - NWT), к которому относятся микроорганизмы, обладающие мутационными или другими приобретенными механизмами устойчивости к конкретному антибиотику.

Принадлежность микроорганизма к одному из данных типов определяется на основании значений МПК антибиотиков, получивших название «эпидемиологические точки отсечения» (epidemiological cut-off values – ECOFF). ECOFF это наибольшее значение МПК (или наименьшее значение диаметра зоны подавления роста) микроорганизма, не имеющего фенотипически выявляемых приобретенных механизмов резистентности к данному препарату. Значения ECOFF для конкретных комбинаций микроорганизм-антибиотик определяют статистическими методами на основании анализа характера распределения МПК антибиотика в отношении репрезентативной выборки изолятов соответствующего микроорганизма. Эти значения являются постоянными видовыми признаками микроорганизмов и не зависят от изменяющихся обстоятельств. Значения ECOFF используются для дифференциации микроорганизмов, обладающих и не обладающих приобретенными механизмами резистентности, и сами по себе не позволяют прогнозировать их чувствительность к антибиотику.

С практической точки зрения более важным является классификация возбудителей инфекции по клиническим категориям чувствительности на основании вероятности клинической эффективности препарата. Для этой цели устанавливаются клинические пограничные значения МПК и соответствующие диаметры зон подавления роста, для обоснования которых изучаются закономерности соотношений между величиной МПК антибиотика для конкретного возбудителя, фармакологическими (фармакокинетическими / фармакодинамическими) характеристиками препарата и эффективностью лечения.

В настоящее время выделяют следующие клинические категории чувствительности микроорганизма к антибиотику:

Чувствительный при стандартном режиме дозирования: (Ч)/Susceptible, standard dosing regimen (S) - микроорганизм оценивается как «Чувствительный при стандартном режиме дозирования» при высокой вероятности эффективности терапии при стандартном режиме дозирования.

Чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата: (У)/Susceptible, Increased exposure (I) - микроорганизм оценивается как «Чувствительный при увеличенной экспозиции», при высокой вероятности эффективности терапии при увеличении экспозиции препарата путем коррекции режима дозирования или благодаря его концентрации в очаге инфекции.

Резистентный: (Р)/Resistant (R) - микроорганизм оценивается как «Резистентный» при высокой вероятности терапевтической неудачи даже при увеличенной экспозиции препарата.

Экспозиция отражает зависимость влияния антимикробного препарата на микроорганизм в очаге инфекции при разных путях введения, дозах, интервалах дозирования, продолжительности инфузии препарата, а также его распределения в организме и пути выведения.

Пограничные значения для оценки клинических категорий чувствительности/устойчивости (МПК и ДДМ) могут изменяться при появлении новых данных о фармакокинетике и фармакодинамике антибиотиков и рекомендаций по режиму их применения. Эти определения категорий чувствительности должны использоваться только при условии соблюдения методологии исследования и оценки результатов в соответствии с данными методических рекомендаций. При использовании данных категорий и соответствующих пограничных значений МПК или ДДМ для терапии могут использоваться антибиотики, чувствительность возбудителя к которым оценена как «Ч» («S»), так и «У» («I»).

Категория «У» («I») означает, что экспозиция препарата должна быть увеличена. В большинстве случаев (за исключением инфекций мочевых путей) это требует увеличения дозы, уменьшения интервала дозирования или изменения пути введения, например, с перорального на в/в или с короткого времени в/в инфузии на продленную инфузию.

Для препаратов, экспозиция которых не может быть значимо увеличена, категория «У» («I») не существует!

Оценка антибиотикочувствительности, независимо от конкретного метода, предполагает последовательное выполнение нескольких этапов:

- приготовление питательных сред;
- приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма);
- инокуляция;
- инкубация;
- учет и интерпретация результатов, формулировка рекомендаций по выбору препарата для лечения.

ГЛАВА 5. МЕТОДЫ И ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

Существуют несколько методов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Современные стандартизованные методы определения чувствительности к АМП подразделяют на методы серийных разведений и диффузионные.

Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего активность АМП величину его минимальной подавляющей концентрации (МПК).

5.1. Методы определения минимальной подавляющей концентрации

Минимальная концентрация антибиотика, подавляющая видимый рост микроорганизма, – основной параметр, характеризующий взаимоотношения между микроорганизмом и антибиотиком *in vitro* при стандартных концентрациях того и другого.

Основным методом определения МПК является метод последовательных разведений. Для определения МПК заданные концентрации антибиотика (чаще всего с 2-кратным шагом) вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста в присутствии различных концентраций антибиотика. Известны два основных варианта постановки метода последовательных разведений: в агаре и в бульоне. Метод последовательных разведений в бульоне, в свою очередь, может выполняться в макро- и микро-варианте (в объеме $\leq 0,2$ мл). Метод последовательных микроразведений в бульоне является референтным методом определения МПК и регламентируется международным стандартом ISO 20776-1:2019 (Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.). В Российской Федерации Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации от 10 ноября 2022 г. N 1266-ст утвержден и введен в действие Национальный Стандарт ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022, идентичный международному стандарту.

Для определения МПК неприхотливых бактерий следует использовать метод микроразведений в бульоне в точном соответствии с ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022; для определения МПК прихотливых бактерий (*Streptococcus* spp., включая *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella* spp., *Kingella kingae*, *Aerococcus* spp., *Campylobacter* spp. и др.) - эту же методологию с использованием бульона Мюллера-Хинтон (МХ) с добавлением лизированной лошадиной крови и бета-НАД (бульон МХ для прихотливых бактерий, МХ-П).

В настоящее время для практических лабораторий доступен целый ряд методов определения МПК с использованием коммерческих расходных материалов, например, коммерческие варианты метода микроразведений в бульоне, градиентный метод, полуавтоматические устройства и т.д. Качество коммерческих продуктов должно быть гарантировано производителем и соответствовать требованиям международного стандарта ISO 20776-2 (2021), а контроль качества результатов, получаемых при их использовании в лаборатории, является ответственностью пользователей.

Наиболее широко для практических целей используется метод Е-тестов. Е-тест представляет собой полоску полимера, на которую нанесен градиент концентраций АБП (от минимальных до максимальных). Подавление роста микроорганизма вокруг полоски Е-теста происходит только в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из носителя, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Значения концентрации АБП в каждом участке полоски производителем набора нанесены на наружной поверхности Е-теста. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к полоске (рис. 1).



Рис. 1. Определение МПК с помощью Е-тестов

5.2. Дisko-диффузионный метод оценки чувствительности бактерий к антибиотикам

ДДМ является одним из первых методов, разработанных для определения чувствительности к антибиотикам и до настоящего времени наиболее распространенным в практических бактериологических лабораториях. Метод

может применяться для исследования большинства бактериальных возбудителей, в том числе и наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями. ДДМ является универсальным для широкого круга антибиотиков и не требует использования специального оборудования.

ДДМ является стандартизированным методом, в основе которого лежат принципы, изложенные в отчете о Международном совместном исследовании по определению чувствительности к антибиотикам 1972г. и опыт работы экспертных лабораторий во всем мире.

Для получения достоверных результатов необходимо четко следовать методике без каких-либо отступлений.

Приготовление и хранение питательной среды: для оценки чувствительности бактерий к антибиотикам следует использовать агар Мюллера-Хинтон без дополнительных ингредиентов (добавок) - для бактерий с обычными питательными потребностями и с добавлением 5% механически дефибрированной лошадиной крови и 20 мг/л β -НАД для бактерий со сложными питательными потребностями (агар Мюллера-Хинтон для прихотливых бактерий, МХА-П): *Streptococcus* spp. (включая *Streptococcus pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* и *coli*, *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp., *Aerococcus sanguinicola* и *urinae* и *Kingella kingae*.

Возможно использование коммерческих готовых питательных сред в чашках Петри, а также приготовление чашек Петри с питательной средой непосредственно в лаборатории из дегидратированной среды в соответствии с инструкцией производителя, для прихотливых бактерий. Дегидратированная среда Мюллера-Хинтон должна соответствовать требованиям Технического стандарта ИСО, ИСО/ТС 16782 2016 и критериям контроля качества. Для определения чувствительности анаэробных бактерий диско-диффузионным методом рекомендует использовать агар для прихотливых анаэробных бактерий (Fastidious Anaerobe Agar, FAA).

5.3. Процедура приготовления агара Мюллера-Хинтон

Материалы:

- Агар МХ сухой, полученный из коммерческих источников.
- Механически дефибрированная лошадиная кровь.
- Бета-никотинамидадениндинуклеотид (β -НАД), чистота $\geq 98\%$.

Приготовление основного раствора бета-НАД:

- Растворить необходимое количество β -НАД в стерильной деионизированной воде для получения раствора с концентрацией 20 мг/мл (основной раствор).

- Простерилизовать раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.
- Основной раствор можно хранить в аликвотах при температуре -20°C и размораживать по мере необходимости. Нельзя повторно замораживать неиспользованный раствор.

Приготовление чашек с агаром:

- Приготовить и автоклавировать агар МХ согласно инструкции производителя.
- Охладить агар до 42-45°C.
- Для приготовления агара МХ-П к 1 л среды асептически добавить 50 мл механически дефибрированной лошадиной крови и 1 мл основного раствора β-НАД. Тщательно перемешать и сразу разлить по чашкам.
- Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливают на строго горизонтальную поверхность, выверенную по уровню, без впадин и выпуклостей. Соблюдение указанных предосторожностей необходимо в связи с тем, что размер и форма зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.
- Разлив среды в стерильные чашки Петри производят таким образом, чтобы толщина слоя агара составляла $4,0 \pm 0,5$ мм (приблизительно 25 мл в круглую чашку диаметром 90 мм, 31 мл – в круглую чашку диаметром 100 мм, 71 мл - в круглую чашку диаметром 150 мм, 40 мл - в квадратную чашку размером 100 × 100 мм). Точный объем среды для каждого типа чашек рассчитывается на основании измерения истинной глубины слоя агара, получающейся в используемых в лаборатории чашках Петри. Размеры чашек могут отличаться у разных производителей.
- После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания.
- Не следует перемещать чашки до полного застывания агара.

Перед использованием необходимо убедиться, что поверхность агара сухая. На поверхности агара или на внутренней стороне крышки не должно быть видимых капель влаги. При необходимости чашки следует подсушить при 35°C с открытыми крышками в течение 10-15 мин. Чашки нельзя пересушивать!

Хранение чашек с агаром:

Чашки с агаром, приготовленные в лаборатории, хранят в холодильнике при 4-8°C.

Процедура подсушивания, условия и длительность хранения чашек с агаром, приготовленных в лаборатории, должны быть определены программой внутрилабораторного контроля качества.

Готовые чашки с агаром коммерческого производства должны храниться в соответствии с инструкциями производителя и использоваться до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Для чашек с агаром (коммерческого производства или приготовленные в лаборатории), хранящихся в плотно закрытых контейнерах или пластиковых пакетах, может потребоваться подсушивание перед использованием, так как при высокой влажности поверхности среды возможно формирование нечеткого края зоны подавления роста и втулеобразного роста внутри зоны подавления.

5.4. Контроль качества питательной среды

Проверка pH среды. С помощью поверхностно-активного электрода следует убедиться в том, что pH среды находится в пределах 7,2-7,4.

Необходимо проверить глубину (толщину) слоя агара. Требуемая толщина слоя агара должна быть $4,0 \pm 0,5$ мм.

Изучение ростовых свойств. Необходимо проверить, что среда обеспечивает надлежащий рост контрольного(ых) микроорганизма(ов) тех видов, для определения чувствительности которых она предназначена. Контроль качества с использованием рекомендованных контрольных штаммов и оценку соответствия диаметров зон подавления роста допустимым диапазонам необходимо выполнять для всех исследуемых комбинаций микроорганизм-антибиотик.

Перечень контрольных штаммов микроорганизмов, рекомендуемых для повседневной программы контроля качества:

1. *Escherichia coli*

ATCC 25922, Чувствительный, дикий тип

2. *Escherichia coli*

ATCC 35218, Продуцент TEM-1, устойчивый к ампициллину

3. *Klebsiella pneumoniae*

ATCC 700603, Продуцент ESBL (SHV-18) (для контроля ингибирующего компонента дисков с комбинациями бета-лактамов и ингибиторов бета-лактамаз)

4. *Klebsiella pneumoniae*

ATCC BAA-2814, Продуцент KPC-3, SHV-11 и TEM-1

5. *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853, Чувствительный, дикий тип

6. *Staphylococcus aureus*

ATCC 29213, Слабый продуцент бета-лактамаз

7. *Enterococcus faecalis*

ATCC 29212, Чувствительный, дикий тип

8. *Streptococcus pneumoniae*

ATCC 49619, Сниженная чувствительность к бензилпенициллину

9. *Haemophilus influenzae*

ATCC 49766, Чувствительный, дикий тип.

Периодичность контроля качества:

Контроль качества (КК) определения чувствительности с использованием набора рекомендованных контрольных штаммов следует проводить ежедневно, или как минимум 4 раза в неделю для тех антибиотиков, которые включены в стандартные панели (наборы).

Учет и оценку результатов контрольных исследований необходимо выполнить до учета результатов клинических изолятов и сообщения результатов исследования лечащему врачу.

Дополнительно к ежедневному контролю качества, необходимо проводить контроль качества каждой новой партии агара Мюллера-Хинтон и убедиться, что диаметры зон подавления роста находятся в пределах допустимых диапазонов. Кроме того, для каждой новой партии приготовленной среды необходимо убедиться, что толщина слоя агара в чашках Петри находится в допустимых пределах. Для регулярного использования, второй - как резервный («архивная» пробирка). Каждую неделю следует субкультивировать штамм из пробирки, предназначенной для регулярного использования, на соответствующей неселективной среде. После контроля чистоты культуры этот рассев должен использоваться ежедневно для подготовки субкультуры контрольного штамма в течение недели. Прихотливые микроорганизмы, жизнеспособность которых не сохраняется при хранении на чашках в течение недели, следует субкультивировать последовательно ежедневно, используя для пересева суточную культуру. Контрольные штаммы можно субкультивировать максимально в течение 6 дней. Затем следует утилизировать чашки и приготовить новую чашку, взяв культуру из пробирки, хранящейся в заморозке. Когда содержимое пробирки для регулярного использования будет практически израсходовано, следует субкультивировать культуру из резервной пробирки и из данной субкультуры приготовить другую пробирку для регулярного использования. Для субкультивирования контрольного штамма следует брать несколько колоний, чтобы избежать селекции мутантных вариантов. Для КК определения чувствительности следует использовать суточную (16–20 ч) культуру контрольного штамма. При работе с контрольными штаммами необходимо соблюдать все требования, предъявляемые к проведению работ с клиническими изолятами. Контроль качества определения чувствительности с использованием набора рекомендованных контрольных штаммов следует проводить ежедневно, или как минимум 4 раза в неделю для тех антибиотиков, которые включены в стандартные панели (наборы).

5.5. Приготовление бактериальной суспензии (инокулюма)

Для приготовления инокулюма используется метод суспендирования колоний, выросших на плотной питательной среде, в стерильном изотоническом растворе NaCl до плотности 0,5ЕД, измеренной на

денсиламетре или по коммерческому *стандарту мутности МакФарланда*, или приготовленному в лаборатории (0,5 мл раствора $BaCl_2$ в концентрации 0,048 моль/л (1,175% раствор $BaCl_2 \times 2 H_2O$) медленно при тщательном перемешивании соединить с 99,5 мл раствора H_2SO_4 с концентрацией 0,18 моль/л (0,36N) (1% по объему) до получения гомогенной суспензии). Правильность приготовления суспензии необходимо проверить на спектрофотометре (поглощение при использовании кюветы 1 см должно составить 0,08 – 0,13 при длине волны 625 нм), или измеренной на денсиламетре (рис.2).



Рис. 2. Определение плотности микробной взвеси на денсиламетре

Плотность микробной взвеси, равная 0,5 ЕД по МакФарланду приблизительно соответствует нагрузке $1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Хранить пробирки с коммерческим или приготовленным в лаборатории стандартом мутности необходимо в темноте при комнатной температуре. Непосредственно перед использованием стандарт необходимо тщательно встряхивать и оценивать однородность суспензии. При появлении видимых частиц пробирки изымаются из употребления.

Стандарт мутности, приготовленный в лаборатории, необходимо обновлять или проверять его оптическую плотность после 6 месяцев хранения.

Данный метод может быть использован для приготовления суспензий всех бактерий, включая прихотливые.

Для приготовления инокулюма стерильной бактериологической петлей или хлопковым тампоном необходимо собрать колонии, выросшие на неселективном агаре в течение 16-20 ч. По возможности следует собирать несколько морфологически идентичных колоний, чтобы избежать отбора атипичных вариантов. Суспендировать полученный материал в стерильном изотоническом растворе и тщательно перемешать до получения однородной мутности (можно на вортексе). Довести плотность бактериальной суспензии до 0,5 (допустимые вариации - 0,4-0,6) по стандарту мутности МакФарланда путем

добавления в суспензию микробной массы или разбавления ее стерильным изотоническим раствором.

Использование суспензии более высокой или низкой плотности может приводить к формированию зоны подавления роста меньшего или большего диаметра, соответственно!

Для приготовления суспензии *Streptococcus pneumoniae* предпочтительно использовать колонии, выросшие на кровяном агаре. В этом случае плотность суспензии должна соответствовать 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. При использовании культуры, выросшей на шоколадном агаре, плотность суспензии должна быть доведена до 1,0 (допустимые вариации - 0,9-1,1) по стандарту мутности МакФарланда. Оптимально бактериальную суспензию следует нанести на агар в течение 15 минут, но не позже, чем через 60 минут после ее приготовления.

5.6. Инокуляция чашек с агаром Мюллера-Хинтон

Перед инокуляцией необходимо убедиться, что чашки с агаром достигли комнатной температуры. Бактериальную суспензию следует нанести на агар не позже, чем через 15 минут после приготовления (Правило 15-15-15 минут: инокулировать суспензию на агар в течение 15 минут после приготовления, нанести диски в течение 15 минут после инокуляции чашек с агаром, начать инкубацию в течение 15 минут после нанесения дисков).

Бактериальную суспензию нельзя наносить на агар позже 60 минут после ее приготовления!

Погрузить стерильный хлопковый тампон в суспензию.

При работе с грамотрицательными бактериями, чтобы избежать нанесения избыточного количества суспензии, следует тщательно отжать тампон о внутренние стенки пробирки.

При работе с грамположительными бактериями не следует отжимать тампон о внутренние стенки пробирки.

Суспензию можно наносить на чашку с агаром с помощью дозатора с наконечников в объеме 0,5 мл.

При нанесении одной и той же суспензии на несколько чашек с агаром, следует повторить процедуру, описанную в предыдущем пункте для каждой чашки.

- Инокуляция чашек может производиться вручную путем равномерного нанесения суспензии штриховыми движениями на всю поверхность агара в трех направлениях или с использованием автоматического вращающего устройства. Важно чтобы суспензия была равномерно распределена по всей поверхности агара и между штрихами не оставалось промежутков. Особенно это имеет значение при работе с грамположительными бактериями.

- Диски на поверхность агара необходимо нанести не позже, чем через 15 минут после инокуляции агара. Длительное нахождение инокулированных чашек при комнатной температуре может привести к началу роста бактериальной культуры и ложному уменьшению зоны подавления роста.

5.7. Нанесение дисков с антибиотиками

Требуемые концентрации антибиотиков в дисках представлены в таблицах критериев определения зон задержки роста и пограничных значений МПК действующих руководств.

Флаконы (картриджи) с дисками следует извлекать из холодильника за 1 час до начала работы. Чтобы избежать быстрого снижения качества дисков из-за образования конденсата на них, не следует открывать картриджи или контейнеры для хранения дисков до достижения ими комнатной температуры.

Диски с антибиотиками должны быть нанесены на поверхность агара не позже, чем через 15 минут после инокуляции бактериальной суспензии.

Контакт диска с агаром должен быть полным и плотным. После нанесения на поверхность агара диски нельзя передвигать, так как диффузия антибиотика в среду начинается очень быстро.

Количество дисков на одной чашке Петри должно быть ограниченным для предотвращения перекрытия зон подавления роста и взаимодействия между антибиотиками. Очень важно обеспечить возможность точного измерения диаметров зон подавления роста. Максимальное количество дисков на одной чашке Петри зависит от вида микроорганизма и исследуемых антибиотиков. ***На одну чашку диаметром 90 мм следует помещать не более 6 дисков, а на чашку диаметром 150 мм - не более 12 дисков.***

Для выявления индуцибельной устойчивости к клиндамицину у стафилококков и стрептококков, диски с эритромицином и клиндамицином следует расположить на расстоянии 12-20 мм между краями дисков для стафилококков, и 12-16 мм - для стрептококков.

Снижение активности АМП в дисках приводит к уменьшению диаметра зон подавления роста, что является одной из самых распространенных ошибок. При хранении дисков необходимо соблюдать следующие правила:

- хранить диски (включая диспенсеры с дисками) необходимо в закрытых сухих контейнерах с индикаторным влагопоглотителем, защищенных от действия света (некоторые препараты, например, метронидазол, хлорамфеникол и фторхинолоны, инактивируются при длительном воздействии света);

- основное количество дисков с антибиотиками должно храниться в соответствии с рекомендациями производителя. Некоторые препараты являются менее стабильными (например, амоксициллин-клавулановая кислота карбапенемы) и могут требовать специальных условий хранения;

- рабочие наборы дисков следует хранить в соответствии с инструкцией производителя. После открытия упаковки диски должны быть использованы в течение времени, указанного производителем. По истечении срока годности, указанного на упаковке, диски должны быть уничтожены;

- для контроля надлежащей сохранности активности дисков с антибиотиками во время хранения необходимо проводить регулярный контроль качества рабочих материалов.

Инкубация: перед инкубацией следует перевернуть чашки дном кверху и убедиться, что диски не падают с поверхности агара. Начать инкубацию следует не позже, чем через 15 минут после нанесения дисков с антибиотиками. Предиффузия АМП в агар в случае нахождения чашек при комнатной температуре после нанесения дисков может быть причиной ошибки определения чувствительности – получения зон подавления роста большего диаметра.

Расположение чашек Петри в термостате (в частности, количество чашек в одной стопке) может привести к их неравномерному нагреву. Учитывая разную степень точности работы термостатов, контроль этого этапа исследования, включая количество чашек в каждой стопке, должен быть частью программы внутри лабораторного контроля качества. Для большинства термостатов **пять чашек в стопке является оптимальным количеством.**

Условия инкубации для разных групп бактерий. Подавляющее большинство бактерий инкубируют при $35\pm 1^\circ\text{C}$ в обычной атмосфере 18 ± 2 часа. Стрептококки, гемофильные палочки, моракселлы, коринебактерии и листерии рекомендуется инкубировать при $35\pm 1^\circ\text{C}$ в атмосфере с 4-6% CO_2 в течении 18 ± 2 часов.

Контроль качества проведения исследования после инкубации: при соблюдении правил подготовки бактериальной суспензии и инокуляции чашек с агаром должен сформироваться равномерный сплошной бактериальный слой (газон).

Формирование отдельных колоний вместо сплошного роста свидетельствует о недостаточной плотности суспензии. В этом случае исследование необходимо повторить.

Газон должен быть равномерным на всей поверхности агара. Край зоны подавления роста вокруг дисков с антибиотиками должны иметь форму окружности. Край зон подавления роста должны быть ровными (не зубчатыми).

До определения результатов чувствительности исследуемых микроорганизмов, необходимо оценить соответствие диаметров зон подавления роста контрольных штаммов допустимым значениям.

В качестве контрольных используют штаммы, отличающиеся генетической стабильностью и хорошо изученными фенотипическими характеристиками, в том числе и уровнем чувствительности к АБП. Если при исследовании чувствительности к АБП контрольных штаммов получены значения МПК или диаметров зон подавления роста, соответствующие паспортным характеристикам этих штаммов, то это свидетельствует о стандартности условий постановки эксперимента. Результаты определения чувствительности клинических изолятов, полученные в этих условиях, следует признать достоверными. Выбор референтных штаммов для проведения контроля качества тестирования определяется видом исследуемого микроорганизма.

5.8 Перечень контрольных штаммов микроорганизмов, рекомендуемых для выявления механизмов резистентности

Klebsiella pneumoniae

ATCC 700603

Продуцент ESBL (SHV-18)

Staphylococcus aureus

CCUG 67181

mecA-положительный, гетеро-резистентный MRSA

Enterococcus faecalis

ATCC 51299

Высокий уровень резистентности к аминогликозидам (HLAR) и резистентность к ванкомицину (*vanB*-положительный)

Haemophilus influenzae

ATCC 49247

Сниженная чувствительность к β -лактамам за счет мутаций ПСБ

5.9 Измерение зон подавления роста и интерпретация результатов определения чувствительности

При измерении зон подавления роста вокруг дисков с любыми АМП следует ориентироваться на зону полного подавления роста микроорганизмов (если другое не указано в разделе «Измерение диаметров зон подавления роста: особые ситуации»), определяемую невооруженным глазом, при расположении чашки на расстоянии примерно 30 см от глаз с помощью штангенциркуля или специальной линейки (Рис.3). Учет результатов можно облегчить, наклонив чашку под углом 45° к рабочей поверхности.

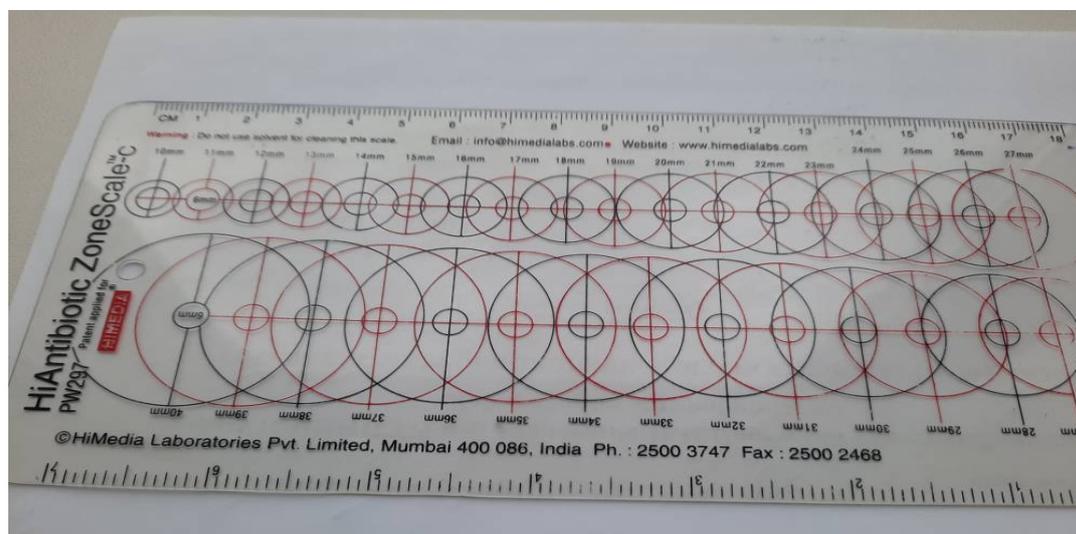


Рис. 3. Линейка для измерения зоны задержки роста

Измерение зон подавления роста на агаре МХ без добавок проводят в отраженном свете. Чашку Петри с закрытой крышкой располагают дном кверху над темной матовой поверхностью (рис. 4).



Рис. 4. Измерение зоны задержки роста на темном фоне

Измерение зон подавления роста на агаре МХ-П с добавками проводят в отраженном свете. Чашку Петри помещают дном книзу, крышку снимают (рис. 5).



Рис. 5. Измерение зоны задержки роста в проходящем свете

Не следует учитывать результаты в проходящем свете или использовать увеличительное стекло, если это не предусмотрено методикой.

Измерение зон подавления роста необходимо проводить с точностью до миллиметра при помощи специальной линейки или штангенциркуля.

Используемые автоматические устройства для учета результатов должны быть калиброваны по отношению к визуальному учету.

Измерение диаметров зон подавления роста (особые ситуации): при формировании изолированных колоний внутри зоны подавления роста следует убедиться в чистоте культуры и при необходимости повторить исследование. Если культура чистая, колонии внутри зоны следует учитывать при измерении диаметра зоны подавления роста (рис.6).



Рис. 6. Зона подавления роста учитывается по внутреннему диаметру роста единичных колоний

При формировании двойной зоны подавления роста следует убедиться в чистоте культуры и при необходимости повторить исследование. Если культура чистая, измерение диаметра следует проводить по внутреннему краю зоны подавления роста (рис.7).



Рис. 7. Двойная зона подавления роста

При определении чувствительности *Proteus* spp. роение внутри зоны не принимается во внимание. Учет результатов проводится по краю зоны подавления роста.

При формировании нечеткого края зоны подавления роста чашку располагают над темной поверхностью на расстоянии около 30 см от глаз, границу зоны определяют невооруженным глазом. Не следует подносить чашку к источнику света (учитывать в проходящем свете) или использовать увеличительное стекло. Учет нечетких зон подавления роста для *Enterobacterales* и *Staphylococcus* spp. проводится по внутреннему краю наименее заметного роста бактерий (рис. 8, 9).



Рис. 8. Энтеробактерии



Рис. 9. Стафилококк

При определении чувствительности *Streptococcus pneumoniae* мелкие колонии, видимые невооруженным глазом с расстояния 30 см при повороте чашки под углом 45° по отношению к рабочей поверхности, должны

учитываться при измерении зоны подавления роста. Их присутствие вблизи края зоны может быть связано с чрезмерной влажностью агара МХ-П. Для уменьшения этого эффекта чашки следует подсушивать перед использованием (рис. 10).



Рис. 10. Измерение зоны задержки роста при определении чувствительности бета-гемолитического стрептококка

При определении чувствительности гемолитических стрептококков на агаре МХ-П необходимо дифференцировать зону подавления роста (учитывается) и зону гемолиза (не учитывается). Это может вызвать определенные трудности:

- бета-гемолизины диффундируют в агар, поэтому обычно над зоной гемолиза нет роста микроорганизмов;
- альфа-гемолизины не диффундируют в агар, поэтому гемолиз часто является маркером роста микроорганизмов. Край зоны подавления роста и дополнительный край α -гемолиза наиболее характерны при определении чувствительности *Streptococcus pneumoniae* к бета-лактамам.

Для облегчения дифференциации зоны подавления роста и зоны гемолиза, чашку следует просмотреть, поворачивая под разными углами. Над зоной бета-гемолиза рост как правило отсутствует, но наблюдается над всей зоной α -гемолиза (рис. 11).

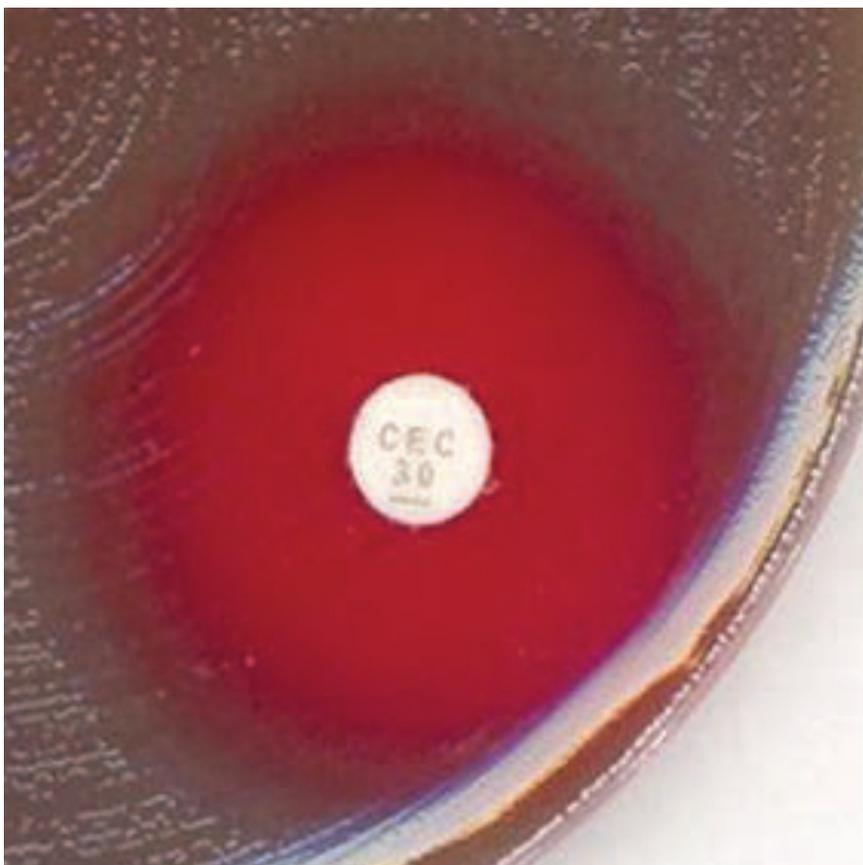


Рис. 11. Измерение зоны задержки роста при определении чувствительности альфа-гемолитического стрептококка

В некоторых случаях зона α -гемолиза выходит за пределы границы роста. Для облегчения учета результатов чашку следует рассматривать под разными углами.

Измерение диаметров зон подавления роста (частные случаи):

- *Enterobacteriales* и ампициллин, ампициллин-сульбактам и амоксициллин-клавулановая кислота при использовании некоторых серий агара МХ внутри основной зоны подавления роста может появляться нежный рост, образующий вторую зону. Этот рост следует игнорировать. При учете результатов только по внешней зоне различия в размерах зон между различными сериями не выявляются.

- *Enterococcus* spp. и ванкомицин. Если диаметр зоны подавления роста ≥ 12 мм, следует тщательно оценить край зоны подавления роста, расположив чашку дном книзу в проходящем свете (поднести чашку к источнику света).

Если край зоны подавления роста четкий, изолят оценивается как чувствительный.

При нечетком крае зоны подавления роста, наличии изолированных колоний внутри зоны или при неясной ситуации следует оценить изолят как предположительно ванкомицинрезистентный энтерококк (VRE) и выполнить подтверждающее исследование, даже если d зоны ≥ 12 мм (рис. 12, 13).



Рис. 12. Учет зоны задержки роста энтерококка к ванкомицину



Рис. 13. Варианты зон задержки роста ванкомицинрезистентных энтерококков

Изолят нельзя оценивать как чувствительный до истечения полных 24 ч инкубации.

- *Staphylococcus* spp. и бензилпенициллин. Если диаметр зоны подавления роста ≥ 26 мм, следует особенно тщательно осмотреть край зоны подавления роста в проходящем свете (поднести чашку к источнику света). Если диаметр зоны подавления роста ≥ 26 мм и край зоны четкий (нет истончения газона по мере приближения к границе), изолят должен быть оценен как резистентный. Если диаметр зоны подавления роста ≥ 26 мм и граница зоны подавления роста размытая (постепенное истончение газона по направлению к границе), изолят следует оценить как чувствительный.

- При оценке результатов выявления резистентности к метициллину у изолятов *Staphylococcus aureus* (MRSA) следует измерить видимую зону подавления роста и тщательно при хорошем освещении осмотреть зону с целью возможно обнаружения изолированных колоний внутри зоны. Эти колонии могут быть

как следствием контаминации микроорганизмом другого вида, так и проявлением гетерогенной метициллинорезистентности исследуемого изолята.

- Для определения продуцентов гена *mecA* и соответственно устойчивости к бета-лактамам коагулазонегативных стафилококков необходимо ориентироваться на рекомендации EUCAST текущего года.

- Выявление индуцибельной резистентности к клиндамицину. Об индуцибельной резистентности к клиндамицину у стафилококков и стрептококков свидетельствует наличие антагонизма между клиндамицином и макролидами. Для выявления антагонизма необходимо поместить диски с эритромицином и клиндамицином рядом на расстоянии 12-20 мм друг от друга (между краями дисков) – у стафилококков (рис. 14) и 12-16 мм (между краями дисков) у стрептококков и оценить наличие антагонизма (D-феномен).

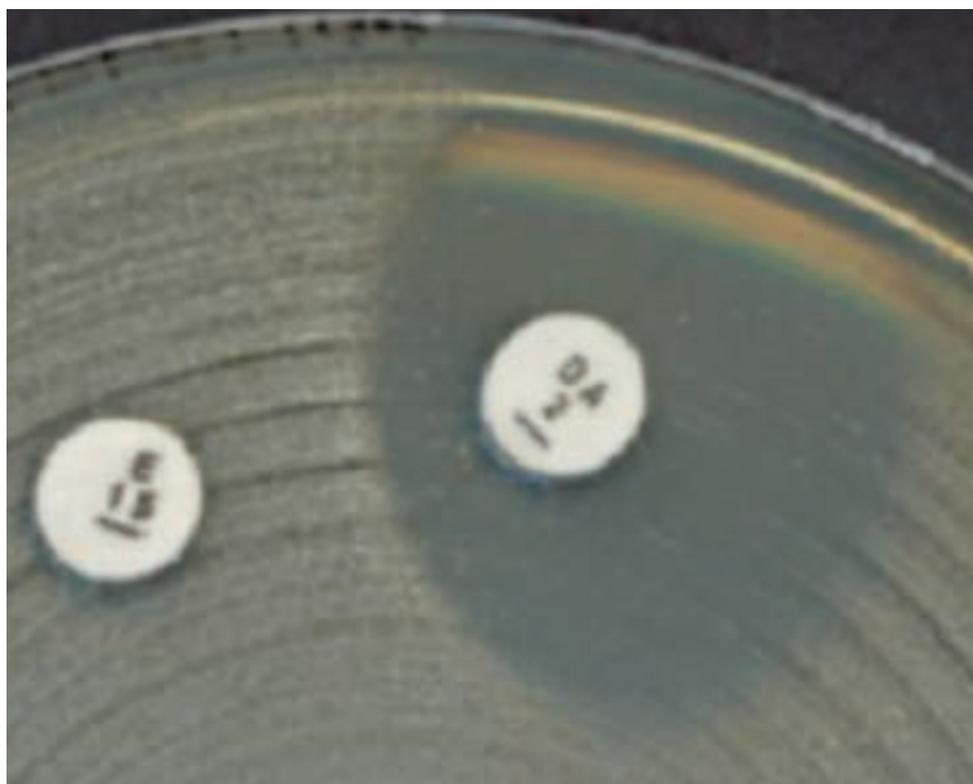


Рис. 14. Выявление индуцибельной резистентности стафилококков к клиндамицину (D-феномен)

- *H. influenzae* и бета-лактамы. Если в зоне полного подавления роста наблюдается область роста вокруг диска. В этом случае учет результатов проводится по внешнему краю зоны подавления роста.

Возможными источниками ошибок, возникающих при использовании диско-диффузионного метода, могут быть проблемы, связанные с дисками, питательной средой, условиями проведения исследования и качеством контрольных штаммов.

1. Питательная среда

Несоблюдение режима хранения чашек. Несоблюдение инструкции при приготовлении агара. Вариации между различными партиями или смена поставщика агара. Добавки (вариации между партиями, неправильное количество или истечение срока годности), рН. Оценка результатов исследования аминогликозидов может способствовать выявлению неприемлемых вариаций содержания двухвалентных катионов в среде, тигециклина – вариаций в содержании магния, триметоприма-сульфаметоксазола – проблем с содержанием тимина и тимидина, эритромицина – неприемлемый уровень рН. Уменьшение или увеличение диаметров зон подавления роста вокруг дисков с аминогликозидами при исследовании *P. aeruginosa* ATCC 27853 по отношению к допустимым значениям могут свидетельствовать о высокой или низкой концентрации двухвалентных катионов (Ca²⁺, Mg²⁺) в среде, соответственно.

Толщина слоя агара/Объем агара. Изменение глубины слоя агара в чашке Петри выше или ниже допустимых значений может привести к формированию зон подавления роста меньшего или большего диаметра.

Истекший срок годности агара.

2. Условия тестирования

Несоблюдение правила «15-15-15 минут» (нанесение суспензии в течение 15 мин, нанесение дисков в течение 15 мин, начало инкубации в течение 15 мин).

Инкубация (температура, атмосфера и время). Подавляющее большинство бактерий инкубируют при 35±1°C в обычной атмосфере в течении 18±2 часа. Стрептококки, гемофильные палочки, моракселлы, коринебактерии, листерии рекомендуется инкубировать при 35±1°C в атмосфере 4-6% CO₂ в течении 20±2 часов.

Неправильная инокуляция (слишком малая, слишком большая плотность суспензии, неравномерная инокуляция).

Условия учета результатов (фон, освещение). Определение края зоны подавления роста.

3. Диски с антибиотиками

Неправильный выбор диска (другой препарат, или диск с другой нагрузкой).

Активность антибиотика (неправильное хранение, истечение срока годности). Использование дисков, не достигших комнатной температуры до открытия контейнера. Чрезмерное количество дисков на чашке (взаимодействие между антибиотиками).

4. Контрольные микроорганизмы

Неправильный выбор контрольного штамма.

Возраст культуры.

Соблюдение многочисленных правил определения чувствительности бактерий к антибиотикам *in vitro*, а также выбор критерия для оценки категории чувствительности, позволяют получить корректные результаты микробиологического исследования для назначения рациональной терапии или

анализа уровня антибиотикорезистентности. В частности, для определения категории чувствительности штамма к антибиотикам, необходимо использовать критерии конкретного документа текущего года. Некорректно оценивать категории чувствительности для разных антибиотиков по разным документам, т.к. это вносит определенные «разночтения» и может привести к ошибкам в назначениях препаратов (таб.1).

Таблица 1

Оценка чувствительности энтеробактерий к некоторым антибиотикам по европейским и американским критериям

| Антибиотик | CLSI 2024 | | EUCAST 2025 | |
|------------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| | S | R | S | R |
| Цефотаксим | | | | |
| МПК | ≤ 1 | > 4 | ≤ 1 | > 2 |
| ДДМ | ≥ 26 | ≤ 22 | ≥ 20 | ≤ 17 |
| Цефепим | | | | |
| МПК | ≤ 8 | ≥ 32 | ≤ 1 | > 4 |
| ДДМ | ≥ 18 | ≤ 14 | ≥ 27 | ≤ 24 |
| Имипенем | | | | |
| МПК | ≤ 1 | ≥ 4 | ≤ 2 | > 4 |
| ДДМ | ≥ 23 | ≤ 19 | ≥ 22 | ≤ 19 |

Критерии Российских рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» версии 2024-02 полностью совпадают с критериями EUCAST 2024, v.14, в 2025 году опубликован документ EUCAST, отечественные рекомендации не переизданы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование антибиотиков в течение 65 лет с момента их создания показало, что значение этих биологически активных веществ в медицине и других областях остается актуальным и в настоящее время. В то же время, широкое распространение бактерий, устойчивых к АМП разных классов, показало необходимость соблюдения многочисленных правил при определении чувствительности к антибиотикам и анализа уровня антибиотикорезистентности. Целью микробиологического мониторинга устойчивости микроорганизмов является предоставление информации в соответствующие органы системы здравоохранения для разработки надлежащих мероприятий по контролю и сдерживанию развития и распространения антибиотикорезистентности, оптимизации антибактериальной терапии инфекций определенной локализации у различных категорий пациентов. В зависимости от уровня проведения надзора за антибиотикорезистентностью, его результаты могут быть представлены для внутренней информации клиницистам и администрации определенного лечебного учреждения, а также для интеграции их в Европейскую и Международную системы данных по антимикробной резистентности. Особенно перспективным может быть представление этих данных для свободного доступа в сети Интернет, что позволяет своевременно дополнять и корректировать представленную информацию при появлении новых сведений.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глухарева Т.В., Селезнева И.С., Уломский Е.Н. Основы получения и применения антибиотиков. Екатеринбург, 2021.
2. Полотебнов, А.Г. Патологическое значение плесени // [Соч.] Д-ра А.Г. Полотебнова, доц. при С.-Петербур. мед.-хирург. акад.. — Санкт-Петербург : тип. Я. Трея, 1873. — [2], 26, 9-71 с., 1 л. ил.: 21.
3. Краткий справочник по антимикробной терапии. Под ред. Р.С.Козлова. Смоленск, 2009.
4. Национальный стандарт ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *invitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни.
5. Murray C., Ikuta K., Sharara F., Swetschinski L., Aguilar G., Gray A., et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-655. DOI: 10.1016/S01406736(21)02724-0.
6. Зубарева В.Д., Соколова Н.А., Безбородова Н.А. и др. Молекулярные основы и генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам // Сельскохозяйственная биология. 2022; 57(2): 237-256.
7. Team R C. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: www.r-project.org. Accessed June, 2023.
8. Российские рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Версия 2024-02.
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters. Version 15, 2025.
10. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Slide show. Version 2024-12. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/.
11. СанПин 3.3586-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
12. Information letter of The Ministry of Health of the Russian federation 25.05.2023 N 30-5/И/2-9190 «Organization of local monitoring antimicrobial resistance system». Available at: www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_449390/de91c621e2a54d39e838c48105b297e0b82c85cf/. Accessed June 25, 2023. Russian. (Письмо Минздрава России от 25.05.2023 г. N 30-5/И/2-9190 «Об организации системы локального мониторинга антимикробной резистентности»). Доступно по адресу: www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_449390/de91c621e2a54d39e838c48105b297e0b82c85cf/.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К
АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫМ
МЕТОДОМ.
ПРАВИЛА И ОСОБЕННОСТИ**

Учебно-методическое пособие

Авторы:

Наталья Александровна Гординская
Наталья Николаевна Зайцева
Сергей Николаевич Цыбусов
и др.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
603022, Нижний Новгород, пр.Гагарина,23